



ORIGINAL ARTICLES

농약의 피부감작성 평가를 위한 인체 세포주 활성화시험 (human Cell Line Activation Test) 조건 확립

이명지 · 박수진 · 임정현 · 박연기 · 신지영 · 박혜진*

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과

Establishment of Human Cell Line Activation Test(h-CLAT) Conditions for Skin Sensitization Assessment of Pesticides

Myung-Ji Lee, Soojin Park, Jeong-Hyun Lim, Yeon-Ki Park, Ji-Young Shin, Hye-Jin Park*

Toxicity and Risk Assessment Division, Department of Agro-food safety, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, 166, Nongsaeogmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea

(Received on November 25, 2021. Revised on December 13, 2021. Accepted on December 13, 2021)

Abstract Pesticides may be absorbed directly or indirectly during the manufacturing and spraying process through human skin, causing skin sensitization diseases such as allergic dermatitis. Conventionally, the skin sensitization of pesticides was evaluated by *in vivo* tests using experimental animals such as guinea pigs and mice. However, due to the animal welfare and restriction on animal testing, various alternatives to animal test are being developed. Therefore, in this study, before applying the *in Vitro* Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test(h-CLAT) among alternative tests, the skin sensitization of 8 of proficiency substances, the guidelines suggested, was evaluated. As a result, the maximum RFIs (Relative fluorescence intensity) of CD86 and CD54 for 2,4-dinitrochlorobenzene were 1586% and 597%, imidazolidinyl urea 533% and 886%, 2-mercapbenzothiazole 454% and 469%, nickel sulfate was 530% and 1012%, 4-aminobenzoic acid was 110% and 128%, glycerol was 122% and 96%, isopropanol was 146% and 105%, and lactic acid was 135% and 124%. In 4 out of 8 test substances, the CD86 and CD54 RFI values exceeded the skin sensitization standards and also EC range was within the range suggested by the OECD TG. Consequently, those were judged as positive substances. In this study, by establishing h-CLAT, it is thought that it could be used to assess the skin sensitization of various pesticides.

Key words animal alternative methods, human Cell Line Activation Test (h-CLAT), skin sensitization, pesticides

서 론

농약은 제조 및 살포, 농작물 수확, 식품 섭취 등 다양한 경로로 피부, 입을 통해 인간에게 노출될 수 있다(Jo et al., 2018). 이에 농약의 안전성 확보를 위하여 국내 농약 등록 시, 농약관리법 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」에 따라 급성 독성(경구·경피 독성, 피부감작성 등)을 포함한 다양한 독성 시험성적을 제출하도록 하고 검토함으

로써 독성을 평가하고 있다(RDA, 2021). 독성 시험에는 사람을 대신해 마우스, 토끼 등 수많은 실험동물이 사용되고 있으며, 2020년 한 해 동안 농약 독성 시험에 사용된 실험동물의 수는 총 2,114마리이다(APQA, 2020).

그러나 최근 실험동물에 대한 생명윤리 강화로 윤리적 문제가 대두되면서, 국내외 동물실험 규제가 엄격해지고 있다. 유럽은 제 7차 EU 화장품 지침 개정을 통해 화장품 안전성 평가를 위한 동물실험을 완전히 금지하였고(EC, 2003) 미국 환경청(EPA)은 동물실험을 감소시켜 2035년까지 원칙적으로 금지시키겠다는 지침을 발표하였다(US EPA, 2019). 또한 3R 원칙(Replacement, Refinement, Reduction, 3R)에 의

*Corresponding author
E-mail: hjin11@korea.kr

거하여(Rosholt, 2005) 경제협력개발기구(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) 및 유럽 연합 유럽대체실험검증센터(European Union Reference Laboratory for alternative to Animal Testing, EURL-ECVAM)를 중심으로 동물대체시험법 개발·검증 연구를 시작하였다(EURL-ECVAM 2012; OECD, 2015a; OECD, 2015b; OECD, 2016; Ezendam et al., 2016).

이러한 국제적 추세에 맞추어 국내에서도 2014년 화장품법 개정에 따라 화장품 안전성평가를 위한 동물실험이 금지되었고(MFDS, 2014), 농약 독성 분야에서는 2010년부터 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」에 유전독성(복귀돌연변이, 포유류 세포를 이용한 염색체이상시험), 급성경구독성(고정용량법, 급성독성등급법 등), 피부감작성(국소림프절시험법, 국소림프절시험법 BrdU-ELISA, 펩타이드 반응성 시험법 등), 피부자극성(인체피부모델시험법) 등 다양한 독성 항목에 대한 동물대체시험법을 고시하고 이를 평가에 활용하고 있다(RDA, 2021).

독성 항목 중 피부감작성은 물질이 피부에 노출되었을 때 나타나는 T세포 매개 면역 독성의 일환으로, 농약의 경우 농작업자의 피부를 통해 직, 간접적으로 흡수되어 알러지성 접촉 피부염(allergic contact dermatitis, ACD) 등 피부질환을 유발할 수 있다(Girolomoni et al., 2004; Maxwell et al., 2011; Ezendam et al., 2016; Lee et al., 2020). 과거 농약의 피부감작성은 기니피그를 이용한 동물실험으로 평가되었으며 기니피그 극대화 시험법(Guinea pig maximization test (GPMT), Magnusson and Kligaman, 1969; Magnusson, 1980)과 폐쇄접촉시험법(Buehler test (BT), Buehler, 1965)이 주로 사용되어왔다(농촌진흥청 고시 제2000-2호). 현재 활용도가 가장 높은 피부감작성 동물대체시험법은 실험 동물을 줄일 수 있는 마우스 국소림프절시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA, OECD Test Guideline 429)과 이를 변형한 국소림프절시험법 DA (LLNA: DA, OECD TG 442A), 국소림프절시험법 BrdU-ELISA (LLNA: BrdU-ELISA, OECD TG 442B)이나 여전히 실험동물(마우스)을 사용하고 방사선 동위원소를 이용해야 하는 어려움이 있다(농촌진흥청 고시 제2012-13호; OECD, 2010a; OECD, 2010b; OECD, 2010c).

이후 동물을 완전히 사용하지 않는 *In chemico/In vitro* 실험으로 단백질, 인체유래 세포주 등을 이용한 펩타이드 반응성 시험(*In chemico* skin sensitization: Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA, OECD TG 442C), ARE-Nrf2 루시페라아제 시험(*In Vitro* skin sensitization: ARE-Nrf2 luciferase test method, OECD TG 442D) 및 인체 세포주 활성화 화법(human Cell Line Activation Test, h-CLAT, OECD TG 442E) 등이 농약관리법에 고시되었다(농촌진흥청 고시 제2019-5호, OECD, 2015a; OECD, 2015b; OECD, 2016).

인체 세포주 활성화화법(h-CLAT)은 피부감작성 독성발현경

로(Adverse Outcome Pathway; AOP) 4단계 중 3단계에 해당하는 시험으로, 수지상 세포 THP-1의 활성화 과정에서 세포 표면 발현 항원인 CD86 및 CD54의 발현 정도가 감작성물질 노출 시 증가함에 기초하였다(Ashikaga et al., 2006; Yang, 2020). h-CLAT은 인축 대상 첩포시험법이나 국소림프절시험법과 같은 *In vivo* 시험에 비해 정확도는 다소 낮은 것으로 평가되고 있으나, 동물을 완전히 사용하지 않고 다른 피부감작성 동물대체시험법에 비해 재현성이 높고 시험 시간이 비교적 짧다는 장점이 있다(Nukada et al., 2012; Cho et al., 2020).

그러나 아직까지 h-CLAT을 이용한 피부감작성 평가 연구는 화장품 원료 및 제품을 중심으로 활발하게 진행되고 있으며, 농약에 대한 연구 사례는 미진한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 농약의 피부감작성 평가에 h-CLAT을 활용하기 위하여 OECD TG 442E에 제시된 숙련도 물질 8종으로 시험 조건을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

THP-1 세포 배양

THP-1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. L-Glutamine과 HEPES buffer가 함유된 RPMI-1640 배지에 10% fetal bovine serum, 0.05 mM 2-mercaptoethanol 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 세포 배양 배지로 사용하였으며 배양 시약은 모두 gibco-Invitrogen (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 세포 해동 후, T75 Flask에 0.2×10^6 cells/mL 밀도로 하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2~3일 간격으로 계대 배양하였다. 세포 계대 수(passage number)는 30이 넘지 않도록 하였다.

시험 약제

본 시험법 확립을 위해서 OECD 442E 부록 2에 숙련도 물질로 기술된 양성 및 음성 물질 8종: 4-Aminobenzoic acid (95%), 2,4-dinitrochlorobenzene (99%), glycerol (99%), imidazolidinyl urea (95%), isopropanol (99%), lactic acid (85%), 2-mecapbenzothiazole (97%), nickel sulfate (99%)를 포함한 모든 시약은 sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 숙련도 물질 중 2,4-dinitrochlorobenzene과 nickel sulfate는 시험의 양성대조물질, lactic acid는 음성대조물질로 사용하였다. 시험 물질의 용해도에 따라 제조한 세포배양 배지 또는 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 용매로 사용하였다. 형광 시약의 경우, FITC-conjugated mouse IgG1 (DAKO, Glostrup, Denmark), FITC-conjugated anti-human CD86 및 CD54 (BD-PharMingen, SanDiego, CA, USA)를 구입하여 사용하였다.

Table 1. Recommended test chemicals for demonstrating technical proficiency with the h-CLAT method(OECD, 2016)

Test chemicals	CAS	Physical state	<i>In vivo</i> data ^{a)}	CV75 Reference Range in µg/mL	h-CLAT results for CD86 (EC150 Reference Range in µg/mL)	h-CLAT results for CD54 (EC200 Reference Range in µg/mL)
4-Aminobenzoic acid	150-13-0	Solid	Non-sensitiser	>1000	Negative (>1000)	Negative (>1000)
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Sensitiser	2-12	Positive (<40)	Positive (0.5-15)
Glycerol	56-81-5	Liquid	Non-sensitiser	>5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Solid	Sensitiser	25-100	Positive (20-90)	Positive (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Liquid	Non-sensitiser	>5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
Lactic acid	50-21-5	Liquid	Non-sensitiser	1500-5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
2-Mercapbenzothiazole	149-30-4	Solid	Sensitiser	30-400	Negative (>10) ^{b)}	Positive (10-140)
Nickel sulfate	10101-967-0	Solid	Sensitiser	30-500	Positive (<100)	Positive (10-100)

^{a)}The *in vivo* hazard and (potency) prediction is based on LLNA data.

^{b)}Historically, a majority of negative results have been obtained for this marker and therefore a negative result is mostly expected. The range provided was defined on the basis of the few historical positive results observed. In case a positive result is obtained, the EC value should be within the reported reference range.

인체 세포주 활성화법(human Cell Line Activation Test, h-CLAT)

본 연구는 OECD 시험법 가이드라인 TG 442E로 등재된 *In vitro* Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAT) 및 유럽연합 동물대체시험법 연구 추진기관 (EURL-ECVAM)의 검증 연구(DBLAM Protocol No.158: human Cell Line Activation Test)에 의거하여 시험을 수행하였다(OECD, 2016; MFDS, 2017; EURL-ECVAM, 2012). 시험에 들어가기 앞서, 세포 반응성 시험(reactivity assay)을 통해 양성 및 음성대조물질에 대한 THP-1 세포의 반응성을 확인하고, OECD TG 442E에서 제시된 숙련도 물질 10종 중 8종을 통해 시험의 숙련도를 검증하였다(Table 1).

h-CLAT은 크게 두 단계 실험으로 나눌 수 있는데, 먼저 세포 표면 항원CD86/CD54 발현 측정에서 시험 물질의 최고 농도 설정을 위해 용량설정시험(Cell viability 75)을 수행하였다. 인체 수지상 세포인 THP-1에 시험 물질을 적용한 후 propidium iodide(PI) 염색을 통해 유세포 분석으로 세포 생존율(Cell viability)을 계산하였다. 세포생존율을 계산하는 수식은 아래와 같다.

$$\text{Cell viability} = \left(\frac{\text{살아있는 세포 수}}{\text{총 획득한 세포 수}} \right) \times 100$$

시험 물질에 대한 THP-1 세포생존율을 이용하여 아래 수식의 로그-선형 보간법으로 75% 세포 생존율에 대한 최고

농도(CV75)를 결정하였다.

$$\text{Log CV75} = \left(\frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c} \right)$$

a: 75% 이상 세포 생존율 최소값, c: 75% 이상 세포 생존율 최대값

b, d: 각각의 세포 생존율 a와 c 값을 나타내는 농도

다음 단계는 본 시험(형광 발현 측정 시험)으로, 세포에 적용할 시험 물질 최고 농도(CV75)를 결정한 후, 최고농도로부터 계대 희석한 8개 농도에 대하여 유세포 분석을 통해 형광 색소 항체 CD86/CD54 발현을 측정하였다. 유세포 분석으로 얻은 기하평균 형광 강도(mean fluorescence intensity, MFI) 값을 아래 식에 대입하여 세포 표면 표지자인 CD86 및 CD54의 상대적 형광 강도(Relative fluorescence intensity, RFI)를 계산하였다.

$$\text{RFI} = \left[1 - \left(\frac{\text{시험물질처리세포 MFI} - \text{시험물질처리대조군세포 MFI}}{\text{용매,부형제 처리대조군세포 MFI} - \text{용매,부형제 처리 동형대조군 세포 MFI}} \right) \right] \times 100$$

MFI = Mean Fluorescence Intensity (기하평균 형광 강도)

결과 판정은 하나 이상의 농도에서 CD86의 RFI는 150%,

CD54의 RFI는 200% 이상인 경우를 기준으로 최소 두 번의 독립적인 반복실험에서 두 번 이상이 양성인 경우 피부 감각성에 대해 양성, 그렇지 않으면 음성으로 판정하였다.

시험 물질 제조 및 유세포 분석

용량설정시험(CV75)에서 시험 물질 용매는 세포배양배지 또는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하였으며, 용매가 세포배양배지인 경우 표준 용액(stock solution)은 최고농도 100 mg/mL, DMSO인 경우 500 mg/mL로 하였다. 표준 용액 농도는 시험 물질 용매에 따른 최고농도로부터 1:2로 계대 희석하여 총 8개로 준비하였다. 세포에 직접 반응시키는 시험 용액(working solution)은 표준 용액을 세포배양배지로 희석해서 사용하며, 시험 물질 용매로 DMSO를 이용한 경우 1:250, 세포배양배지를 이용한 경우 1:50으로 희석하였다. OECD TG에 따라 시험 물질 용매가 세포배양배지인 경우, 플레이트 최고농도인 1 mg/mL에서 무독성일 때 새로운 세포독성시험을 실시하여 최고농도를 재결정하였으며, 최종적으로 5 mg/mL 이하로 설정하였다. 용매가 DMSO인 경우, 무독성이어도 플레이트에서 최고농도는 1000 µg/mL 이하로 설정하였다. 시험 당일 세포는 2.0×10^6 cells/mL의 농도로 새로운 세포 배양 배지에 재현탁하여 24-well plate에 500 µL (1.0×10^6 cells/well) 분주하였다. 시험 용액은 준비된 세포 현탁액과 1:1(v/v)로 처리하고 처리된 플레이트는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 ± 0.5시간 동안 배양하였다. 이후 PI 용액(최종 농도 0.625 µg/mL)으로 염색하여 유세포 분석을 통해 세포 생존율을 측정하였다.

본 시험(형광 발현 측정 시험)에서 표준 용액은 용량설정 시험으로 확인한 최고 농도 값에 1.2배 계대 희석($1.2 \times CV75 \sim 0.335 \times CV75$)하여, 세포배양배지와 DMSO 각각 100배 및 500배에 상응하는 8개의 농도를 제조하였다. 준비된 세포 현탁액(2.0×10^6 cells/well)과 시험 물질을 각각 500 µL 분주한 후 24시간 배양하였다. 24시간 배양한 세포는 완충액(FACS buffer)으로 세척한 후, 비특이적 항체 결합 차단 용액(blocking solution, 0.05% globulin in FACS buffer) 600 µL을 처리하고 차광조건에서 FITC-labelled anti-CD86, anti-CD54 및 mouse IgG1 (isotype) 항체 50 µL로 각각 염색을 실시하였다(4°C, 30분). 염색된 세포에 최종적으로 PI 용액(최종 농도 0.625 µg/mL)을 추가하였으며, 유세포 분석기(FACS Calibur™, CellQuestPro, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)의 획득 채널(acquisition channel) FL-3 및 FL-1을 활용하여 분석하였다.

시험 결과 유효성 기준 및 판정 기준

위의 예측모델을 통해 최소한 두 번의 반복 실험에서 CD86 및 CD54의 상대적 형광 강도(Relative Fluorescence Intensity, RFI) 값이 각각 CD86의 경우 $RFI \geq 150\%$, CD54

의 경우 $RFI \geq 200\%$ 을 초과할 경우 양성, 기준 미만일 경우 음성으로 판정하였다. 배지 및 용매 대조군에서의 세포생존율은 90% 이상이어야 하며 용매대조군에서 CD86 및 CD54의 RFI 값은 양성 기준($CD86 RFI \geq 150\%$ 및 $CD54 RFI \geq 200\%$)을 초과하지 않아야 한다. 또한 배지 및 용매 대조군 모두 동형(isotype) 대조군에 대한 CD86 및 CD54의 MFI 비율이 105%를 초과해야 한다. 양성대조물질인 2,4-dinitrochlorobenzene에서는 CD86 및 CD54의 RFI 값이 양성 기준을 충족하고 세포생존율이 50% 이상이어야 한다. 위의 기준 중 하나라도 충족하지 못할 시에는 재시험을 수행하였다.

결과 및 고찰

용량 설정 시험

먼저 용량설정시험 전, THP-1 세포주의 반응성을 확인하기 위하여 양성대조물질인 2,4-dinitrochlorobenzene, nickel sulfate와 음성대조물질인 lactic acid를 처리한 후 유세포 분석기를 이용한 형광 발현 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 양성대조물질인 2,4-dinitrobenzene (Fig. 1B) 및 nickel sulfate (Fig. 1C)를 처리한 경우, 무처리구(Fig. 1A) 및 음성대조구(Fig. 1D)와 비교하였을 때 FL-1 채널에서 그래프가 SHIFT 되고 높은 MFI 값을 나타냈다. 각각의 대조물질에 대하여 RFI 값을 계산한 결과, 2,4-dinitrochlorobenzene의 CD86 및 CD54에 대한 RFI 값은 782% 및 714%, nickel sulfate는 498% 및 6808%, lactic acid는 34% 및 111%로 나타났으며, 이는 모두 피부감작성 양성 및 음성 기준에 모두 부합하였다.

시험 물질 8종에 대한 용량설정시험(CV75) 값의 평균은 2,4-Dinitrochlorobenzene은 4.92 µg/mL, imidazolidinyl urea는 29.11 µg/mL, lactic acid는 2974.90 µg/mL, 2-mercaptobenzothiazole은 195.53 µg/mL, nickel sulfate는 54.13 µg/mL로 나타났다(Table 2). 4-aminobenzoic acid, glycerol 및 isopropanol은 설정한 8개 모든 농도에서 세포 생존율이 75% 이상으로 나타나 CV75를 각각 사용한 용매에 따라 최고농도 1000 µg/mL 또는 5000 µg/mL로 결정하였다. 따라서 시험 물질 8종의 CV75 값은 모두 Table 1에 제시되어 있는 OECD TG 범위 내에 포함되는 것으로 나타났다.

시험 물질에 대한 피부감작성 평가

본 시험(형광 발현 측정 시험)에 앞서 시험 물질 8종에 대한 세포생존율은 모두 50% 이상이었으며, 동형(isotype) 대조군에 대한 CD86 및 CD54의 MFI 비율도 105%를 초과하여 시험 유효성 기준을 충족하였다. 시험 물질의 피부감작성 평가를 위해 본 시험을 수행한 결과, 시험 물질 당 8개의 농도 중 가장 높은 CD86 및 CD54의 상대적 형광강도(max RFI) 값은 Table 2와 같았다. 2,4-Dinitrochlorobenzene의

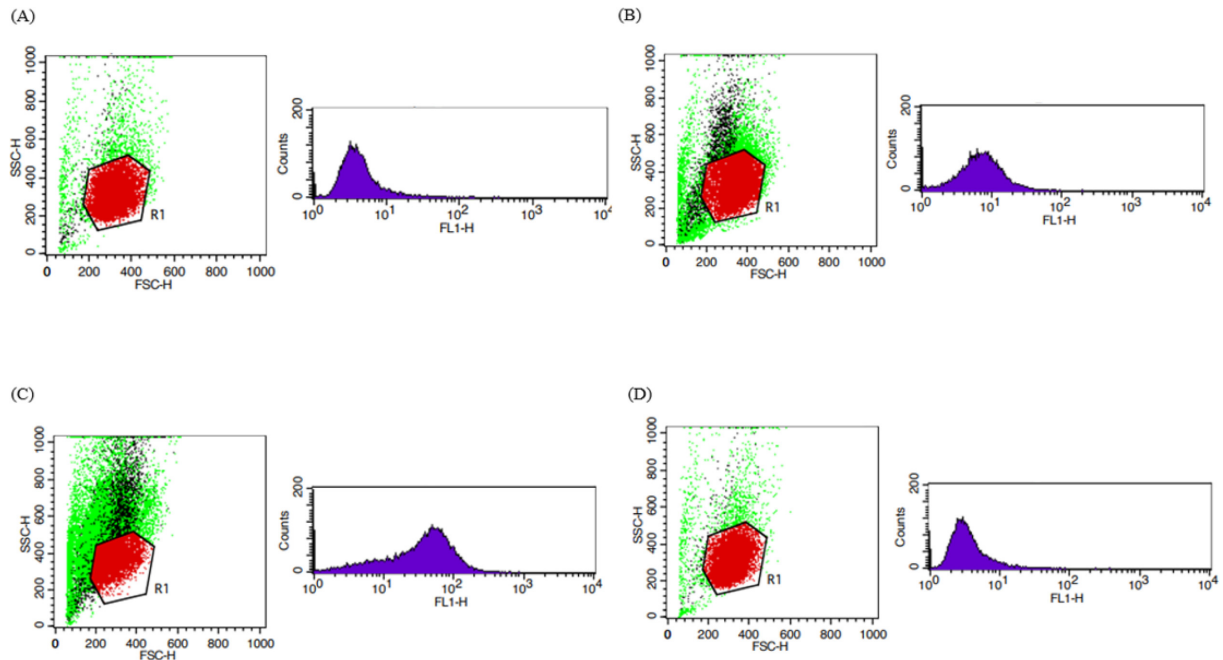


Fig. 1. Flow cytometry analysis. Density plot of THP-1 (control) (A); density plot of THP-1 (treated 2,4-dinitrochlorobenzene) (B); density plot of THP-1 (treated nickel sulfate) (C); density plot of THP-1 (treated lactic acid) (D).

Table 2. Results of cell viability and skin sensitization for test chemicals with *in vitro* human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

Test chemicals	Solubility ^{a)}	Average of CV75 (µg/mL)	Mean of h-CLAT ^{b)}				Classification based h-CLAT from OECD 442E
			Max RFI (CD86)	Max RFI (CD54)	EC150 ^{c)} (CD86)	EC200 (CD54)	
4-Aminobenzoic acid	DMSO	>1000	110	128	>1000	>1000	Negative
2,4-Dinitrochlorobenzene	DMSO	4.92	1586	597	2.01	2.70	Positive
Glycerol	Media	>5000	122	96	>5000	>5000	Negative
Imidazolidinyl urea	DMSO	29.11	533	886	25.31	26.01	Positive
Isopropanol	Media	>5000	146	105	>5000	>5000	Negative
Lactic acid	Media	2974.90	135	124	>5000	>5000	Negative
2-Mercapbenzothiazole ^{d)}	DMSO	195.53	454	469	120.53	95.92	Positive
Nickel sulfate	Media	54.13	530	1012	34.83	36.26	Positive

^{a)}The final concentration in the plate should not exceed 5000 µg/mL (saline or medium) or 1000 µg/mL (DMSO) even if this concentration is non-toxic (OECD, 2016)

^{b)}The RFI of CD86 and CD54 is equal to or greater than 150% and 200% in at least one tested concentration, respectively, the h-CLAT prediction is considered positive. (with cell viability ≥ 50%)

^{c)}Average of effective Concentration value

^{d)}In case a positive result is obtained, the EC value should be within the reported reference range (OECD, 2016)

CD86 및 CD54에 대한 max RFI 값은 1586% 및 597%, imidazolidinyl urea는 533% 및 886%, 2-mercapbenzothiazole은 454% 및 469% 이며 nickel sulfate는 530% 및 1012%로 나타났다. 언급한 4종의 시험 물질에 대하여 2 회 반복 시험에서 CD86 및 CD54 RFI 값이 모두 양성 기준 (CD86 RFI ≥ 150% 및 CD54 RFI ≥ 200%)을 초과하였으므로, 피부감작성 양성 물질로 최종 판정하였다. 반면 4-aminobenzoic acid는 CD86 및 CD54에 대한 max RFI 값이

110% 및 128%, glycerol은 122% 및 96%, isopropanol은 146% 및 105%, lactic acid는 135% 및 124%로 2회 반복 시험에서 CD86 및 CD54 RFI 값이 모두 양성 기준 이하로 나타나 피부감작성 음성 물질로 판정하였다(Table 2).

시험 물질이 피부감작성 양성 물질로 판정된 경우, 유효 농도(Effective concentration; EC) 구할 수 있으며, 따라서 본 시험을 통해 양성물질로 판정된 시험 물질 4종(2,4-dinitrochlorobenzene, imidazolidinyl urea, 2-mercapbenzo-

thiazole, nickel sulfate)에 대하여 CD86 및 CD54의 EC150 및 EC200을 계산하였다. 2,4-dinitrochlorobenzene에 대해 EC150은 2.01 µg/mL, EC200은 2.70 µg/mL, imidazolylidynyl urea는 각각 25.31 µg/mL, 26.0 µg/mL, nickel sulfate는 34.83 µg/mL, 36.26 µg/mL로 도출되었다(Table 2). 언급한 시험 물질 3종에 대한 EC값은 모두 OECD 가이드라인에 제시되어 있는 양성 기준 범위에 부합하였다(Table 1). 2-Mercapbenzothiazole의 경우 CD86 및 CD54에 대한 EC값이 각각 120.53 µg/mL, 95.92 µg/mL로 모두 양성 기준을 초과하였으나 OECD TG 442E에서는 CD86에 대하여 음성으로 제시되어 있다(Table 1). 이는 2-mercapbenzothiazole을 이용한 다수의 선행시험에서 CD86에 대하여 음성결과가 나타났기 때문으로 만약 시험결과 CD86에 대하여 양성의 결과를 얻는 경우, CD54에 대한 EC200 값이 10 µg/mL를 초과하여야 한다. 본 시험에서 2-mercapbenzothiazole은 위 전제조건에 부합하므로 최종적으로 양성 기준을 충족하였다. 따라서 시험 물질 8종에 대한 h-CLAT 시험 결과, OECD TG 가이드라인에 기술된 결과와 동일하게 판정되었다.

h-CLAT을 이용한 피부감작성 평가에서 높은 정확도와 재현성은 많은 선행 연구들을 통해 확인 할 수 있다. Nukada et al. (2012)은 LLNA로 평가된 106개의 시험 물질을 선정하여 h-CLAT을 통해 피부감작성 평가를 비교하였으며, 그 결과 h-CLAT의 정확도가 약 84%로 나타났다고 보고하였다. 비슷한 다른 연구 결과에서도 마찬가지로 h-CLAT이 피부감작성에 대하여 높은 예측력을 보였고, 낮은 농도에서도 유의한 반응을 나타냈다(Kim et al., 2009; Otsubo et al., 2017; Nishijo et al., 2019). 또한 화학물질에 대해 동일한 결과를 예측하는 실험실 간 재현성도 우수하다고 나타났다(Sakaguchi et al., 2010). 이러한 선행연구 결과들은 h-CLAT이 알려지지 않은 새로운 물질에 대한 선별 검사법으로 충분히 활용할 수 있는 가능성을 나타낸다.

그러나 h-CLAT은 LLNA와 비교하였을 때 피부감작성 평가에서 위양성 또는 위음성 결과를 나타내기도 하였다(Sakaguchi et al., 2010; Nishijo et al., 2019). log Kow가 3.5 이상인 시험 물질은 본 시험법을 적용하기에 용해도가 낮아 피부감작성 판단이 불가하기 때문에 위음성이 나올 수 있다(NIER, 2016; Park et al., 2016; Saito et al., 2016; Otsubo et al., 2017). 그리고 h-CLAT은 세포의 단백질 발현이 지표로 사용되기 때문에 재현성을 위해서는 세포가 잘 자랄 수 있는 배양 조건을 조성하는 것이 중요하다(Ashikaga et al., 2008). THP-1 세포주는 변형된 cell line으로 대사 능력이 제한되어 있고, 물질 자체가 외부의 산화에 의해서 감작성을 나타낸다면(pre-hapten) 정확하게 감작성 여부를 판단할 수 없으며, lauryl sulphate와 같은 비민감성 자극제는 위양성을 나타낼 수 있다고 알려져 있다(Ashikaga et al.,

2008; EURL ECVAM 2012; Urbish et al., 2016; Otsubo et al., 2017; Yang 2020).

이러한 점들을 고려하였을 때 농약에 대한 피부감작성 평가에서 h-CLAT 적용 시, 시험 과정과 결과에 대한 신뢰성을 높이는 것이 가장 중요하다. 그러기 위해서는 먼저 LLNA 및 사람에 대한 임상실험 결과와 비교할 수 있도록 h-CLAT을 이용하여 다양한 농약의 독성 평가 정보가 축적되어야 하고 또한 시험 과정의 기술적인 부분을 검증할 수 있도록 실험실 간 교차 검증 및 지속적인 시험법 개선 연구가 진행되어야 할 것이다.

현재 농약 원제 및 품목에 대한 독성 및 안전성 평가에서 동물대체시험법 가이드라인 보급과 적용은 미진한 실정이다. 본 연구에서는 OECD TG 442E appendix II에 제시된 숙련도 물질 8종에 대한 시험 결과를 통해 수지상 세포 활성화를 이용한 피부감작성 평가인 인체 세포주 활성화법(h-CLAT)을 성공적으로 구축하였다. 앞으로 본 시험법을 이용한 농약의 피부감작성 평가와 신뢰성을 높이기 위한 연구가 함께 지속적으로 진행된다면, 농약의 피부감작성 평가에서 동물대체시험법 적용 시 보다 정확한 피부감작성 평가가 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01423701)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

저자정보

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

Soojin Park, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

Jeong-Hyun Lim, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

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

Ji-Young Shin, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher

Hye-Jin Park, Agromaterial Evaluation Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-9718-7876>

Literature Cited

- Animal and Plant Quarantine Agency(APQA), 2020. Report on Animal Experiments and the Use of Laboratory Animals for 2020, Wanju, Korea.
- Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, et al., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human cell line activation test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro.* 20(5):767-773.
- Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Jun S, et al., 2008. Assessment of the human cell line activation test (h-CLAT) for skin sensitization; result of the first Japanese inter-laboratory study. *AATEX.* 13(1):27-35.
- Buehler EV, 1965. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. *Arch Dermatol.* 91(2):171-175.
- Cho AR, Yeo KU, Jung MS, Lee JH, Yang SJ et al., 2020. Skin sensitizing predictability on chemical substances with false positivity or negativity following the transfer of human Cell Line Activation. *Journal of Alternative to Animal Experiments.* 14 (1):15-21.
- DB-ALM (INVITTOX), 2014. Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), Pp.1-23. <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocols>
- European Communities, 2003. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003, official Journal of the European Union, L66, 26-35.
- European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL-ECVAM), 2012. Human Cell Line Activation Test(h-CLAT) Validation Study Report Accessible at in publication. Europe.
- 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.
- Girolomoni G, Gisondi P, Ottaviani C, Cavani A, 2014. Immunoregulation of allergic contact dermatitis. *J Dermatol.* 31(4):264-270.
- Jo YM, Park SJ, You AS, Oh JA, Lee JB et al., 2018. Comparison Assessment for Acute Oral and Dermal Toxicity of Plant Protection Products and Active Ingredients. *Krean J. Pestic. Sci.* 22(3):225-244.
- Kim SY, An SS, Kim HK, Lee TR, 2009. In vitro sensitization evaluation of cosmetic ingredients using THP-1 cell line. *Journal of Alternative to Animal Experiments.* 3(1):17-29.
- Lee MJ, Lee S, Ham SN, Park YK, Oh JA, et al., 2020. Assessment of Pesticides using in chemico Direct Peptide Reactivity Assay for Skin Sensitization. *Krean J. Pestic. Sci.* 24(3):286-295.
- Magnusson B, 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 sensitization: the Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment. *Altex.* 28:50-55.
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2014. Cosmetics Act. 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. Pp.1-57.
- 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.
- Nishijo T, Miyazawa M, Saito K, Otsubo Y, Mizumachi H et al., 2019. Sensitivity of KeratinoSensTM and h-CLAT for detecting minute amounts of sensitizers to evaluate botanical extract. *J. Toxicol. Sci.* 44(1):13-21.
- Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H et al., 2012. Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro.* 26(7):1150-1160.
- 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 sensitization: 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 sensitization: ARE-Nrf2 Luciferase test method. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2016. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 442E: in vitro skin sensitization: human Cell Line Activation Test (h-CLAT) vol ENV/JM/WRPR(2016)19]. OECD Publishing, Paris.
- Otsubo Y, Nishijo T, Miyazawa M, Saito K, Mizumachi H, et al., 2017. Binary test battery with KeratinoSensTM and h-CLAT as part of a bottom-up approach for skin sensitization

- hazard prediction. Regul. Toxicol. Pharmacol. 88:118-124.
- Park SR, Cho SA, Lee JH, An SS, 2016. Assessment of Skin Sensitization for Unsaturated Fatty Acid Using Integrated Testing Strategy (ITS) Approaches. Journal of Alternative to Animal Experiments. 10(1):45-51.
- Rosholt AP, 2005. 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. Criteria for Registration of Pesticides and Active substances, Legislation and Notification Directive for pesticide regulation, Wanju, Korea. p. 457-465.
- Rural Development Administration(RDA), 2020. Criteria for Registration of Pesticides and Active substances, Legislation and Notification Directive for pesticide regulation, Wanju, Korea. p. 491-498.
- Rural Development Administration(RDA), 2021. Criteria for Registration of Pesticides and Active substances, Legislation and Notification Directive for pesticide regulation, Wanju, Korea.
- Sakaguchi H., Ryan C, Ovigine JM, Schroeder KR, Ashikaga T, 2010. Predicting skin sensitization potential and inter-laboratory reproducibility of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) in the European Cosmetics Association (COLIPA) ring trials. Toxicol. In Vitro 24(6): 1810-1820.
- Saito K, Takenouchi O, Nukada Y, Miyazawa M, Sakaguchi H, 2017. An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. Toxicol. In Vitro. 40:11-25.
- United States Environmental Protection Agency(US EPA), 2019. Directive to Prioritize Efforts to Reduce Animal Testing. Washington D.C. United States.
- Yang SJ, 2020. Prediction of skin sensitizing potentials on polyhexamethylene guanidine, triclosan, propylene glycol excipient and its mixture through the human-Cell Line Activation Test. Daegu Catholic Univ., MA Diss., Daegu, Republic of Korea.

● ● 농약의 피부감작성 평가를 위한 인체 세포주 활성화법 (human Cell Line Activation Test) 조건 확립

이명지 · 박수진 · 임정현 · 박연기 · 신지영 · 박혜진*

농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과

요 약 농약은 제조 및 살포과정에서 인체 피부를 통해 직, 간접적으로 흡수되어 알러지성 피부염 등 피부감작성으로 인한 질환을 유발할 수 있다. 기존의 농약의 피부감작성은 기니피그, 마우스 등 실험동물을 이용한 *in vivo* 시험으로 평가되었으나, 최근 실험동물에 대한 생명윤리가 강화되면서 국내외로 동물실험이 규제되고있다. 따라서 본 연구에서는 피부감작성 동물대체시험법 중 OECD TG 442E로 등재된 인체 세포주 활성화법(*In Vitro* Skin Sensitization: human Cell Line Activation Test, h-CLAT)을 농약 평가에 적용하기 앞서, 가이드라인에 제시된 숙련도 물질 8종의 피부감작성을 평가하였다. 그 결과 2,4-dinitrochlorobenzene은 CD86 및 CD54에 대한 최대 형광강도(max relative fluorescence intensity; max RFI)가 1586% 및 597%, imidazolidinyl urea는 533% 및 886%, 2-mercaptobenzothiazole은 454% 및 469%이며 nickel sulfate는 530% 및 1012%, 4-aminobenzoic acid는 110% 및 128%, glycerol은 각각 122% 및 96%, isopropanol은 146% 및 105%, lactic acid는 135% 및 124%로 나타났다. 시험 물질 8종 중 4종(2,4-Dinitrochlorobenzene, imidazolidinyl urea, 2-mercaptobenzothiazole, nickel sulfate)의 CD86 및 CD54 RFI 값이 양성 기준을 초과하였고 유효 농도(Effective concentration; EC) 범위 또한 OECD TG에서 제시한 범위와 부합하여, 피부감작성 양성 물질로 최종 판정하였다. 따라서 본 연구를 통해 동물대체시험법인 h-CLAT을 확립함으로써 앞으로 다양한 농약에 대한 피부감작성 평가에 활용하고자 한다.

색인어 농약, 동물대체시험법, 인체 세포주 활성화법(h-CLAT), 피부감작성

● ●