

분광광도법을 이용한 간단한 *in Chemico* 피부감작성 시험법의 개발

차동호, 네팔마헤시, 김건호, 강미정, 정태천*

영남대학교 약학대학

A Simple Spectrophotometric Test to Identify Skin Sensitizers and Non-Sensitizers *in Chemico*

Dong-Ho Cha, Mahesh Raj Nepal, Geon-Ho Kim, Mi-Jeong Kang, Tae-Cheon Jeong*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan, Korea

ABSTRACT. For the key event No. 1 in skin sensitization, a hapten should react with endogenous proteins for the initiation of immune reaction. Although Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) has been developed as an alternative method for key event 1, artificially synthesized peptides and HPLC should be employed in performance, which are somewhat inconvenient. In the present study, a simple spectrophotometric method to identify skin sensitizers *in chemico* was developed by using cysteamine, an endogenous substance that contains amino and thiol groups. To quantitate remaining cysteamine following the reaction with skin sensitizers, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) was selected for the derivatization. The conditions optimized included: incubation time of cysteamine with test substances, molar ratios of cysteamine to test substances, stability of derivatized products of test substances with optimal concentration and incubation time of DTNB, and spectrophotometric characteristics of the derivatized product. With the optimized conditions, 11 skin sensitizers and non-sensitizers were tested to know whether the method is feasible or not. Although further optimization is required, it would be a useful screening tool for determining skin sensitization potential of small molecules, because the present method employs simple endogenous cysteamine as an acceptor for sensitizers with a spectrophotometric detection system.

KEY WORDS: skin sensitization, cysteamine, DPRA, spectrophotometry, *in chemico*

Introduction

화장품 및 그 성분에 대한 동물실험 금지와 화학물질의 등록, 평가, 허가 및 제한에 대한 유럽규정의 시행으로 인해 동물의 사용을 제한한 대체시험법이 널리 연구되고 있다. OECD에서 채택한 시험 중 국소림프절시험이 가장 예측력이 좋은 시험법으로 알려져 있어 널리 보급되어 사용되고 있으며 (Basketter et al., 1992; 1999; 2000; Cockshott et al., 2006; Kimber

et al., 2000; 2002; 2010), 그 외 다양한 *in vitro* 시험법이 개발되어 있다 (Jousey et al., 2006; Ryan et al., 2001; 2005). 그러나 현재 이용할 수 있는 대부분의 대체시험법은 여전히 여러 문제점을 가지고 있다. 예를 들면, 감작성 물질에 노출된 후 배출 림프절에서 T-세포의 증식을 측정하는 표준 방법인 LLNA는 여전히 동물의 사용이 요구되고 (Anderson et al., 2011; Gerberick et al., 2007a; 2007b), 또한 일부 시험에서는 HPLC나 유세포 분석기와 같이 고가의 복잡한 분석기가 요구되거나, 포유동물의 조직이나 세포배양이 필수적이어서 동물실험자들이 대체시험법을 이용한 연구를 수행하기가 어려운 것이 현실이다.

대체시험법을 보편적으로 널리 확산시키기 위해서는 실험 단계를 최소화해서 가능한 한 간단하게 실험하면서 시험의 예측력을 유지하는 것이 필요하다. 이러

Received: 11 November 2019

Revised: 12 December 2019

Accepted: 13 December 2019

* Corresponding author: Tae Cheon Jeong
경북 경산시 대학로 280, 영남대학교 약학대학
(우, 38541)
Tel: 82-53-810-2819 Fax: 82-53-810-4654
E-mail: taecheon@ynu.ac.kr

한 관점에서, 화학물질에 의해 유발되는 피부감작성의 경우 저분자 감작성물질과 단백질 간의 합텐화 과정인 첫 번째 주요반응(key event)을 모사할 수 있는 시험법의 개발이 주목을 받아왔다(Gerberick et al., 2007a; 2007b). 즉, 피부감작성동물이나 포유동물의 세포배양이 필요하지 않은 직접 펩타이드 반응성 분석법(DPRA)은 세포배양이나 동물을 사용하여 주요반응 2 - 4를 모사한 기타 피부감작성시험들과 비교하여 현재 사용 가능한 가장 간단한 방법 중 하나이다(Dimitrov et al., 2016). 이 시험에서는, 피부감작 초기 단계인 합텐화 과정을 모방하여, 리신 및 시스테인이 함유된 헵타-펩타이드와 시험물질의 화학적 반응성을 평가한다. 하지만 인공적으로 합성한 헵타-펩타이드 2종과 고가의 HPLC를 이용한 분석과정이 반드시 필요한 단점이 있다 (Gerberick et al., 2004; 2009; Urbisch et al., 2016). 또한, 시험법의 예측력은 세포배양을 이용한 다른 방법들에 비해 상대적으로 낮았다. 신물질 개발과정에서 피부감작 가능성을 가진 다양한 화합물을 대상으로 신속하고 간단하게 조기 선별을 하기 위해서는 예측력을 유지하면서 기존의 시험법보다 더욱 단순하고 경제적인 시험법이 필요하다.

합텐 형성 단계에서 결합 단백질에 존재하는 리신 및 시스테인 잔기가 피부감작성 물질과 결합하는 수용체인 것으로 알려져 있으며, 화학적인 반응성의 정도가 DPRA를 통한 피부감작성 시험의 주요 근거이다(Gerberick et al., 2009). 따라서, 반응성이 큰 감작성 물질의 경우 합텐 형성이 일어나는 단백질 외에 세포 내 아미노 또는 치올기를 가진 저분자량의 방어 물질 등과도 상호작용할 수 있다고 예상할 수 있다. 이러한 관점에서 시스테인(cysteamine)은 피부감작성 반응과는 무관할지라도 감작성 물질이 존재할 때 상호작용할 수 있는 훌륭한 후보물질이 될 수 있을 것이다. 사실 시스테인은 인체에 풍부하게 존재하는 물질로, 산화-환원 전위의 조절 기능 뿐 아니라, 시스테인 구조는 단백질, 탄수화물, 지질대사 등 각종 생화학 반응에 사용되는 코엔자임 A에도 존재한다. 즉, 반응성 작용기는 친핵성을 보일 뿐만 아니라, 친전자성 물질과 잘 반응하는 것으로 증명되었는 바(Lepoittevin and Benezra, 1991; Ahlfors et al., 2003), 본 연구에 앞서 시스테인과 글루타치온과 같은 내인성 저분자 물질과 30여종의 시험물질을 이용한 본 연구진의 연구에서는 dapsyl chloride와의 유도체 생성을 HPLC 방법으로 평가한 경우 100%의 민감도와 82%의 특이도 및 93%의 정확도를 보이는 것이

확인되어 시스테인을 이용한 좀더 간편한 시험법을 개발할 수 있을 것으로 판단되었다 (Nepal et al., 2018).

따라서, 본 연구에서는 좀더 많은 연구실에서 시험이 가능하도록 고가의 HPLC 대신에 분광광도계를 사용할 수 있는 시험이 가능한지를 본 연구에서 살펴보고자 하였다. 또한 시험 플랫폼은 시험관이 아닌 96-well plate를 적용하여 시간과 시험물질 사용량을 줄여보고자 하였다. 시스테인의 피부감작성 물질 검출 가능성을 확인하기 위하여 각종 실험조건을 최적화한 다음 11종의 시험물질 (감작성 물질 8종과 비감작성 물질 3종)을 대상으로 평가해보았다.

Materials and Methods

1. 재료

시험물질로 사용한 화합물은 Table 1에 나타내었다. 시스테인(98%, CAS No. 60-23-1)과 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, 98%, CAS No. 69-78-3)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다. 다음의 화합물은 Duksan Pure Chemicals (서울, 한국)에서 구입하였다: glacial acetic acid (99%, CAS No. 64-19-7); potassium phosphate monobasic (99%, CAS No. 7778-77-0); potassium phosphate dibasic (98%, CAS No. 7758-11-4). Acetonitrile (CAS No. 75-05-8)은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, 미국)에서, sodium acetate trihydrate (99%, CAS No. 6131-90-4)는 Tokyo Chemical Industry(동경, 일본)에서 각각 구입하였다. 각 화합물은 별도의 정제과정 없이 그대로 실험에 사용하였다.

2. 시스테인과 DTNB 간의 반응 최적화: 농도 및 반응시간

시스테인을 0.1 M sodium acetate 완충용액(pH 4.0)에 녹여 0-1500 mM을 제조한 다음 100 mL를 취하여 감작성 또는 비감작성 물질의 용매인 acetonitrile 50 mL와 혼합하고, 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 7.4)에 제조한 DTNB(100-500 mM) 50 mL를 가하여 반응을 유도하였다. 이후 실온에서 20 분이 지난 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시스테인과 DTNB 간의 반응시간을 최적화하기 위해

Table 1. Information on tested chemicals

No.	Chemical name	CAS No.	Chemical supplier	Purity (%)	Physical state	Solvent used	EC3 value	In vivo category (LLNA)
1	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Sigma-Aldrich	97	Solid	Acetonitrile	0.08	Extreme
2	p-Benzoquinone	106-51-4	Sigma-Aldrich	> 98	Solid	Acetonitrile	0.01	Extreme
3	p-Hydroquinone	123-31-9	Sigma-Aldrich	-	Solid	Acetonitrile	0.11	Strong
4	Glutaraldehyde	111-30-8	Alfa Aesar	50	Liquid	Acetonitrile	0.20	Strong
5	Cinnamaldehyde	105-55-2	Sigma-Aldrich	95	Liquid	Acetonitrile	2.00	Moderate
6	Citral	5392-40-5	Sigma-Aldrich	95	Liquid	Acetonitrile	5.70	Moderate
7	Diethyl maleate	141-05-9	Sigma-Aldrich	97	Liquid	Acetonitrile	2.10	Moderate
8	2,3-Butanedione	431-03-8	Sigma-Aldrich	-	Liquid	Acetonitrile	11.00	Weak
9	Lactic acid	50-21-5	Sigma-Aldrich	85	Liquid	Acetonitrile	NC	Non-sensitizer
10	Isopropanol	67-63-0	Sigma-Aldrich	-	Liquid	Acetonitrile	NC	Non-sensitizer
11	Methyl salicylate	119-36-8	TCI	99	Liquid	Acetonitrile	NC	Non-sensitizer

CAS No., Chemical Abstracts Service Number; NC, not calculated.
-, purity not specified by suppliers.

여, 600 mM 시스테아민 100 mL와 acetonitrile 50 mL 및 500 mM DTNB 50 mL를 혼합한 뒤 실온 조건에서 10 분 간격으로 1 시간 동안 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 시스테아민의 안정성 평가: 시간, 용매, pH 및 온도 의존성

pH에 따른 시스테아민의 안정성을 평가하기 위하여 0.1 M sodium acetate 완충용액(pH 4.0), 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0) 그리고 0.1 M ammonium acetate 완충용액 (pH 10.0) 등 3종의 완충용액을 준비한 다음, 각각에 600 mM 시스테아민 100 mL와 용매로 사용한 acetonitrile 또는 dimethyl sulfoxide (DMSO) 50 mL를 혼합하고, 0, 3, 6, 18, 24 시간 동안 냉장 조건 (4°C)과 실온 조건 (25°C)으로 시료를 구분하여 일정시간 보관하였으며, 특정 시간에 0.1 M potassium phosphate 완충용액에 녹인 500 mM의 DTNB 50 mL를 혼합하여 20 분 간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시간에 따른 용액의 용적 감소를 최소화하기 위해 밀봉용 접착 테이프와 파라필름으로 96-well plate를 외기로부터 차단하였다.

4. 시스테아민과 시험물질의 반응농도 및 반응시간의 최적화

시험물질과 시스테아민의 반응 농도비를 최적화하기 위하여 0.1 M sodium acetate 완충액 (pH 4.0)에 녹

인 600 mM 시스테아민 100 mL와 대표적인 감작성 물질인 cinnam aldehyde와 비감작성 물질인 methyl salicylate를 각각 acetonitrile에 녹여 32 mM (1:30) 또는 72 mM (1:60)로 혼합한 용액 50 mL씩을 96-well plate에서 3, 6, 18 및 24 시간 동안 반응 시킨 뒤, 0.1 M potassium phosphate 완충액에 녹인 500 mM DTNB 50 mL를 가하여 20 분 후에 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시간에 따른 용액의 용적 감소를 최소화하기 위해 밀봉용 접착 테이프와 파라필름으로 96-well plate를 외기로부터 차단하였다.

5. 본실험

Fig. 1에 제시된 최적화된 조건 하에서 11종의 시험물질을 대상으로 본실험을 진행하였다. Sodium acetate 완충액 (0.1 M)에 녹인 600 mM 시스테아민 100 mL를 먼저 각 well에 분주하고, 각 시험물질을 acetonitrile에 녹여 32 mM (1:30) 및 72 mM (1:60)로 제조한 용액을 50 mL씩 분주하고 24 시간 동안 반응 시킨 다음, 500 mM DTNB 50 mL를 가하여 20 분 간 반응시킨 후에 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시스테아민의 감소정도를 Fig. 1에 제시된 방법에 준하여 계산하여 결과를 나타내었다. 한편, 시스테아민과 시험물질의 반응을 비롯한 모든 시험은 96-well plate에서 진행하였으며, 휘발 또는 증발로 인해 반응액의 용적이 반응시간 동안 줄어드는 문제를 해소하기 위하여 반응 시에는 각 well을 밀봉할 수 있는 접착 테이프와 파라필름을 사용하였다.

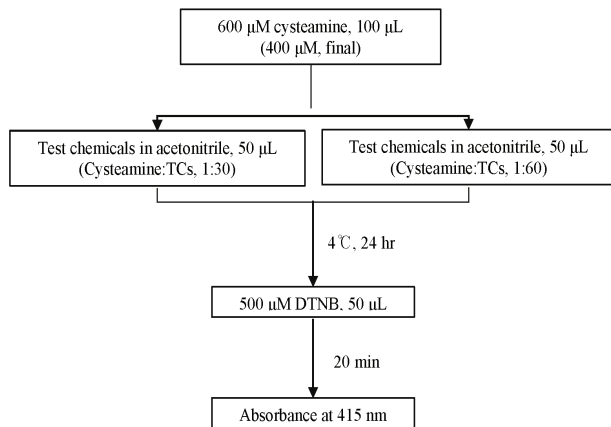


Fig 1. Experimental steps for testing reactivity of cysteamine with test chemicals

6. 결과의 처리

시험물질에 의한 시스테인의 고갈 정도는 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 시험물질의 처리 없이 시스테인과 용매만을 반응시킨 다음 DTNB를 반응시켜 얻은 415 nm에서의 흡광도를 기준으로 시험물질과 반응시켜 얻은 흡광도의 비율로 산출하였다. 예비실험과 본 실험의 결과는 평균 시스테인의 고갈 정도(%) ± 표준편차로 표시하였다. 한편, 고갈 정도가 0% 이하인 경우 0%로 표시하였다.

Results

시스테인을 피부감작성 물질과의 반응성을 통해 시험법으로 사용하기 위해서는 시스테인을 정량적으로 검출할 수 있는 방법이 필요하였다. 시스테인의 검출을 위해 몇 가지 치올기 검출시약들인 2,4-dinitrofluorobenzene, dabsyl chloride 및 DTNB에 대한 예비시험을 실시하였고, 그 중 DTNB가 가장 효율적이었다(결과는 보이지 않았음). 생성되는 시스테인-DTNB 복합체가 개별 물질과는 명확히 구분되어야 하기 때문에 350 nm에서 550 nm까지의 파장에서 흡광도를 측정할 결과 시스테인-DTNB 복합체는 415 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타냄이 관찰되었다(Fig. 2.). 반면, DTNB 단독 용액은 325 nm 부근에서 최대 흡광도를 보였고, 시스테인 자체는 시험한 파장 범위에서 유의미한 흡광도를 나타내지 않았다. 만일 DTNB 농도를 너무 높이면 시스테인-DTNB 복합체가 보이는 415 nm에서의 피크에 간섭이 있을 수도 있어 각 물질의 농도를 최적화하는 작업이 필요하였다. 먼저 DTNB와의 반응의 특성을 살펴 보았다. 시스

테인과 DTNB의 최적 반응농도를 찾기 위하여 여러 조건의 농도에서 반응성을 실험한 결과, 시스테인은 DTNB와의 반응 전에 시험물질의 용매로 사용할 acetonitrile을 포함하여 400 mM로 최종농도를 설정하였고, 정해진 반응시간이 지난 뒤 500 mM의 DTNB를 혼합하고 20분 후 415 nm에서 흡광도를 측정하는 조건이 가장 적절하였다. 위 용액의 반응비는 총 200 mL 기준으로 2:1:1이 적절하였으며, 그 결과 시스테인의 농도가 증가함에 따라 415 nm에서의 흡광도가 증가하는 결과를 얻었다(Fig. 3.). 또한 시스테인과 DTNB의 반응시간은 10 분부터 포화 양상을 보였고, 1 시간 동안 유지되었다. 따라서, 반응의 안정성을 고려하여 20 분 동안 반응을 시키기로 결정하였다(Fig. 4).

농도 최적화 실험에 이어서 각 물질을 용액으로 만든 상태에서의 안정성을 판단하기 위해, 반응시간, 시스테인 용액의 pH, 시험물질을 녹일 용매 및 시험물질과 시스테인의 반응에 적용할 온도 등의 조건변화에 따른 반응의 안정성을 평가해 보았다(Fig. 5). 시스테인을 sodium acetate 완충액(pH 4.0)에 녹여 냉장과 실온의 두 가지 조건으로 나눠서 보관한 다음, 일정 시간 뒤에 새로 제조한 DTNB와 20 분간 반응시키고 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 우선 pH의 경우 어떠한 조건이더라도 산성 조건(pH 4.0)이 가장 안정성이 좋았고, 염기 조건(pH 10.0)에서는 시간이 지날수록 시스테인의 안정성이 감소되었다. 중성 조건(pH 7.0)에서는 시스테인-DTNB 복합체가 검출되지 않았다. 온도조건의 경우 용매 후보인 acetonitrile을 사용한 경우 산성 조건에서는 온도와 무관하게 24 시간 동안 시스테인의 안정성이 유지되는 경향을 보였고, 염기 조건에서는 시간이 지날수록 감소하였으며, 실온 조건에서는 감소의 폭이 더욱 컸다. 반면 용매 후보인 DMSO를 사용한 경우 모든 pH 조건에서 시간이 지날수록 시스테인의 안정성이 감소했으나, 냉장조건에서는 비슷하게 감소하는 반면 실온조건에서는 더 크게 안정성이 감소하는 결과를 보여 주었다. 위의 결과를 토대로 시스테인의 반응성을 평가하기 위한 최적 조건은 i) 시스테인을 sodium acetate 완충액(pH 4.0)에 녹이고, ii) 시험물질의 용매는 acetonitrile을 사용하며, iii) 냉장조건 또는 실온조건에서 시스테인을 시험물질과 반응시키는 것이 가장 적절한 것으로 판단되었다(Fig. 5). 실제 본 실험에서는 시스테인 자체가 냉장보관 시약이므로 냉장조건에서 실험을 진행하기로 결정하였다.

다음에는 시스테인과 시험물질 간 최적의 반응비를 결정하기 위하여 감작성 물질인 cinnam aldehyde

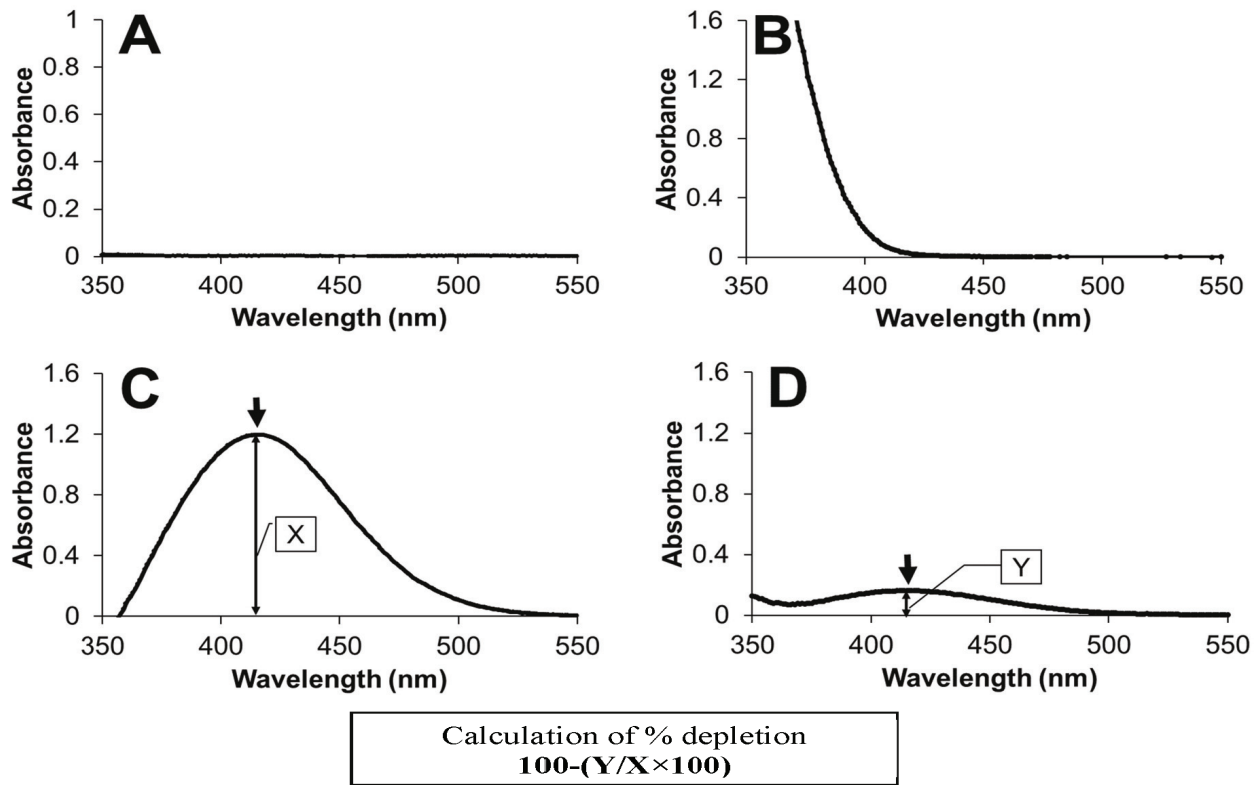


Fig 2. Detection of cysteamine complex with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). (A) Absorption spectra of cysteamine. At 400 μM prepared in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0. (B) Absorption spectra of DTNB at 500 μM prepared in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4. (C) Absorption spectra of cysteamine-DTNB complex following 20 min incubation. (D) Depletion of cysteamine by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) at 72 mM. The percent depletion of cysteamine by a test chemical was calculated by following formula: $100-(Y/X \times 100)$, where X is the absorbance at 415 nm for control without test chemical but acetonitrile, a vehicle, and Y is the absorbance at 415 nm for test chemical

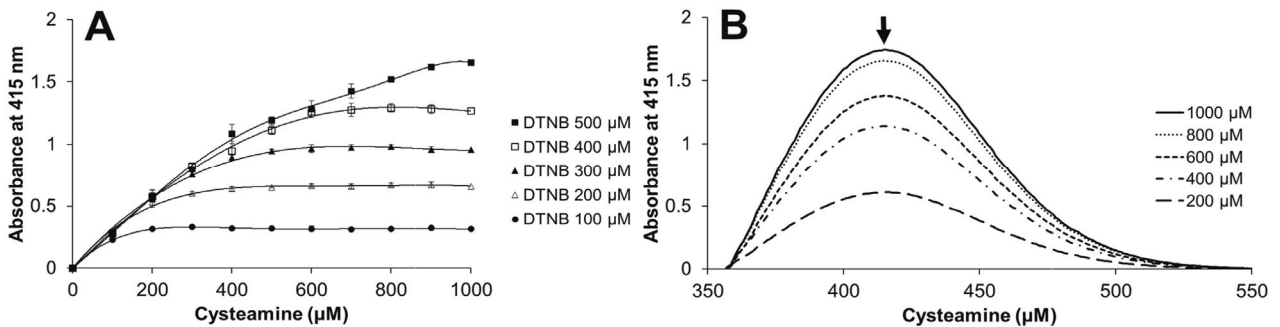


Fig. 3. Reactivity of cysteamine with DTNB. (A) Reactivity of cysteamine with various concentrations of DTNB. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate determinations. (B) Concentration dependency of cysteamine with 500 μM DTNB

와 비감작성 물질인 methyl salicylate를 사용하여 살펴보았다(Fig. 6). Cinnam aldehyde와 치올기와의 반응성은 이미 보고된 바가 있어 본실험 전에 반응조건의 최적화 연구에 사용하였다(Autelitano et al., 2017). 시스테아민:시험물질을 1:30과 1:60의 두 가지 조건에서 반응시간을 달리하여 24 시간까지 실험한

결과, 두 조건 모두 감작성 물질과 비감작성 물질 간의 차이가 뚜렷하였으며, 반응 시간이 지날수록 반응 정도의 차이를 볼 수 있었고, 반응시간을 18 및 24 시간으로 하는 경우 감작성 물질과 비감작성 물질이 잘 구분이 되었지만, 실험자의 편의를 위해 24 시간의 반응시간을 최종 조건으로 결정하였다.

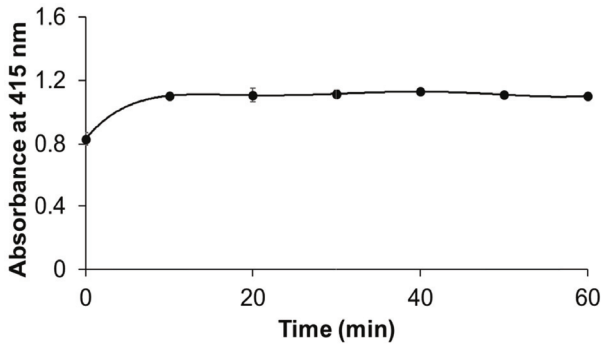


Fig. 4. Optimization of reaction time for cysteamine with DTNB. Cysteamine at 400 μ M was reacted with 500 μ M DTNB at room temperature. Each value represents the mean \pm S.D. of six determinations.

다음에는 시스테아민과 시험물질 간 최적의 반응비를 결정하기 위하여 감작성 물질인 cinnam aldehyde와 비감작성 물질인 methyl salicylate를 사용하여 살펴보았다(Fig. 6). Cinnam aldehyde와 치올기와의 반응성은 이미 보고된 바가 있어 본실험 전에 반응조건의 최적화 연구에 사용하였다(Autelitano et al., 2017). 시스테아민:시험물질을 1:30과 1:60의 두 가지

조건에서 반응시간을 달리하여 24 시간까지 실험한 결과, 두 조건 모두 감작성 물질과 비감작성 물질 간의 차이가 뚜렷하였으며, 반응 시간이 지날수록 반응 정도의 차이를 볼 수 있었고, 반응시간을 18 및 24 시간으로 하는 경우 감작성 물질과 비감작성 물질이 잘 구분이 되었지만, 실험자의 편의를 위해 24 시간의 반응시간을 최종 조건으로 결정하였다.

최적화 과정을 모두 진행한 다음 11종의 피부감작성 및 비감작성 물질을 선정하여 본실험을 진행하였는데, 시험물질은 LLNA 시험결과를 바탕으로 extreme 2종, strong 2종, moderate 3종, weak 1종, 및 non-sensitizer 3종을 사용하였다. 모든 시험물질은 acetonitrile을 용매로 사용하였고, 시스테아민과 시험물질의 반응비는 1:30과 1:60의 두 조건으로 진행하였고, 반응은 24 시간 동안 진행하였다. 그 결과, Fig. 7에 나타낸 바와 같이, 모든 비감작성 물질 3종은 시스테아민과의 반응성이 매우 약함을 알 수 있었고, 대부분의 감작성 물질은 비감작성 물질과 상당한 차이를 보이며 시스테아민과 반응함을 알 수 있었다. 그러나, p-hydroquinone과 diethyl malate는 차이는 있지만 비감작성 물질과의 구분이 쉽지 않은 결과를 보여 주었다.

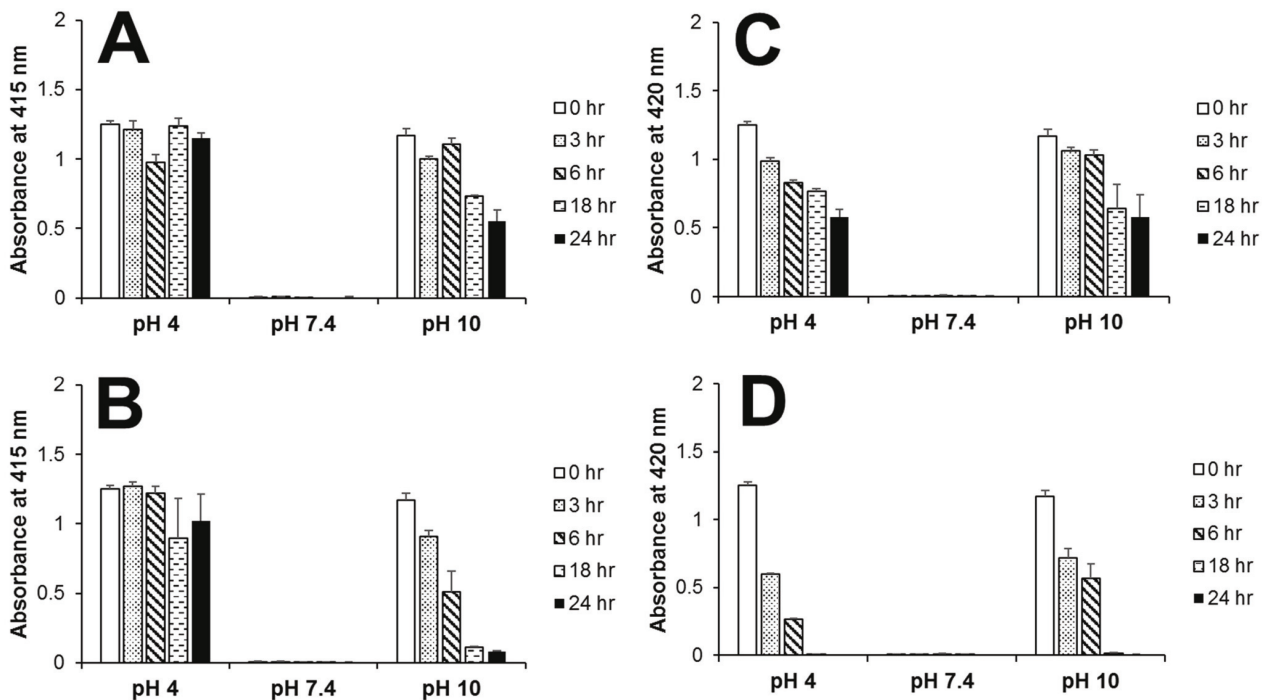


Fig. 5. Optimization of vehicle solvents and reaction temperatures in 3 different pHs of reaction mixtures. Cysteamine at 600 mM was incubated with either acetonitrile or DMSO for the given times and temperatures in 3 pH conditions. And then, 500 mM DTNB was incubated at room temperature for 20 min. (A) Incubation of cysteamine with acetonitrile at 4°C. (B) Incubation of cysteamine with acetonitrile at 25°C. (C) Incubation of cysteamine with DMSO at 4°C. (D) Incubation of cysteamine with DMSO at 25°C. Each bar represents the mean + S.D. of triplicate determinations.

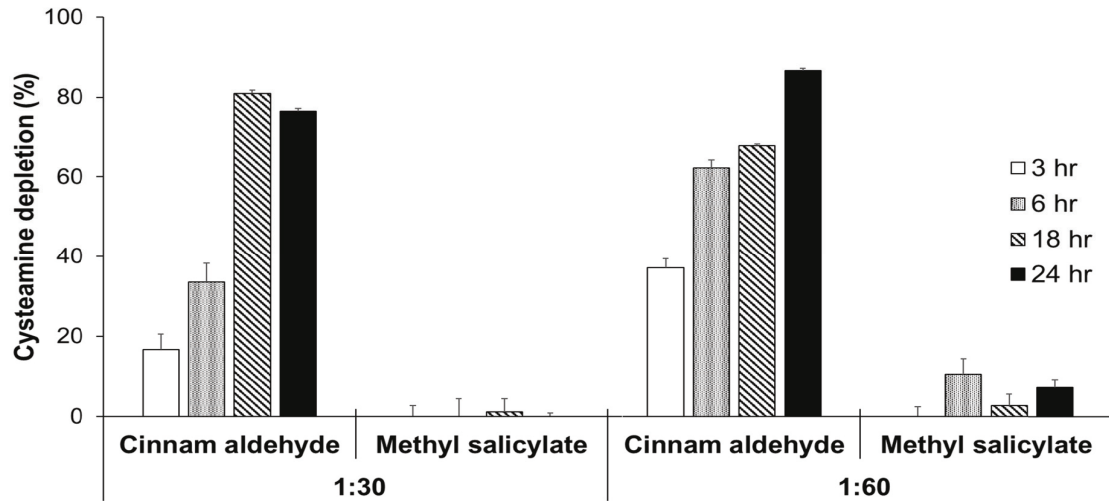


Fig. 6. Optimization of concentration and time for the reaction of 2 test chemicals with cysteamine. Cysteamine at 600 μM was incubated with 32 mM (1:30) and 72 mM (1:60) of test chemicals up to 24 hr at 4°C. Each bar represents the mean percent of cysteamine depletion + S.D. of triplicate determinations. The percent depletion < 0 was regarded as 0.

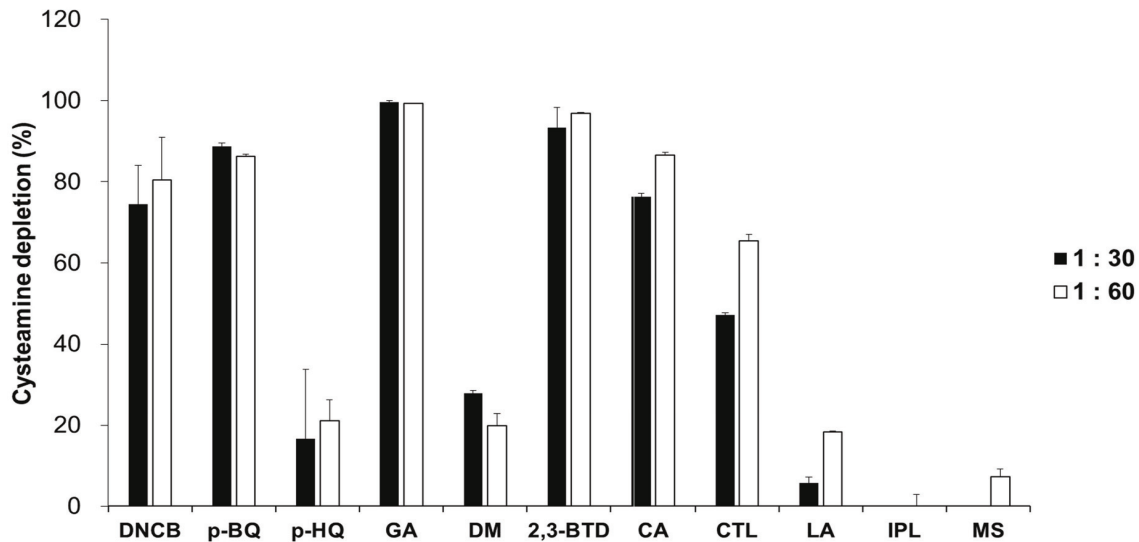


Fig. 7. Depletion of cysteamine by 11 test chemicals. Cysteamine at 600 μM was incubated with 30-fold and 60-fold of test chemicals for 24 hr at 4°C. And then, the reactant was incubated with 500 μM DTNB for 20 min at 25°C, followed by UV absorption at 415 nm. The percent depletion of cysteamine by a test chemical was calculated as mentioned in Fig. 1. Each bar represents the mean percent of cysteamine depletion + S.D. of six determinations. The percent depletion < 0 was regarded as 0. DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; p-BQ, p-benzoquinone; p-HQ, p-hydroquinone; GA, glutaraldehyde; DM, diethyl maleate; 2,3-BTD, 2,3-butanedione; CA, cinnamaldehyde; CTL, citral; LA, lactic acid; IPA, isopropyl alcohol; MS, methyl salicylate.

Discussion

본 연구는 실험동물과 동물세포 배양을 사용하지 않는 조건에서 피부 감작성 물질을 구별하기 위한 기존의 시험법들 보다 더욱 간편하고 경제적인 방법을 개발하기 위해 수행하였다. 즉, 다수의 후보물질에 대하여 신속하게 다음 연구를 진행할 지에 대한 스크리닝

개념의 시험법으로 활용할 수 있는 시험법의 개발이 1차적인 목표이었다. 친핵성 펩타이드에 대한 화학물질의 반응성을 측정함으로써 화학물질이 유발하는 피부 감작성 유발의 가능성을 평가할 수 있는 것은 저분자 감작성물질의 합텐화 과정이 존재하기 때문이다 (Gerberick et al., 2004). 시스테아민은 내인성의 저분자 물질이지만, 단백질 또는 glutathione과 같이 -

SH 기를 가지고 있어 반응성이 높은 감작성 물질과 쉽게 반응할 수 있을 것이라는 가정이 가능하였는 바 (Nepal et al., 2018), 본 연구의 결과를 살펴 보면, 어느 정도 이 가정이 사실임을 알 수 있었다. 즉, 시스테아민은 DTNB와 결합 시 415 nm에서 흡수 극대를 보여 시험물질의 흡광도와 구별이 되었을 뿐 아니라, 정량적으로 반응하여 시험물질에 의한 시스테아민의 고갈 정도를 분광광도법으로 정량할 수 있음을 알 수 있었고, 반응생성물의 안정성도 1시간까지 확보되었다(Fig. 2 - Fig. 4). 이와 관련하여 최근 DPRA의 변법으로 HPLC 사용없이 시스테인 함유 헵타펩타이드의 시스테인 잔기를 본 연구에 사용한 DTNB와 반응시킨 연구에서도 정량성이 인정된 바 있다 (Cho et al., 2019). 또한, 여러 반응 조건에 대한 최적화 과정을 통하여, 시스테아민은 산성의 냉장 조건에서 acetonitrile을 용매로 사용할 때 가장 안정하였고 (Fig. 5), 시스테아민:시험물질의 비는 1:30과 1:60에서 24 시간 반응 시 모두 비감작 물질과 뚜렷한 차이를 보여주었다(Fig. 6). 시험물질과의 농도비는 기존 문헌을 참고하여 선정하였으며, 시험물질의 사용을 최소화하기 위하여 추후 좀더 농도비에 대한 최적화 연구를 수행할 예정이다(Nepal et al., 2018). 산성 조건에서 시스테아민과 시험물질의 반응성이 가장 좋게 나타난 것은 일반적인 피부감작성 물질의 노출과는 차이가 있는 상황으로 보이며, 피부 노출 시와 유사한 시험조건을 찾기 위한 최적화 과정이 더 필요한 것으로 판단되었다.

본 실험에서는 총 8종의 감작성 물질과 3종의 비감작성 물질을 대상으로 시스테아민의 고갈 정도를 평가하였다. 그 결과, 모든 감작성 물질이 비감작성 물질과 비교하였을 때 시스테아민의 고갈 정도가 더 큰 결과를 보여주었으나, 상대적으로 p-hydroquinone과 diethyl maleate는 시스테아민의 고갈 정도가 적어 이에 대한 추가적인 최적화 과정도 필요함을 알 수 있었다. 특히, p-hydroquinone의 경우, 자체는 반응성이 적고 대사 후 반응성이 커지는 pro-hapten에 해당하여 본 시험계에 대사활성화계를 접목한 시험법으로서의 개선이 필요할 것으로 판단되었다. 실제로, 감작성 물질의 약 25% 정도는 감작성 유발 시 대사과정이 요구되는 물질인 것으로 보고되어 있어, 예측력을 높이기 위해서는 이들 물질의 검출을 위한 대사활성화계와의 접목이 필요한 것으로 판단되었다(Nepal et al., 2019; Patlewicz et al., 2016).

본 연구의 진행 초기에는 시험관에서 각각의 반응을 진행하였는데, 시약의 사용량도 많고, 반응 종말에 대

한 과정이 없어 흡광도를 측정하는 동안 처음 시험관과 마지막 시험관 간의 측정 시간 차이가 있어 결과에 영향을 줄 수 있는 문제점이 있었다. 따라서 실험방법을 개선하여 96-well plate에서 반응을 진행함으로써 실험 과정을 좀더 단순화시키고자 하였으며, 필요한 시험물질의 양도 감소시킬 수 있었다. 또한 96-well plate를 사용함으로써 동시에 흡광도를 측정하게 되어 반응 시간차에 의한 영향을 최소화할 수 있었다. 96 well plate를 사용하면서 반응액의 용적이 매우 적은 가운데 24 시간 동안 반응을 시키게 되므로 용액의 증발 또는 휘발 가능성이 있어 밀봉용 테이프를 변수를 반드시 사용해야 하며, 밀봉이 되지 않으면 용액의 흡광도를 측정하기 때문에 결과에 오차를 유발할 수 있는 단점이 있었다. 부피의 변화는 주로 96-well plate의 가장자리에 배열된 곳에서 발생하였는데, 이는 파라필름으로 가장자리를 밀봉함으로써 차단할 수 있었다 (결과는 보이지 않았음).

본 시험의 또 다른 단점으로 시험물질의 용해도를 들 수 있다. 대부분의 시험물질은 acetonitrile에 녹았으나 sodium acetate 완충액에 녹인 시스테아민과의 반응 중에 용액 자체가 혼탁해지는 현상이 보였고, 이때 흡광도 측정에 문제가 생기므로 결과에 영향을 줄 수 있다. 따라서, 시험물질 자체가 415 nm에서 흡광하는 물질이나 혼탁 현상을 보이는 물질의 경우 감작성 판단이 어려운 한계를 보였다.

향후 추가적인 최적화 연구와 다수의 시험물질에 대한 평가를 통해 본 시험법의 예측력을 확인하고 검증 연구도 진행되어야 하지만, 성공적으로 시험법으로서의 가능성을 입증하게 된다면 본 시험법은 실험동물의 사용이나 동물세포 배양을 완전히 배제할 수 있을 뿐 아니라 기존의 합텐 형성과정을 모방하는 DPRA 시험과 비교하여 HPLC 분석 대신 UV 분광계로 분석이 가능하고, 사용 시약의 양을 절감하며, 합성 펩타이드 대신 시스테아민을 사용함으로써 경제적인 장점도 있고, 96-well plate를 사용하므로 1회에 여러 시험물질에 대한 평가도 가능해지므로 지금까지 개발된 피부감작성 시험 중 가장 간편하고 경제적인 시험이 될 수 있다고 판단되며, 다수의 물질에 대하여 스크리닝 단계에서 피부감작성 여부를 판단할 때 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단의 지원을 받아 진행되었기에 감사드립니다 (과제번호2017RIDIA3B033313).

References

- Ahlfors SR, Sterner O and Hansson C. (2003). Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues in a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacology and Physiology* 16: 59-68.
- Anderson SE, Siegel PD and Meade BJ. (2011). The LLNA: A brief review of recent advances and limitations. *Journal of Allergy* 2011: 1-10.
- Autelitano A, Minassi A, Pagani A, Tagliatalata-Scafati O, and Appendino G. (2017). The reaction of cinnamaldehyde and cinnam(o)yl derivatives with thiols. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 7: 523-526.
- Basketter DA, Blaikie L, Dearman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR, and Rycroft RJG. (2000). Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42: 344-348.
- Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Dearman RJ and Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *Journal of Applied Toxicology* 19: 261-266.
- Basketter DA and Scholes EW. (1992). Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food and Chemical Toxicology* 30: 65-69.
- Cho SA, An S, and Park JH. (2019). High-throughput screening (HTS)-based spectrophotometric direct peptide reactivity assay (Spectro-DPRA) to predict human skin sensitization potential. *Toxicology Letters* 314: 27-36.
- Cockshott A, Evans P, Ryan CA, Gerberick GF, Betts CJ, Dearman RJ, Kimber I, and Basketter DA. (2006). The local lymph node assay in practice: a current regulatory perspective. *Human & Experimental Toxicology* 25: 387-394.
- Dimitrov S, Detroyer A, Piroird C, Gomes C, Eilstein J, Pauloin T, Kuseva C, Ivanova H, Popova I, Karakolev Y, Ringeissen S, and Mekenyan O. (2016). 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. *Journal of Applied Toxicology* 36: 1568-1578.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, and Lepoittevin JP. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81: 332-343.
- Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ, and Kimber I. (2007a). Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods* 41: 54-60.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, and Lepoittevin JP. (2007b). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97: 417-427.
- Gerberick GF, Troutman JA, Foertsch LM, Vassallo JD, Quijano M, Dobson RL, Goebel C, and Lepoittevin JP. (2009). Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicological Sciences* 112(1): 164-174.
- Jowsey IR, Basketter DA, Westmoreland C, and Kimber I. (2006). A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal. *Journal of Applied Toxicology* 26: 341-350.
- Kimber I, Dearman RJ, Basketter DA, Ryan CA, and Gerberick GF. (2002). The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis* 47: 315-328.
- Kimber I, Cumberbatch M, Dearman RJ, Bhushan M, and Griffiths CEM. (2000). Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization. *British Journal of Dermatology* 142: 401-412.
- Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Lea LJ, House RV, Ladics GS, Loveless SE, and Hastings KL. (2010). Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 53: 563-579.
- Lepoittevin JP and Benezra C. (1991). Allergic contact dermatitis caused by naturally occurring quinones. *Pharmaceutisch Weekblad* 13(3): 119-122.
- Nepal MR, Kang MJ, Kim GH, Cha DH, Nam DH, Jeong TC. (2019). Identification of pre- and pro-haptens with a β -galactosidase-expressing *E. coli* cell culture system for skin sensitization. *Toxicology Letters* 305: 81-93.
- Nepal MR, Shakya R, Kang MJ, Jeong TC. (2018) A simple *in chemico* method for testing skin sensitizing potential of chemicals using small endogenous molecules. *Toxicology Letters* 289: 75-85.
- Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin JP, Worth AP, Aschberger K. (2016). Can currently available non-animal methods detect pre- and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 82: 147-155.
- Ryan CA, Hulette BC and Gerberick GF. (2001). Approaches for the development of cell-based *in vitro* methods for contact sensitization. *Toxicology in Vitro* 15: 43-55.
- Ryan CA, Gerberick GF, Gildea LA, Hulette BC, Betts CJ, Cumberbatch M, Dearman RJ, and Kimber I. (2005). Interactions of contact allergens with dendritic cells: Opportunities and challenges for the development of novel approaches to hazard assessment. *Toxicological Sciences* 88: 4-11.
- Urbisch D, Honarvar N, Kolle SN, Mehling A, Ramirez T, Teubner W, and Landsiedel R. (2016). Peptide reactivity associated with skin sensitization: The QSAR Toolbox and TIMES compared to the DPRA. *Toxicology in Vitro* 34: 194-203.