



화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 가이드라인

In vitro 피부감작성시험법, EpiSensA

2025. 6.



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원



KoCVAM
Korean Center for the
Validation of Alternative Methods

한국동물대체시험법검증센터

이 안내서는 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법(*In vitro* 피부감작성시험법, EpiSensA)에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2025년 6월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ ‘민원인 안내서’란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 비임상자원연구과 및 한국동물대체시험법검증센터(KoCVAM)에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5506, 5502

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1431-01	2025. 6.	화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (<i>In vitro</i> 피부감작성시험법, EpiSensA) 가이드라인(민원인 안내서) 제정

목 차

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(*In vitro* 피부감작성시험법, EpiSensA)
가이드라인(민원인 안내서)



I. 요약문	1
1. 개요	1
2. 시험원리	1
3. 제한점 및 고려사항	2
4. 시험방법	3
5. 인정기준	7
6. 예측모델	8
7. 시험보고서	10
 II. 번역문	 11
1. 서론	11
2. 부록 IC	25
 III. 원문	 48
1. 서론	48
2. 부록 IC	56

I

요약문

1 ▶ 개요

본 시험법은 시험물질에 노출된 인체피부모델(Reconstructed human epidermis, RhE) 내의 각질세포 활성화(Keratinocyte activation)와 관련된 마커유전자[활성전사인자 3(Activating transcription factor 3, *ATF3*), 인터루킨-8(Interleukin-8, *IL-8*), 글루타메이트-시스테인 리가아제 변형 소단위체(Glutamate-cysteine ligase modifier subunit, *GCLM*) 및 DnaJ(Hsp40) 상동체 서브패밀리 B(DnaJ homolog subfamily B, *DNAJB4*) 발현의 변화를 정량하여 피부감작성물질과 비감작성물질을 구별하는 피부감작성시험법(Epidermal Sensitisation Assay, EpiSensA)이다.

본 시험법을 정기적으로 사용하는 실험실은 시험가이드라인에서 제시된 10개의 숙련도물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고, 시험의 모든 결과는 시험가이드라인에서 제시하고 있는 인정기준 모두를 만족시켜야만 유효한 것으로 인정된다.

2 ▶ 시험원리

본 시험법은 피부감작성 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 두 번째 핵심단계(Key event 2, KE 2)인 각질세포 활성화에 대한 기전을 다루는 생체외(*in vitro*) 피부감작성시험법이다. 피부감작성물질에 의한 주요 각질세포 반응으로는 염증반응 및 세포보호 유전자 경로(Cytoprotective gene pathways)의 유도이다. 피부감작성물질은 *ATF3* 및 *IL-8* 유전자의 발현을 증가시켜 각질세포에서 염증반응을 일으키며, *GCLM* 및 *DNAJB4* 유전자의 발현을 증가시켜 세포보호 유전자 경로의 유도를 일으킨다.

네 가지 마커유전자 발현의 상대적 변화는 시험물질에 6시간 동안 노출된 후 Reverse Transcription-quantitative PCR(RT-qPCR)를 이용하여 정량한다. 시험결과는 각 유전자의 최대 유도배수의 평균(The mean maximum fold-induction, I_{max}) 값을 통해 양성, 음성 또는 명확한

예측불가(Inconclusive)로 판정된다. 잔존 세포생존율 80 % 이상에서 최소 한 가지 마커유전자의 발현이 각각의 컷오프(Cut-off) 값($ATF3 = 15$ 배, $GCLM = 2$ 배, $DNAJB4 = 2$ 배, $IL-8 = 4$ 배)을 초과하는 경우, 해당 시험물질은 EpiSensA에서 양성으로 간주된다.

3 ▶ 제한점 및 고려사항

각질세포 활성화는 피부감작성 AOP의 여러 핵심단계 중 하나의 단계이기 때문에 화학물질이 가지고 있는 피부감작성에 대한 잠재력(Skin sensitisation potential)을 판정할 수 없다. 본 시험법은 유해성 식별을 목적으로 피부감작성물질과 비감작성물질을 구별하기 위해 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)의 일부로 사용됨에 있어 과학적 타당성이 있는 것으로 확인되었다. IATA 또는 정의된 접근법(Defined Approach, DA)의 맥락에서 다른 시험결과와 함께 종합적으로 고려되거나 정해진 절차에 따라 해석되는 경우에만 유해성 식별의 근거로 사용할 수 있다.

시험물질 노출 기간의 제한으로 인해 충분히 대사되거나 산화되기까지 6시간 이상이 필요한 pro-hapten 또는 pre-hapten은 EpiSensA로 감지되지 않을 수 있다. 또한 RNA 그 자체에 영향을 주거나(예: RNA 분해 유도 등을 통해) RNA 분리 체계를 직접적으로 간섭하는 시험물질은 본 시험법에 적용하지 못할 수 있다. 일부 계면활성제는 $ATF3$ 및 $IL-8$ 유전자의 비특이적 발현으로 인해 위양성 결과가 나올 수 있으며, 증류수(Distilled water)를 부형제로 사용하는 고농도 시험물질(예: 100 % 또는 50 % (w/v))은 높은 삼투압 환경을 유발하여 $ATF3$ 의 비특이적 발현으로 이어질 수 있다. 그러므로 이러한 경우에서 양성결과는 주의를 기울여 해석해야 한다. 그러나 음성결과는 시험물질을 비감작성물질로 식별하기 위해 사용될 수 있다.

시험물질을 AOO(아세톤:올리브오일 4:1), 증류수 또는 50 % EtOH(Ethanol)을 사용하여 용해도 평가했을 때 0.0122 %에서 용해되지 않거나 안정적으로 분산(예: 시험물질이 침전되지 않거나 실온에서 준비한 지 10분 이내에 부형제에서 다른 상(Phase)으로 분리되지 않는 콜로이드(Colloids) 또는 현탁(Suspension) 상태)되지 않는다면 해당 물질은 EpiSensA를 사용한 시험에 적용할 수 없다. 그러나 충분한 과학적 근거를 제공할 수 있는 경우 AOO, 증류수 및 50 % EtOH 이외의 다른 부형제를 사용할 수 있다.

4 ▶ 시험방법

4.1. RhE 모델 준비

EpiSensA는 RhE 모델인 LabCyte EPI-MODEL24 kit(#401124, Japan Tissue Engineering Co., Ltd.)을 사용하여 수행되어야 한다.

4.2. 부형제 선정 및 시험물질 용해도 평가

시험 전에 용해도 평가를 실시하여 적절한 부형제를 선정한다. 각 물질의 용해도는 육안으로 평가하여 확인한다. 첫 번째로 AOO를 부형제로 사용하여 시험물질이 50 %의 농도로 용해되거나 안정적으로 분산되는지 확인한다. 두 번째로는 증류수, 세 번째로는 50 % EtOH을 부형제로 사용하여 시험물질이 용해되거나 안정적으로 분산되는지 확인한다. 시험물질이 어떤 부형제에도 50 %의 농도로 용해되지 않거나 안정적으로 분산되지 않는 경우, 최대 용해농도는 50 %에서 시작하여 0.0122 %까지 2배 간격으로 조제하며 결정해야 한다. 시험물질이 0.0122 %에서 용해되지 않거나 안정적으로 분산되지 않는 경우, 해당 시험물질은 EpiSensA를 사용한 시험에 적용할 수 없다.

적절한 부형제는 시험된 최고농도에서 시험물질이 용해되거나 안정적으로 분산되는 부형제로 정의된다. 결정된 최고농도가 부피 플라스크(Volumetric flask)에서 부피 당 무게(Weight per volume)로 준비될 수 있는지 확인해야 한다. 만약 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도가 0.0488 %, 0.0244 % 또는 0.0122 %로 결정되면, 농도선정 시험은 생략할 수 있으며 본 시험을 수행해야 한다. AOO, 증류수 또는 50 % EtOH 이외의 부형제가 사용되는 경우 해당 부형제 사용의 적절한 과학적 근거가 제공되어야 한다.

4.3. 농도선정 시험

농도선정 시험은 본 시험에서 사용될 시험물질의 농도를 결정하기 위해 각 시험물질 별로 한 번의 시험(Run)이 수행되어야 한다. 세포생존율 80 % 미만인 시험물질의 최저농도를 농도선정 시험에서 결정하여 본 시험에서 최고농도로 사용한다.

4.3.1. 농도선정 시험을 위한 시험물질 및 대조물질의 준비

시험물질은 시험 당일, 최고농도로 적절한 부형제에 용해되거나 안정적으로 분산되도록 준비한다. 최고농도부터 시작하여 0.0122 % 또는 0.0244 %(w/v)의 농도까지 시험물질을 해당하는 부형제에 4배 연속 희석하여 준비한다.

대조군은 다음과 같이 부형제대조군¹⁾, 비처리대조군²⁾ 및 사멸대조군³⁾을 준비한다(표 1 참고). 비처리대조군은 100 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용되며, 사멸대조군은 0 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용된다(4.3.3. 세포독성 측정 참고).

표 1. 농도선정 시험을 위한 대조군 및 대조물질

대조군	처리물질
부형제대조군	시험물질 준비에 사용되는 부형제
비처리대조군	없음
사멸대조군	증류수에 희석된 10 % Triton X-100 용액

4.3.2. 농도선정 시험을 위한 시험물질 및 대조물질의 적용

각 시험물질 농도 및 비처리대조군은 한 개의 RhE 조직이, 사멸대조군은 두 개의 조직이 세포생존율 분석에 사용된다. 시험물질 및 대조물질은 5 μ L, 사멸대조군을 위한 10 % Triton X-100 용액은 10 μ L를 각각의 상피 표면 중앙에 적용하고 5 % CO₂, 37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 배양한다.

4.3.3. 세포독성 측정

세포생존율은 lactate dehydrogenase(LDH) 분석법을 이용하여 배출된 LDH로 생산된 formazan dye의 양을 측정한다. 6시간 시험물질 노출 후 각 샘플에서 채취한 배지 50 μ L를 96 well plate의 각 well에 넣고 동일부피(50 μ L)의 lactate와 tetrazolium salt을 함유한 기질 용액을 각 well에 추가한다. 이후 plate를 차광하여 실온에서 30분간 배양한 다음 각 well에

- 1) 부형제대조군은 시험물질 용액 조제 시 사용된 부형제를 처리한 군을 의미하며 시험물질처리군 및 다른 대조군과 같이 시험
- 2) 비처리대조군은 화학물질을 적용하지 않은 군이며, LDH 분석법 사용 시 100 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용
- 3) 사멸대조군은 세포 대사나 분열 기능은 없지만 장벽기능을 일정 부분 유지하고 있으며 LDH 분석법 사용 시 0 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용

1 mol/L hydrochloric acid(HCl) 25 μ L을 넣어 반응을 종료시킨다. 이후 96 well plate 흡광도 측정기를 사용하여 참고 파장(≥ 600 nm)과 함께 490 nm 또는 492 nm에서 각 well의 흡광도를 측정한다. 490 nm 또는 492 nm에서의 흡광도에서 참고 파장의 흡광도를 빼서 Δ abs.를 계산한다. 흡광도는 HCl 추가 직후(1시간 미만)에 측정되어야 한다. 세포생존율은 아래의 식을 통해 계산할 수 있다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = 100 - \frac{\text{시험물 질처리 군 } \Delta \text{abs.} - \text{비처리 대조군 } \Delta \text{abs.}}{\text{사멸대조군 평균 } \Delta \text{abs.} - \text{비처리 대조군 } \Delta \text{abs.}} \times 100$$

사용하려는 시험물질에 LDH 분석법을 적용할 수 없는 경우 MTT 분석법 또는 ATP 분석법과 같은 세포독성시험법을 사용할 수 있다. 그러나 MTT 분석법이나 ATP 분석법을 사용하는 경우 유전자 발현 분석에 사용되는 조직과 별개로 세포독성 측정에 사용되는 조직이 필요하다.

4.4. 본 시험(유전자 발현 분석)

각 시험물질 별로 예측결과를 얻기 위해 한 번의 시험(Run)이 필요하다.

4.4.1. 본 시험을 위한 시험물질 및 대조물질의 준비

시험물질은 적절한 부형제(AOO, 증류수 또는 50 % EtOH)에 용해되거나 안정적으로 분산되어야 한다. 본 시험에서 최고농도는 농도선정 시험에서 세포생존율 80 % 미만인 최저농도를 사용한다. 농도선정 시험에서 시험된 모든 농도에서 세포생존율이 80 % 이상인 경우 해당 시험물질의 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도를 최고농도로 사용해야 한다. 시험물질 용액(시험용액, Working solution)은 최고농도에서 각 시험물질에 해당하는 부형제로 2배 연속 희석하여 준비한다. 농도선정 시험에서 세포생존율 80 % 미만인 최저농도 또는 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도를 포함한 최소 세 개 농도가 사용되어야 한다. 이러한 조건을 충족하지 않는 시험물질은 한 개 또는 두 개의 농도로 시험될 수 있다[즉, 본 시험에서 최고농도는 0.0122 % 또는 0.0244 %(w/v)이다]. 용해도 확인에서 결정된 농도가 0.0122 % 또는 0.0244 %(w/v)인 경우, 두 개의 농도[0.0122 % 및 0.0244 %(w/v)] 또는 하나의 농도[0.0122 %(w/v)]만이 사용될 수 있다. 마찬가지로, 농도선정 시험에서 세포생존율 80 % 미만인 최저농도가 0.0122 % 또는 0.0244 %(w/v)인 경우 두 개의 농도[0.0122 % 및 0.0244 %(w/v)] 또는 하나의 농도[0.0122 %(w/v)]만이 사용될 수 있다. 이러한 경우 양성반응은 시험물질을 피부감작성물질로 식별함에 있어 사용될 수 있으며, 그렇지 않은 경우 그 결과는 명확한 예측불가(Inconclusive)로 간주해야 한다.

대조군은 다음과 같이 부형제대조군⁴⁾, 양성대조군⁵⁾, 비처리대조군⁶⁾ 및 사멸대조군⁷⁾을 준비한다(표 2 참고). 비처리대조군은 100 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용되며, 사멸대조군은 0 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용된다(4.3.3. 세포독성 측정 참고).

표 2. 본 시험을 위한 대조군 및 대조물질

대조군	처리물질
부형제대조군	시험물질 준비에 사용되는 부형제
양성대조군	AOO에 용해된 0.78 %(w/v) clotrimazole 용액 및 0.10 %(w/v) 4-NBB 용액
비처리대조군	없음
사멸대조군	증류수에 희석된 10 % Triton X-100 용액

4.4.2. 본 시험을 위한 시험물질 및 대조물질의 적용

유전자 발현 분석을 위해서는 각 시험물질 농도 및 양성대조군, 부형제대조군에 대해 세 개의 조직, 사멸대조군에 대해 두 개의 조직 및 비처리대조군에 대해 한 개의 조직이 사용된다. 시험물질 및 대조물질은 5 μ L, 사멸대조군을 위한 10 % Triton X-100 용액은 10 μ L를 각각의 상피 표면 중앙에 적용하고 5 % CO₂, 37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 배양한다.

4.4.3. 세포독성 측정

시험물질에 6시간 노출 후 '4.3.3. 세포독성 측정'에 기술된 것과 같이 세포생존율을 결정한다.

4.4.4. RNA 분리

유전자 발현 분석을 위해 조직 표면을 0.5 mL의 Phosphate-buffered saline(PBS)으로 3회 세척하고, 시험법 개발 및 검증에서 사용된 두 가지 용해(Lysis) 방법 중 하나를 선정하여 조직을 수집 및 파쇄한다.

- 4) 부형제대조군은 시험물질 용액 조제 시 사용된 부형제를 처리한 군을 의미하며 시험물질처리군 및 다른 대조군과 같이 시험
- 5) 양성대조군은 시험계에서 양성반응을 일으키는 것으로 알려진 물질인 0.78 %(w/v) clotrimazole 용액 및 0.10 %(w/v) 4-NBB 용액을 처리하며, 시험물질처리군 및 다른 대조군과 같이 시험
- 6) 비처리대조군은 화학물질을 처리하지 않은 군이며, LDH 분석법 사용 시 100 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용
- 7) 사멸대조군은 세포 대사나 분열 기능은 없지만 장벽기능을 일정 부분 유지하고 있으며 LDH 분석법 사용 시 0 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용

- TRIzol 시약과 볼텍스 믹서(Vortex mixer)
- Shredder column과 원심분리기

상업적으로 이용할 수 있는 키트와 시약(예: 시험법 개발 및 검증에서 사용된 RNeasy Mini kit)을 사용하여 mRNA를 포함한 total RNA를 파쇄된 RhE 조직 샘플에서 분리한다.

RNA 농도를 정량화하고, RNA 분석장비[예: NanoDrop™(Thermo Fisher Scientific)]를 사용하여 각 샘플에서 RNA 품질을 분석한다. Complementary DNA(cDNA) 합성에는 500 ng 이상의 RNA가 필요하다. RNA 농도 및 품질은 이후의 RT-qPCR에 사용되는 시약의 공급자가 기술한 권고사항과 일치해야 한다.

4.4.5. RT-qPCR

cDNA는 상업적으로 이용할 수 있는 시약을 사용하여 합성한다. cDNA 합성 이후 EpiSensa 표준작업지침서에 기술된 방법(TaqMan Gene Expression Assay 및 TaqMan Universal PCR Master Mix)을 사용하여 마커유전자(*ATF3*, *GCLM*, *DNAJB4* 및 *IL-8*) 및 내인성대조유전자(*GAPDH*)의 발현 수준을 RT-qPCR로 분석한다. 임계사이클(Threshold cycle, Ct) 값을 기반으로 아래의 방정식에 따라 유도배수 ΔCt 및 $\Delta\Delta Ct$ 값을 계산한다.

마커유전자의 ΔCt 값 = 마커유전자의 Ct 값 - *GAPDH*의 Ct 값

마커유전자의 $\Delta\Delta Ct$ 값 = 마커유전자의 ΔCt 값 - 마커유전자(부형제대조군)의 ΔCt 값

유도배수 = $2^{-\text{마커유전자의 } \Delta\Delta Ct \text{ 값}}$

5 ▶ 인정기준

시험(Run)의 유효성을 인정받기 위해 아래의 인정기준을 충족해야 한다.

- 부형제대조군 조직 두 개 이상의 세포생존율이 95 % 이상이어야 한다. 하나의 부형제대조군만이 세포생존율 95 % 미만인 경우 나머지 두 개의 조직에서 획득한 Ct 값이 사용되어야 한다.
- 두 개의 양성대조군[0.78 %(w/v) clotrimazole 및 0.10 %(w/v) 4-NBB] 모두에서 세포생존율은 80 % 이상이어야 한다.

- 0.78 %(w/v) clotrimazole 양성대조군에서 *ATF3* 및 *IL-8*의 평균 유도배수 값은 컷오프 값을 초과해야 한다(즉, *ATF3*의 유도배수 값이 15를 초과하고, *IL-8*의 유도배수 값이 4를 초과해야 한다).
- 0.10 %(w/v) 4-NBB 양성대조군에서 *GCLM* 및 *DNAJB4*의 평균 유도배수 값은 컷오프 값을 초과해야 한다(즉, *GCLM*의 유도배수 값이 2를 초과하고, *DNAJB4*의 유도배수 값이 2를 초과해야 한다).

시험된 농도의 결과가 유효한 것으로 인정받기 위해서 아래의 인정기준을 충족해야 한다.

- 최소 하나의 시험농도에서 평균 세포생존율이 80 % 이상이어야 한다. 시험된 농도에서 평균 세포생존율이 80 % 미만인 경우 해당 농도의 결과는 양성예측에서 제외되어야 하지만 음성예측에는 사용될 수 있다(6. 예측모델 참고).
- 특정 시험물질 농도의 평균 *GAPDH* Ct 값이 해당 부형제대조군 *GAPDH* Ct 값의 평균 ± 1 내외일 때 해당 농도에서 얻은 결과는 인정할 수 있다.

6 ▶ 예측모델

각 시험물질은 예측(양성 또는 음성)을 위해 한 번의 시험(Run)으로 평가된다. 아래의 조건 중 하나 이상이 충족되는 경우 EpiSensA 예측은 양성으로 간주된다.

- 최소 하나의 시험농도에서 *ATF3*의 $I_{\max} > 15$
- 최소 하나의 시험농도에서 *GCLM*의 $I_{\max} > 2$
- 최소 하나의 시험농도에서 *DNAJB4*의 $I_{\max} > 2$
- 최소 하나의 시험농도에서 *IL-8*의 $I_{\max} > 4$

아래의 세 가지 조건이 충족되는 경우 EpiSensA의 예측은 음성으로 간주된다.

- 모든 시험농도에서 마커유전자의 평균 유도배수 값이 모든 네 개의 유전자에 대한 각각의 컷오프 값을 초과하지 않는다.
- 최소 세 개의 농도가 시험되어야 한다.
- 시험농도에서 최소 한 개의 평균 세포생존율이 80 % 미만이다.

본 시험의 최고농도가 0.0244 % 또는 0.0122 %(w/v)인 경우 그 결과는 음성이 아닌 명확한 예측불가(Inconclusive)로 간주한다(27단락 참고).

네 가지 유전자의 평균 유도배수 값이 시험농도에서 각각의 컷오프 값을 초과하지 않지만, 모든 시험농도에서 평균 세포생존율이 80 % 이상인 경우가 발생할 수 있다. 이러한 경우 본 시험에서의 최고농도가 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도와 동일하다면 해당 시험물질의 시험결과는 음성으로 판정한다. 그러나 본 시험에서 최고농도가 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도보다 낮은 경우 첫 번째 본 시험에 사용된 최고농도보다 높은 농도에서 시험물질을 2배 연속 희석하여 추가적인 본 시험을 진행해야 한다(그림 1). 이러한 추가시험에서 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도에서 평균 세포생존율이 80 % 미만이거나(고체물질) 100 %인 경우(액체물질) 해당 결과는 음성으로 판정한다.

0.0122 %(w/v) 이상의 시험농도에서 모든 평균 세포생존율이 80 % 미만인 경우 해당 물질의 예측은 명확한 예측불가(Inconclusive)로 간주한다.

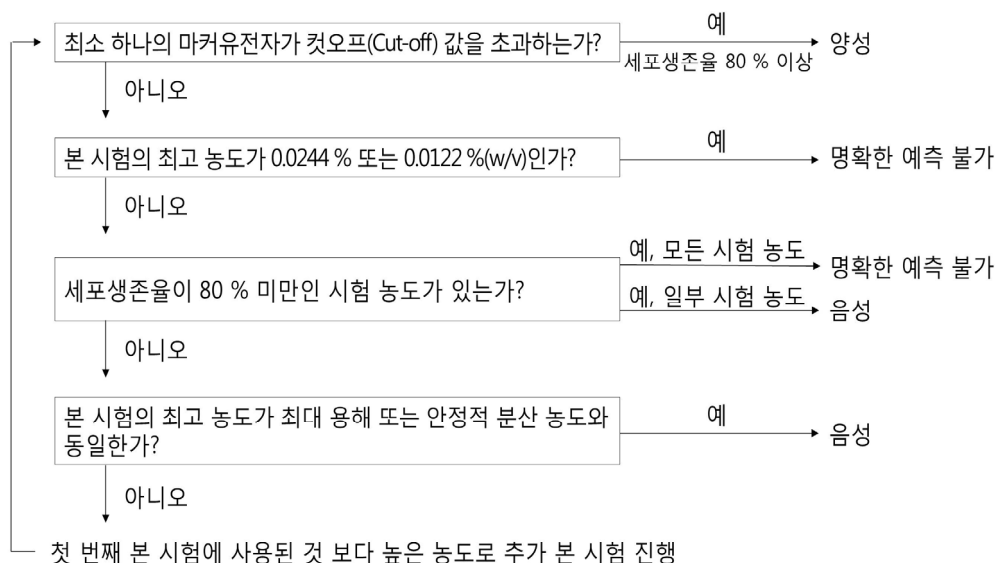


그림 1. EpiSensA 예측모델의 요약 흐름도

7 ▶ 시험보고서

시험보고서는 시험물질, 대조군, 시험조건, 시험 절차, 결과, 결과의 논의 및 결론을 포함한다.

- 시험물질에 대한 정보는 IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 및/또는 배치/로트 번호 및 유효기간 등의 기타 식별자를 포함한 화학물질 식별정보와 물리적 성상, 수 용해도, 분자량 및 추가 관련 물리화학적 특성을 포함한다. 또한 조성이 알려진 혼합물/고분자(Polymer)의 경우 분자량 또는 겉보기 분자량(Apparent molecular weight) 또는 기타 시험 수행과 관련된 정보를 포함한다. 가능한 경우 적합한 시험(Run) 인정기준을 보여주는 과거 양성대조군 결과에 대한 참고자료를 포함한다. 부형제대조군의 경우 각 시험물질의 부형제 선정 근거를 포함한다.
- 시험조건에 대한 정보는 시험의뢰자, 시험기관 및 시험책임자의 이름과 주소, 사용된 시험법, 기기 및 사용된 RhE 모델에 대한 설명을 포함한다. 또한 실험실의 숙련도 및 재현성 증명에 대한 자료를 포함한다.
- 시험 절차에 대한 정보는 시험물질 농도, 적용 절차, 판정기준, 인정기준 등에 대한 설명을 포함한다.
- 결과에는 시험물질 및 양성대조군에서 얻은 Ct, Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct, 유도배수 및 세포생존율 값을 포함한 데이터의 표를 포함하며 예측모델에 따른 시험물질 등급을 표시한다. 또한 유전자 발현 유도 및 세포생존율의 농도-반응 곡선을 보여주는 그래프 등을 포함한다.

II

번역문(OECD TG442D, 서론)

독성발현경로 핵심단계 중 각질세포 활성화에 대한
***in vitro* 피부감작성시험법**

In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Adverse Outcome
Pathway Key Event on Keratinocyte activation

일반 소개

각질세포 활성화 핵심단계 기반 시험가이드라인

1. 피부감작성물질이란 UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS)(1)에 정의된 바와 같이 반복적 피부 접촉 후 알레르기 반응을 유도하는 물질을 일컫는다. 피부감작성에 관여하는 주요한 생물학적 기전에 대해서 합의된 견해가 있다. 피부감작성과 관련된 화학적 및 생물학적 기전은 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)(2)를 통해 설명될 수 있으며 AOP는 분자 수준의 시작 단계에서 중간 단계를 거쳐 알레르기성 접촉 피부염을 유발하는 건강유해영향 과정으로 이루어진다. 이러한 AOP는 티올(Thiol)(예: 시스테인) 및 1차 아민(Amine)(예: 라이신)과 반응하는 유기화학물질과 같은 화학물질에 초점을 맞추고 있다. 이와 관련하여, 분자 수준의 시작 단계인 첫 번째 핵심단계(Key Event 1, KE 1)는 피부 단백질의 친핵성 중심(Nucleophilic centres)에 친전자성물질(Electrophilic substances)들이 공유결합을 하는 것이다. 두 번째 핵심단계(Key Event 2, KE 2)는 각질세포에서 염증반응과 항산화/친전자성 반응요소-의존성 경로[Antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways]와 같은 세포 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화를 포함한다. 세 번째 핵심단계(Key event 3, KE 3)는 일반적으로 특정 세포 표면 마커(Surface markers), 케모카인(Chemokines), 싸이토카인(Cytokines)의 발현을 확인하는 수지상세포(Dendritic Cells, DC)의 활성화이다. 네 번째 핵심단계(Key event 4, KE 4)는 T-세포 증식이다.

2. 본 시험가이드라인은 피부감작성 AOP의 KE 2인 각질세포 활성화(Keratinocyte activation)(2)에 대한 기전을 다루는 생체외(*in vitro*) 시험법에 해당된다. 본 시험가이드라인은 UN GHS(1)에 따라 피부감작성물질과 비감작성물질을 구별하기 위해 사용된다. 본 시험가이드라인에 현재 기술된 시험법은 두 개의 생체외(*in vitro*) *ARE-Nrf2* 루시퍼라아제 시험법과 하나의 유전자 발현 정량화에 기반한 시험법이다.
- *ARE-Nrf2* 루시퍼라아제 KeratinoSens™ 시험법(부록 IA)
 - *ARE-Nrf2* 루시퍼라아제 LuSens 시험법(부록 IB)
 - 피부감작성시험법-EpiSensA(부록 IC)
3. 세 개의 시험법은 과학적으로 검증되었다. KeratinoSens™ 시험법은 검증연구를 거쳐 EURL ECVAM 과학자문위원회(EURL ECVAM Scientific Advisory Committee, ESAC)의 독립적인 전문평가(Peer-review)와 EURL ECVAM의 긍정적인 추천(Positive recommendation)을 받았으며, *ARE-Nrf2* 루시퍼라아제 시험법에 대한 검증된 참고시험법(Validated reference method, VRM)으로 승인되었다(3)(4)(5)(6). LuSens 시험법은 유사시험법평가기준(Performance Standards, PS) 기반 검증연구를 거친 후 KeratinoSens™와 마찬가지로 ESAC의 전문평가와 긍정적인 의견을 받았다(7)(8)(9)(10). EpiSensA는 검증연구(11) 후 일본동물대체시험법검증센터(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)가 수행한 독립적인 전문평가를 거쳤다. EpiSensA는 Reverse Transcription-quantitative PCR(RT-qPCR)을 사용하여 인체피부모델(Reconstructed human epidermis, RhE)의 각질세포 활성화와 관련된 마커유전자 발현(*ATF3*, *IL-8*, *GCLM* 및 *DNAJB4*)의 변화를 정량하는 시험법이라는 측면에서 VRM으로 간주된다. 유사하거나 변형된 RhE 기반 시험법의 검증 및 평가 촉진을 위해 이러한 유형의 시험법을 위한 유사시험법평가기준(Performance Standards)(13)이 이용가능하다.

핵심단계 기반 시험가이드라인에 포함된 시험법의 배경 및 원리

4. 피부감작성의 평가는 일반적으로 실험동물의 사용이 수반된다. 기니픽을 사용하는 고전적 방법인 Magnuson, Kligman의 기니픽 극대화 시험(Guinea Pig Maximisation Test, GPMT) 및 Buehler 시험(OECD TG406)(14)은 피부감작성의 유도기(Induction phase) 및 유발기(Elicitation phase)를 평가한다. 마우스를 이용한 시험법인 LLNA(OECD TG429)(15)와 세 개의 비방사성 표지 시험법인 LLNA:DA(OECD TG442A)(16), LLNA:BrdU-ELISA 및

BrdU-FCM(OECD TG442B)(17)은 모두 유도 반응만을 평가하고 피부감작성의 유도기에 대해 객관적으로 측정할 수 있으며 동물복지 측면에서도 기니픽 시험에 비해 장점이 있기 때문에 받아들여졌다.

5. 피부감작성 AOP의 세 가지 핵심단계를 다루는 기전에 근거한 화학적(*in chemico*) 시험법과 생체외(*in vitro*) 시험법은 화학물질의 피부감작성 유해성 평가를 위해 채택되었다. OECD TG442C는 KE 1을 다루는 「펩타이드 반응성 시험법」(Direct Peptide Reactivity Assay)(18)이며 본 시험가이드라인은 KE 2를 다루는 각질세포 활성화를 평가하는 시험법이고 OECD TG442E는 KE 3인 수지상세포의 활성화를 다루고 있다(16). T-세포 증식을 나타내는 KE 4는 마우스를 이용한 국소 림프절 시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)(15)을 통해 간접적으로 평가된다. 피부감작성을 결정하기 위해 모든 핵심단계를 평가할 필요는 없다.
6. 각질세포 활성화는 피부감작성 AOP(2)(20)의 여러 핵심단계 중 하나의 단계이기 때문에 화학물질이 가지고 있는 피부감작성에 대한 잠재력(Skin sensitisation potential)을 판정할 수 없다. 따라서 본 시험가이드라인에 설명된 시험법의 결과는 다른 보완적인 정보들, 예를 들어 피부감작성 AOP의 다른 핵심단계들을 다루는 생체외(*in vitro*) 시험법과 비시험법(Non-testing methods)[유사한 화학물질과의 상관성방식(Read-across)을 포함]으로 얻은 결과들과 조합하여 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) 내에서 사용될 때 피부감작성(UN GHS Category 1)과 비감작성을 구별할 수 있다(20). 정의된 접근법(Defined Approach, DA)(예: 사용된 정보출처 및 예측 도출을 위해 적용된 절차와 관련하여 표준화된 접근법) 내에서 이러한 시험법을 이용하여 생산된 데이터 활용의 예시가 발간되었으며(20) 피부감작성 DA에 대한 OECD TG에 적용되었다. 이러한 시험법으로 생산한 데이터를 피부감작성 DA 내에서 사용하려는 경우 경계치 기준(기준값과 근접한 값의 기준, Borderline criteria) 및 기타 데이터 해석 절차 적용을 위해 TG497을 참고한다. 경계치 기준 적용에 대한 세부정보는 부록 1A의 그림 1을 참고한다.
7. 본 시험가이드라인에서 설명된 시험법만으로는 피부감작성물질을 UN GHS(1) 규정에 의한 1A와 1B로 하위 분류할 수 없으며, 안전성 평가에 필요한 역가(Potency)를 예측하는 용도로 사용할 수 없다. 그러나 규제 체계에 따라, 본 시험법의 양성결과 자체만으로 UN GHS category 1으로 분류할 수 있다.

8. 본 시험가이드라인에 포함된 시험법들은 절차, 적용범위 및 제한점 측면에서 다를 수 있으나 이들 각각은 피부감작성 AOP의 각질세포 활성화 핵심단계에 대한 각 국가의 시험결과 요구사항을 다루기 위해 사용될 수 있으며, 동시에 데이터상호인정(Mutual Acceptance of DATA, MAD)을 받을 수 있는 이점이 있다. DA의 측면에서 시험법들이 자동으로 서로 대체할 수 있는 것은 아니며 어떤 시험법 또는 시험법의 조합이 사용되어야 하는지는 TG497에 명시되어 있다.
9. 본 시험가이드라인에서 ‘시험물질(Test chemical)’ 용어는 시험대상을 의미하며⁸⁾, 단일성분물질, 다성분물질 및/또는 혼합물 시험에 대한 시험법의 적용 가능성과는 관련이 없다. 시험을 수행할 때는 시험물질이 배지에 용해되거나 적어도 안정한 현탁액(예: 육안으로 볼 때, 배지에 최고농도로 용해 시 용해/조제된 시험물질의 잔류물이 남아 있지 않고 시험용액을 수 시간 방치하였을 때 침전 또는 층 분리가 일어나지 않는 상태)을 형성하는지 확인해야 한다.
10. 현재 다성분물질/혼합물(22)(23)(24)에 대한 시험법 적용 가능성에 대한 정보는 제한적이다. 비록 검증연구에서 평가되지는 않았지만, 본 시험법은 기술적인 면에서 다성분물질 및 혼합물을 시험하는 경우 적용될 수 있을 것이다. 한편 혼합물, 시험이 어려운 화학물질(예: 불안정) 또는 본 시험가이드라인에서 설명된 적용 범위 내에 명확히 해당되지 않는 시험물질로 시험을 수행할 때는 해당 시험결과가 과학적으로 의미 있는 결과를 줄 수 있는지에 대한 여부를 사전에 검토해야 한다. 또한, 다성분물질 또는 혼합물을 시험할 경우 시험물질 내 세포독성 성분의 간섭영향 가능성을 고려해야 한다(예: 비감작성 성분의 함량이 높으면, 약한 감작성 성분 또는 저농도의 감작성 성분의 세포독성 반응이 가려질 수도 있음). 특정 경우에 따라, 주요 단일성분이 분획을 주로 구성하거나 혼합물이 여러 분획을 구성하는 경우 복합 혼합물(Complex mixture)이 가지고 있는 피부감작성에 대한 잠재력을 평가하는 것이 과학적으로 타당할 수 있다.

8) 2013년 6월, 합동회의에서 시험대상을 언급할 때 ‘시험물질’이라는 용어를 신규 및 개정판 시험가이드라인에서 가능한 보다 일관되게 사용하기로 합의함

참고문헌

- (1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at:
[https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- (2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (3) Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- (4) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- (5) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.
- (6) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation].
- (7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro* 28, 1482-1497.

- (8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* 32, 278-286
- (9) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf].
- (10) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (11) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (12) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 383: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Peer review Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (13) OECD (2024). Series on Testing & Assessment No 396: Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) test methods; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) OECD (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (15) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitization: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

- (16) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (17) OECD (2018). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (18) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (19) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on Activation of Dendritic Cells. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- (20) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: 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, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].
- (21) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>.
- (22) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSensTM assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
- (23) Kolle, S.N., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2013). Alternative method in practice: Post-validation experience of the skin sensitization in vitro test strategy. *Toxicology Letters* 221, S204.

- (24) Settivari RS, Gehen SC, Amado RA, Visconti NR, Boverhof DR, Carney EW (2015). Application of the KeratinoSensTM assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. Regul Toxicol Pharmacol: 72(2):350-60.

부속서 1. 용어 정의

정확도(Accuracy): 시험결과와 허용된 참고치의 일치 정도로, 시험법 성과를 측정하는 기준이자 상관성(Relevance)의 요소에 해당됨. 시험결과의 정확도를 의미하는 ‘일치성(Concordance)’과 같은 의미로 혼용되어 사용(3)

독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway): 표적 화학물질 또는 유사한 그룹의 화학구조로부터 분자 수준의 시작 단계를 거쳐 생체외(*in vitro*) 유해 반응을 일으키기까지 일련의 과정(2)

항산화 반응요소(ARE, Antioxidant Response Element): 친전자성 반응요소(Electrophile response element, EpRE)로도 불리며, 세포보호 및 phase II 유전자 상류 프로모터 부위(Upstream promoter region)에 있는 반응요소인 ARE는 *Nrf2*에 의하여 활성화되면 이들 유전자의 전사 유도를 일으킴

CV(Cell viability): 세포생존율

변동계수(Coefficient of variation): 동일 시료로부터 얻은 데이터의 변동성을 나타내며 표준편차를 평균으로 나눈 값. 100을 곱하여 백분율로 나타낼 수도 있음

CV₇₅: 75 %의 세포생존율을 나타내는 추정 농도

EC_{1.5} 값: 1.5배 루시퍼라아제 활성 유도를 나타내는 추정 농도

Fold luciferase activity induction: 시험물질의 용매/부형제 대조군에 노출된 세포 발광도에 대하여 시험물질을 처리한 세포의 발광도 비율

IC₃₀: 세포생존율을 30 % 감소시키는 농도

IC₅₀: 세포생존율을 50 % 감소시키는 농도

유해성(Hazard): 생체, 생태계, 특정 집단이 화학물질에 노출되었을 때, 유해한 영향을 일으킬 가능성이 있는 물질 또는 환경의 내재적 특성

통합독성평가(Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA): 화학물질 또는 화학물질 그룹의 유해성 확인(유해 가능 여부), 유해성 결정(효력 정도) 및/또는 안전성 평가(가능 여부/효력 정도, 노출)에 사용하는 구조적 접근 방법. 잠재적인 유해성(Hazard) 또는 위해성(Risk) 또는 심화 추적 필요성에 관한 규제결정을 위하여 모든 관련 데이터들을 전략적으로 통합하고 경중을 가림으로써 최소한의 시험만 수행하도록 함

I_{max} 값: 특정 시험물질 농도에서 용매 대조군과 비교하여 루시페라아제 활성 유도 최대치

Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1): *Nrf2* 활성을 조절하는 감지 단백질(Sensor protein). 활성 유도가 되지 않은 상태에서 *Keap1* 감지 단백질은 *Nrf2* 전사인자에 ubiquitin 표지를 매개하고 proteasome에서 단백질을 분해함. *Keap1*의 반응성 시스테인 잔기가 저분자물질에 의해 공유결합이 변형되어 *Nrf2*가 *Keap1*으로부터 분리됨(4)(5)(6)

혼합물(Mixture): 서로 반응하지 않는 두 개 이상의 화학물질로 구성된 혼합물 또는 용액(1)

단일성분물질(Mono-constituent substance): 정량적 구성에 따라 하나의 주요성분이 최소 80 %(w/w) 이상으로 존재하는 물질

다성분물질(Multi-constituent substance): 정량적 구성에 따라 두 가지 이상의 주요성분이 10 %(w/w) 이상, 80 %(w/w) 미만의 농도로 존재하는 물질. 다성분물질은 제조 과정의 산물임. 혼합물과 다성분물질의 차이는 혼합물의 경우 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 혼합하여 얻게 되며, 다성분물질은 화학반응의 산물임

음성대조군(Negative control): 시험계의 모든 구성 요소를 포함하고 양성반응을 유도하지 않는 것으로 알려진 물질로 처리된 시료. 해당 시료는 시험물질 처리 시료 및 기타 대조군 시료와 함께 사용됨

Nrf2(nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2): nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2는 항산화 반응 경로에 관여하는 전사 인자. *Nrf2*가 ubiquitin 표지되지 않으면 세포질에 많아지고, 핵으로 이동하여 많은 세포보호 유전자의 상류 프로모터 부위(Upstream promoter region)의 *ARE*에 결합하고 이들 유전자의 전사를 유도함(4)(5)(6)

유사시험법평가기준(Performance standards): 검증된 시험방법을 기반으로 기전적 및 기능적으로 유사한 시험방법의 비교 가능성을 평가하는 기준으로 다음 사항을 포함함

- (1) 필수적 시험방법 구성요소;
- (2) 검증된 시험방법의 허용 가능한 수행 검증을 위해 사용된 화학물질들 중에서 선택된 최소한의 기준물질 리스트;
- (3) 검증된 시험법에서 얻은 내용을 기반으로 정확성과 신뢰도의 비교 수준. 이는 제시된 시험법이 기준 화학물질의 최소한의 리스트를 이용해 평가했을 때 증명되어야 함(3)

양성대조군(Positive control): 시험계의 모든 구성성분을 포함하며 시험계에서 양성반응을 일으킨다고 알려진 물질로 처리한 샘플. 시험물질 및 다른 대조물질과 같이 시험됨. 시간에 따른 양성대조군 반응의 변동성을 평가할 수 있도록 양성반응의 정도가 과하지 않아야 함

숙련도물질(Proficiency chemicals or substances): 표준화된 시험법으로 기술적인 능력을 입증하기 위해 실험실에서 사용할 수 있는 유사 시험법 평가 기준에 포함된 참고물질. 해당 물질의 선택 기준은 일반적으로 반응 범위를 대표한다는 것과 시중에서 구할 수 있는 것, 그리고 고품질의 유용한 시험자료가 있는 것

참고물질(Reference chemicals or substances): 새로운 시험법이 검증된 참고시험법으로 증명된 인정기준 충족 여부를 입증하기 위해 사용되는 화학물질 집합. 해당 화학물질은 시험법이 사용될 것으로 예상되는 화학물질의 부류를 대표해야 하며 화학물질이 일으킬 것으로 예상되는 반응의 모든 범위(강, 약, 음성)를 나타내야 함

상관성(Relevance): 시험법과 원하는 결과 사이의 관계 및 해당 시험법이 특정 목적에 있어 유의미하며 유용한지에 관한 설명. 상관성은 시험법이 원하는 생물학적 영향을 올바르게 측정하고 예측하는 정도를 나타냄. 상관성은 시험법의 정확성(일치도)을 내포함(3)

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 수행하였을 때 시간이 지나도 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험법을 재현할 수 있는 정도의 측정값. 신뢰도는 실험실 내/실험실 간 재현성(Reproducibility) 및 실험실 내 반복성(Repeatability)으로 평가됨(3)

재현성(Reproducibility): 동일한 시험방법에 따라 동일한 시험물질에 대한 반복 시험으로 얻은 결과 간의 일치도(‘신뢰도’에 대한 정의 참고)(3)

민감도(Sensitivity): 시험법으로 모든 양성/활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 시험법 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항(3)

용매/부형제 대조군(Solvent/vehicle control): 용매 등 시험계의 모든 구성요소를 포함하지만 시험물질은 처리하지 않는 군을 말하며 동일한 용매에 녹인 시험물질로 처리한 시료의 기본반응(Baseline response)을 평가하기 위해 사용

특이도(Specificity): 시험법으로 모든 음성/비활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 특이도는 범주 결정에 대한 시험법 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항(3)

물질(Substance): 생산 과정을 통해 얻어지거나 자연 상태로 얻어진 화학원소들(Elements)과 이들로 이루어진 화합물(Compound). 생산품의 안정성을 유지시키기 위해 필요한 첨가제와 생산 과정에서 유래하는 불순물을 포함하지만, 해당 물질의 안정성이나 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외함(1)

시험물질(Test chemical): ‘시험물질’이라는 용어는 시험법에서 평가되는 화학물질을 지칭하기 위해 사용됨

UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): 표준화된 물리적, 보건적, 환경적 유해성의 유형 및 수준에 따라 화학물질(단일물질 및 혼합물)의 분류를 제안하고, 그림문자(Pictogram), 신호어(Signal word), 유해위험문구(Hazard statement), 예방조치문구(Precautionary statement)

및 안전보건자료(Safety data sheet) 등과 같은 화학물질의 유해성에 상응하는 소통 방식을 다루는 체계임. 이를 통해 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하는 관점에서 화학물질의 독성(Adverse effect)에 대한 정보를 전달할 수 있음(1)

UVCB(Substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials): 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성으로 이루어진 화합물, 복잡한 반응 산물 또는 생물학적 물질

검증된 참고시험법(Validated Reference Method, VRM): 과학적으로 유효한 것으로 승인되고 유사 시험법으로 검증연구를 위한 참고자료로 사용되는 첫 번째 시험법

검증된 시험법(Validated test method): 특정 목적에 대한 상관성(정확도 포함) 및 신뢰성 결정을 위한 검증연구가 완료된 시험법. 검증된 시험법이 제안된 목적에서 허용되는 것으로 간주되는 정확도와 신뢰성 측면에서 충분한 성능(Performance)을 보이지 않을 수 있다는 것에 주의해야 함(3)

Xeno-free: 사용된 세포와 동일한 종(이 경우에는 인간)에서 유래하지 않은 어떤 물질도 포함하지 않음

참고문헌

- (1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- (2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (3) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.
- (5) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.
- (6) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1, 45-49.

II

번역문(OECD TG442D, 부록 IC)

In vitro* 피부감작성시험법, EpiSensA**In Vitro* Skin Sensitisation: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA)****초기 고려사항 및 제한점**

1. EpiSensA는 피부감작성물질에 노출된 인체피부모델(Reconstructed human epidermis, RhE) 내의 각질세포 활성화(Keratinocyte activation)와 관련된 마커유전자(Marker genes) 발현의 변화를 정량화하는 시험법으로, 피부감작성 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)(1)의 두 번째 핵심단계(Key event, KE)인 각질세포 활성화를 다루기 위해 제안되었다(2)(3). 피부감작성 AOP에서 발생하는 두 가지 주요한 각질세포 반응은 염증반응 및 세포보호 유전자 경로(Cytoprotective gene pathways)의 유도이다(2). 활성화전사인자 3(Activating transcription factor 3, *ATF3*) 및 인터루킨-8(Interleukin-8, *IL-8*) 유전자의 발현은 각질세포의 염증반응을 나타내는 반면, 글루타메이트-시스테인 리가아제 변형 소단위체(Glutamate-cysteine ligase modifier subunit, *GCLM*) 및 DnaJ(Hsp40) 상동체 서브패밀리 B(DnaJ homolog subfamily B, *DNAJB4*) 유전자는 세포보호 유전자 경로의 유도를 나타낸다(3). EpiSensA에서 마커유전자(*ATF3*, *IL-8*, *GCLM* 및 *DNAJB4*) 발현의 상대적 변화는 Reverse Transcription-quantitative PCR(RT-qPCR)로 정량화하며, 이후 정량화된 데이터를 사용하여 피부감작성물질과 비감작성물질을 구별한다.
2. EpiSensA는 검증연구(4) 후 일본동물대체시험법검증센터(Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM)가 동물대체시험법 국제협력(International Collaboration on Alternative Test Methods, ICATM) 협의체와 협력하여 진행한 독립적인 전문평가를 거쳤다(5). EpiSensA는 유해성 식별을 목적으로 피부감작성물질과 비감작성물질을 구별하기 위해 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)의 일부로 사용됨에 있어 과학적 타당성이 있는 것으로 확인되었다.

3. EpiSensA에 사용되는 RhE 모델은 LabCyte EPI-MODEL24이다. EpiSensA는 RT-qPCR을 사용하여 RhE 모델에서 각질세포 활성화와 관련된 마커유전자(*ATF3*, *IL-8*, *GCLM* 및 *DNAJB4*) 발현의 변화를 정량화하는 시험법에 대한 검증된 참고시험법(Validated Reference Method, VRM)으로 간주된다. EpiSensA와 유사하거나 이를 변형한 시험법의 검증을 돕고 이러한 시험법을 포함한 본 시험가이드라인의 시의적절한 개정을 위해 유사시험법평가기준(Performance Standard, PS)(6)이 마련되었다. EpiSensA와 유사하거나 이를 변형한 시험법은 PS에 기술된 모든 기준을 충족한다는 것이 검토되고 합의된 이후에만 시험가이드라인에 추가될 수 있다. PS에 기반한 검증연구가 수행된 후에는 다른 RhE 모델을 사용할 수 있다.
4. EpiSensA는 세포배양 실험을 수행할 수 있는 실험실에 전수 가능한 것으로 나타났다(4)(5)(8)(9)(10). EpiSensA의 실험실내 재현성(Within-laboratory reproducibility)은 참여실험실 두 곳에서 93.3 %(14/15), 한 곳에서 86.7 %(13/15)로 나타났다. 27종 시험물질 분석에 대한 참여실험실 세 곳의 실험실간 재현성은 88.9 %로 나타났다(9). 검증연구와 논문으로 발간된 연구에서 생산한 결과에 따르면 비감작성물질로부터 피부감작성물질(UN GHS Cat. 1)을 구별함에 있어 LLNA 결과와 비교한 EpiSensA의 정확도는 83.3 %(120/144), 민감도는 88.8 %(95/107), 특이도는 67.6 %(25/37)로 나타났다. 균형 정확도(Balanced accuracy)는 78.2 %이다. 인체 결과와 비교하는 경우 EpiSensA의 정확도는 80.7 %(71/88), 민감도는 98.1 %(53/54), 특이도는 52.9 %(18/34)로 나타났다. 균형 정확도는 75.5 %이다. LLNA와 비교한 EpiSensA의 위음성 예측은 피부감작성 역가(Potency)가 높은 물질(UN GHS subcategory 1A) 보다 피부감작성 역가가 낮거나 중간인 물질(UN GHS subcategory 1B)에서 더 많이 나타났다(9). 그러나 EpiSensA로 얻은 결과는 본 시험가이드라인의 7단락과 8단락의 일반적 소개에 따라 정의된 접근법(Defined Approach, DA) 또는 IATA의 맥락에서 다른 출처의 정보와 조합하여 사용해야 하므로 EpiSensA를 단독 시험법으로 사용하는 것과 관련하여 본 문서에 제시된 정확도 값은 제안 사항일 뿐이다(11). 나아가 피부감작성 평가를 위한 비동물(Non-animal) 시험법 평가에 생체내(*in vivo*) 데이터를 참고데이터로 사용하는 경우 LLNA 등 다른 동물실험이 인체에서 발생하는 일을 완전히 반영하지 못할 수 있다는 점을 알아야 한다.
5. 현재 이용가능한 데이터에 따르면 EpiSensA는 다양한 유기작용기, 반응 기전, 피부감작성에 대한 잠재력(Skin sensitisation potential)(*in vivo* 연구를 통해 결정된 것에 따름) 및

물리·화학적 특성을 나타내는 물질의 시험에 적용할 수 있다(3)(4)(5)(9)(10). EpiSensA는 용해되는 물질 또는 적절한 부형제에서 안정적으로 분산(Stable dispersion)되는 물질(19단락 부형제의 선정 및 시험물질 용해도 평가 참고)의 시험에 적용할 수 있다. 덧붙여, RhE 모델이 기체-액체 계면을 포함하는 3차원 모델을 나타내므로 시험물질을 RhE 모델 표면에 직접 적용할 수 있다. 그러므로 친유성(Lipophilic) 부형제를 사용할 수 있으며, 본 시험법은 친유성 물질($\log K_{ow} > 3.5$) 시험에 사용될 수 있다(3)(4)(5)(9)(10). 나아가, 피부감작성을 나타내기 위하여 효소에 의한 활성화단계를 거쳐야 하는 화학물질(Pro-hapten) 및 비생물학적 변형을 거쳐 피부감작성을 나타내는 화학물질(Pre-hapten)은 EpiSensA에서 양성으로 올바르게 평가되었다(3)(4)(5)(9)(10). RhE 및 인체피부의 대사 능력이 일부 연구에서 조사되었다(12)(13). 이들 연구에서 RhE 모델은 인체피부와 유사한 대사 능력을 갖추는 것으로 나타났지만, 추가 확인이 필요하다. 이러한 관점에서 시험결과는 유해성 식별을 뒷받침하는 목적으로만 사용될 수 있다(즉, IATA 또는 DA의 맥락에서 사용). 시험물질 노출 기간의 제한으로 인해 충분히 대사되거나 산화되기까지 6시간 이상이 필요한 pro-hapten 또는 pre-hapten은 EpiSensA로 감지되지 않을 수 있다.

6. 일부 계면활성제는 *ATF3* 및 *IL-8* 유전자의 비특이적 발현으로 인해 위양성 결과가 나올 수 있다(4). 또한 증류수(Distilled water)를 부형제로 사용하는 고농도 시험물질[예: 100 % 또는 50 % (w/v)]은 높은 삼투압 환경을 유발하여 *ATF3*의 비특이적 발현으로 이어질 수 있다(4). 그러므로 이러한 경우 양성결과는 주의를 기울여 해석해야 한다. 그러나 음성결과는 시험물질을 비감작성물질로 식별하기 위해 사용될 수 있다. 시험물질의 용해도를 평가했을 때 0.0122 %에서 용해되지 않거나 안정적으로 분산(19단락 부형제 선정 및 시험물질의 용해도 평가 참고)되지 않는다면 해당 물질은 EpiSensA를 사용한 시험에 적용할 수 없다. 그러나 충분한 과학적 근거를 제공할 수 있는 경우 다른 부형제를 사용할 수 있다. 잔존 세포생존율이 80 % 이상인 농도(인정기준 단락 참고)에서 내인성대조유전자(Endogenous control genes)인 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(Glyceraldehyde 3- dehydrogenase, *GAPDH*)의 발현에 상당한 영향을 주는 시험물질은 RT-qPCR을 사용한 상대적 정량화를 통해 마커유전자 발현이 정확히 측정되지 않을 수 있으므로 본 시험법에 적용하지 못할 수 있다. 그러나 충분한 과학적 근거를 제공할 수 있는 경우 다른 내인성대조유전자를 사용할 수 있다. 덧붙여, RNA 그 자체에 영향을 주거나 (예: RNA 분해 유도 등을 통해) RNA 분리 체계를 직접적으로 간섭하는 시험물질은 본 시험법에

적용하지 못할 수 있다. 특정 범주의 시험물질이 EpiSensA에 적용될 수 없음을 보여주는 증거가 있는 경우 해당 범주의 물질은 본 시험법을 사용해서는 안 된다.

7. EpiSensA는 피부감작성물질(UN GHS Category 1)과 비감작성물질의 구별을 돕는 것 외에도 DA 또는 IATA 등과 같은 통합접근법에 사용되는 경우 피부감작성 역가평가에 기여할 수 있는 정보(예: 농도-반응 데이터)를 제공할 수 있다. 그러나 EpiSensA 시험결과가 역가평가에 어떻게 기여할지 결정하기 위해서는 추가적인 데이터(인체 연구에 기반한 데이터가 좋음)가 필요하다.
8. 용어 정의는 일반 소개의 부속서에서 제공된다.

시험의 원칙

9. EpiSensA는 시험물질에 6시간동안 노출된 RhE 모델에서 각질세포 활성화와 관련된 네 가지 마커유전자(*ATF3*, *GCLM*, *DNAJB4* 및 *IL-8*) 발현의 변화를 정량화하는 생체외(*in vitro*) 시험법이다. 마커유전자 발현의 상대적인 변화는 RT-qPCR을 사용하여 정량화한다. 또한 세포독성은 아세포독성(Sub-cytotoxic)(세포생존율 $\geq 80\%$) 농도에서 마커유전자의 발현이 증가되는지 판정하기 위해 동시에 평가된다. 마커유전자의 상대적 유도량은 부형제대조군과 비교하여 계산한다. 잔존 세포생존율 80 % 이상에서 최소 한 가지 마커유전자의 발현이 각각의 컷오프(Cut-off) 값(*ATF3* = 15배, *GCLM* = 2배, *DNAJB4* = 2배, *IL-8* = 4배)을 초과하는 경우 해당 시험물질은 EpiSensA에서 양성으로 간주된다. 이러한 이유로 최대 유도배수의 평균(The mean maximum fold-induction, I_{max}) 값은 평균 잔존 세포생존율이 80 % 이상인 농도의 데이터를 사용하여 결정한다.
10. EpiSensA를 일상적으로 사용하기 전에 실험실에서는 본 부록의 부속서 1에 나열된 10종의 숙련도물질을 사용하여 기술적 숙련도를 증명해야 한다. 본 시험법의 사용자는 검증연구에서 숙련도물질로 얻은 각 마커유전자의 I_{max} 범위에 대해 부속서 2를 참고할 수 있다.

절차

11. EpiSensA 표준작업지침서는 Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance(TSAR)(14)에서 이용 가능하며 실험실에서 본 시험법을 도입 및 활용하는 경우 이를 사용해야 한다. 아래의 단락은 농도선정 시험 및 본 시험(유전자 발현 분석) 두 단계로 나뉜 EpiSensA의 구성요소 및 절차에 대한 설명을 제공한다.

일반적인 시험계의 특성

12. 상피를 재구성하기 위해서는 비형질전환 인체각질세포가 사용되어야 한다(15). 살아있는 다층의 상피세포(Basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum)가 기능적인 각질층(Stratum corneum) 아래에 존재해야 한다. 각질층은 세포독성 기준물질[예: sodium lauryl sulphate(SLS) 등이 장벽기능 시험에 사용됨]의 빠른 투과를 견딜 수 있는 기능을 가진 장벽을 형성하도록 필수 지질 프로파일(Profile)을 포함하는 다층으로 이루어져야 한다. RhE 모델의 방어(Containment) 특성은 시험물질이 각질층을 통해 살아있는 조직으로 이동하는 것을 막아야 한다. 그렇지 않은 경우 피부 노출을 잘 모방하지 못할 수 있다. RhE 모델은 박테리아, 바이러스, 마이코플라스마 또는 곰팡이에 오염되지 않아야 한다.

기능적 조건

장벽기능

13. RhE 모델의 개발자/공급자는 각 RhE 모델의 배치(Batch)가 장벽기능에 대해 정해진 품질관리 기준을 충족하는지 확인해야 한다. 기준물질(예: SLS)이 정해진 노출시간 후 조직생존율을 50 % 감소시키는 농도(IC₅₀)를 결정하거나 정해진 특정 농도에서 기준물질을 적용한 후 세포생존율을 50 % 감소시키기 위해 필요한 노출시간(ET₅₀)을 결정하는 등으로 장벽기능을 증명하고 평가해야 한다.

형태학

14. 인체상피구조와의 유사함(12단락에 기술된 각질층 포함)을 증명하는 RhE 모델의 조직학적 검사는 RhE 모델의 개발자/공급자가 제공해야 한다.

재현성

15. RhE 모델 개발자/공급자는 시간 경과에 따른 재현성 점검을 위해 세포생존율 및 장벽기능 시험의 품질관리(Quality control, QC) 출하 시험결과와 데이터베이스를 유지해야 한다. EpiSensA의 사용자는 시간 경과에 따른 시험법 수행의 재현성을 점검하기 위해 EpiSensA 양성 및 부형제(음성)대조군 결과의 데이터베이스를 유지하는 것이 권장된다.

품질관리

16. RhE 모델은 개발자/공급자가 사용된 각 RhE 모델 배치가 정해진 생산 출하 기준을 충족한다는 것을 증명한 경우에만 사용해야 한다. 이러한 출하 기준 중에는 장벽기능(13단락) 및 형태학(14단락)이 가장 관련성이 높다. 이러한 데이터를 시험법 사용자에게 제공하여 사용자가 시험보고서에 해당 정보를 포함할 수 있도록 해야 한다. IC₅₀ 또는 ET₅₀의 허용기준⁹⁾(상한 및 하한)은 RhE 모델 개발자/공급자가 확립해야 한다(15). 허용기준 내에 있는 조직으로 생산한 결과만이 신뢰성 있는 예측으로 수용되어야 한다. 부록 IC에 포함된 본 시험법의 허용기준은 표 1에 제시된다.

표 1. RhE model의 QC 배치 출하 기준

RhE 모델	최소 허용치	최대 허용치
Labcyte EPI-MODEL24 (SLS로 18시간 처리)(13)	IC ₅₀ = 1.4 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL

RhE 모델 준비

17. EpiSensA는 RhE 모델을 사용하여 수행되어야 한다. Japan Tissue Engineering Co., Ltd.(J-TEC)에서 구매할 수 있는 LabCyte EPI-MODEL24 kit(#401124)가 현재 EpiSensA에 사용할 수 있는 유일한 모델이다. PS(6)에 기반한 검증연구가 수행된 후 다른 RhE 모델이 사용될 수 있다.
18. RhE 모델은 LabCyte EPI-MODEL24 kit(#401124)에 포함된 배양배지로 습한 조건에서 5 % CO₂, 37 °C ± 1 °C에서 배양한다.

9) 시험결과와 유효성에 대한 기준 값은 '인정기준'으로 표기하였으며 인체피부모델의 품질관리에 대한 기준 값은 '허용기준'으로 표기

부형제 선정 및 시험물질 용해도 평가

19. 용해도 평가는 시험 전에 실시한다. 각 물질의 용해도는 육안으로 평가하여 확인한다. 이를 위해 우선적으로 아세톤:올리브오일 4:1(AOO, 아세톤에 올리브오일을 20 % (v/v)로 혼합)을 부형제로 사용하여 시험물질이 50 %의 농도로 용해되거나 안정적으로 분산되는지 확인한다(예: 시험물질 0.1 g에 AOO를 0.1 mL을 넣어 용해). 두 번째는 증류수, 세 번째는 증류수에 50 % EtOH(50 % Ethanol, 증류수에 50 % v/v로 혼합된 에탄올)을 부형제로 사용하여 시험물질이 용해되거나 안정적으로 분산되는지 확인한다. 시험물질이 그 어떤 부형제에도 50 %의 농도로 용해되지 않거나 안정적으로 분산[예: 시험물질이 침전되지 않거나 실온에서 준비한 지 10분 이내에 부형제에서 다른 상(Phase)으로 분리되지 않는 콜로이드(Colloids) 또는 현탁(Suspension) 상태되지 않는 경우, 최대 용해농도는 50 %에서 시작하여 0.0122 % 까지 2배 간격으로 조제하며 결정해야 한다. 시험물질이 0.0122 %에서 용해되지 않거나 안정적으로 분산되지 않는 경우, 해당 시험물질은 EpiSensA를 사용한 시험에 적용할 수 없다. 적절한 부형제는 시험된 최고농도에서 시험물질이 용해되거나 안정적으로 분산되는 부형제로 정의된다. 결정된 최고농도가 부피 플라스크(Volumetric flask)에서 부피 당 무게(Weight per volume)로 준비될 수 있는지 확인해야 한다. 만약 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도가 0.0488 %, 0.0244 % 또는 0.0122 %로 결정되면, 농도선정 시험(20~26단락)은 생략할 수 있으며 본 시험(27단락 참고)을 수행해야 한다. AOO, 증류수 또는 50 % EtOH 이외의 부형제가 사용되는 경우 해당 부형제 사용의 적절한 과학적 근거가 제공되어야 한다.

농도선정 시험

20. 농도선정 시험은 본 시험(27단락 유전자 발현 분석 참고)에서 사용될 시험물질의 농도를 결정하기 위해 수행된다. 본 시험에서는 80 % 이상의 평균 세포생존율을 보이는 시험물질 농도를 사용해야 하지만, 음성 판정을 위해 최소 한 개의 평균 세포생존율은 80 % 미만이어야 한다. 그러므로 세포생존율 80 % 미만인 시험물질의 최저농도를 농도선정 시험에서 결정해야 한다.

농도선정 시험을 위한 시험물질 및 대조물질의 준비

21. 시험물질은 19단락에 설명된 것과 같이 시험 당일 최고농도로 적절한 부형제에 용해되거나 안정적으로 분산되도록 준비한다. 최고농도부터 시작하여 0.0122 % 또는 0.0244 % (w/v)의 농도까지 시험물질을 해당하는 부형제에 4배 연속 희석하여 준비한다. 따라서, 표 2의 예시와

같이 시작 농도에 따라 다양한 희석배수의 용액을 준비하여 시험하게 된다. 시험물질 준비에 사용되는 각각의 부형제는 부형제대조군으로 사용된다. 비처리대조군 및 사멸대조군은 세포생존율 계산에 사용된다. 비처리대조군은 100 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용되며, 사멸대조군은 0 % 세포생존율을 산출하기 위해 사용된다(25단락 참고). 10 % Triton X-100은 EpiSensA에서 사멸대조물질로 사용된다. Triton X-100은 증류수에 10 % (w/v) 용액으로 준비해야 한다. 사멸대조군에 10 % Triton X-100이 아닌 다른 대조물질이 사용되는 경우 해당 물질 사용의 적절한 과학적 근거가 제공되어야 한다.

농도선정 시험을 위한 시험물질 및 대조물질 적용

22. 본 시험(유전자 발현 분석)에서 사용할 농도를 결정하기 위해 각 시험물질 별로 한 번의 시험(Run)이 필요하다. 각 시험물질 농도 및 비처리대조군은 한 개의 RhE 조직, 사멸대조군은 두 개의 조직이 세포생존율 분석에 사용된다(표 2). 시험물질은 시험용액(Working solution)(5 μ L)으로 준비하고, 직접치환 방식(Positive-displacement) 파이펫과 팁을 사용하여 10 % Triton X-100 용액(10 μ L)을 각각의 상피 표면 중앙에 적용한다. 그런 다음 물질을 처리한 조직을 습도가 유지되는 5 % CO₂, 37 °C \pm 1 °C에서 6시간 동안 배양한다.

표 2. 24 well plate를 사용한 농도선정 시험의 plate 배열 예시

1. 비처리	2. 사멸대조군	3. 사멸대조군	13. 시험물질 B 0.012 % w/v	14. 시험물질 B 0.049 % w/v	15. 시험물질B 0.20 % w/v
4. AOO	5. DW	6. 50 % EtOH	16. 시험물질 B 0.78 % w/v	17. 시험물질 B 3.13 % w/v	
7. 시험물질 A 0.024 % w/v	8. 시험물질 A 0.098 % w/v	9. 시험물질 A 0.39 % w/v			
10. 시험물질 A 1.56 % w/v	11. 시험물질 A 6.25 % w/v	12. 시험물질 A 25 % w/v			

AOO: 아세톤:올리브오일; 4:1 v/v

DW: 증류수

50 % EtOH: 증류수에 희석된 50 % v/v 에탄올

세포독성 측정

23. 세포생존율은 formazan dye로 사용한 lactate dehydrogenase(LDH) 분석법으로 측정한다. LDH는 모든 세포 유형에 존재하는 안정적인 세포질 효소(Cytoplasmic enzyme)로, 세포막(Plasma membrane)이 손상되면 세포 배양배지로 배출된다. LDH 분석법은 배출된 LDH로 생산된 formazan dye의 양을 측정한다. LDH 분석법에서 시험물질의 간섭(즉, LDH 반응 억제)에 대한 기준은 TSAR에 설명되어 있다(14).
24. 6시간 노출 후 각 샘플에서 채취한 배지 50 μ L를 96 well plate의 각 well에 넣고 동일부피(50 μ L)의 lactate와 tetrazolium salt을 함유한 기질 용액을 각 well에 추가한다. 이후 plate를 차광하여 실온에서 30분간 배양한 다음 각 well에 1 mol/L hydrochloric acid(HCl) 25 μ L을 넣어 반응을 종료시킨다. 이후 96 well plate 흡광도 측정기를 사용하여 참고 파장(≥ 600 nm)과 함께 490 nm 또는 492 nm에서 각 well의 흡광도를 측정한다. 490 nm 또는 492 nm에서의 흡광도에서 참고 파장의 흡광도를 빼서 $\Delta abs.$ 를 계산한다. 흡광도는 HCl 추가 직후(1시간 미만)에 측정되어야 한다.
25. 아래의 방정식을 활용하여 세포생존율을 계산할 수 있다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = 100 - \frac{\text{시험물질처리군 } \Delta abs. - \text{비처리대조군 } \Delta abs.}{\text{사멸대조군 평균 } \Delta abs. - \text{비처리대조군 } \Delta abs.} \times 100$$

26. 사용하려는 시험물질에 LDH 분석법을 적용할 수 없는 경우 다른 세포독성시험법(예: MTT 분석법 또는 ATP 분석법)을 사용할 수 있다. MTT 분석법에서 세포 속 미토콘드리아 대사의 활성화는 생체염료 MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue; CAS number 298-93-1]가 청색 formazan으로 효소 전환된 것을 조직에서 추출하여 정량적으로 측정한다. ATP 분석법은 균질화 방법(Homogeneous method)으로, 조직을 분쇄하여 조직 내 ATP를 정량화하여 살아있는 세포 수를 측정한다. 그러므로 total RNA는 MTT 분석법 또는 ATP 분석법에 사용되는 조직으로부터 분리할 수 없다. 이러한 이유로 MTT 분석법이나 ATP 분석법을 사용하는 경우 유전자 발현 분석에 사용되는 조직과 별개로 세포독성 측정에 사용되는 조직이 필요하다. 유사시험법평가기준(6)에 근거하여 충분한 과학적 근거를 제공할 수 있는 경우 다른 방법(예: XTT 분석법)을 사용할 수 있다.

본 시험(유전자 발현 분석)

본 시험을 위한 시험물질 및 대조물질 준비

27. 시험물질은 적절한 부형제(AOO, 증류수 또는 50 % EtOH; 19단락 참고)에 용해되거나 안정적으로 분산되어야 한다. 각 시험물질에 대한 농도선정 시험에서 세포생존율 80 % 미만인 최저농도를 본 시험에서 최고농도(즉, 시작 농도)로 사용해야 하며 음성 판정(39단락 참고)에 사용한다. 농도선정 시험에서 시험된 모든 농도에서 세포생존율이 80 % 이상인 경우 해당 시험물질의 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도를 시작 농도로 사용해야 한다. 시작 농도를 기반으로 각 시험물질에 해당하는 부형제로 2배 연속 희석하여 시험용액을 준비한다. 농도선정 시험에서 세포생존율 80 % 미만인 최저농도 또는 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도를 포함한 최소 세 개 농도가 사용되어야 한다. 이러한 조건을 충족하지 못하는 시험물질은 한 개 또는 두 개의 농도로 시험될 수 있다(즉, 본 시험에서 최고농도는 0.0122 % 또는 0.0244 % (w/v)이다). 용해도 확인에서 결정된 농도가 0.0122 % 또는 0.0244 % (w/v)인 경우, 두 개의 농도[0.0122 % 및 0.0244 % (w/v)] 또는 하나의 농도[0.0122 % (w/v)]만이 사용될 수 있다. 마찬가지로, 농도선정 시험에서 세포생존율 80 % 미만인 최저농도가 0.0122 % 또는 0.0244 % (w/v)인 경우 두 개의 농도[0.0122 % 및 0.0244 % (w/v)] 또는 하나의 농도[0.0122 % (w/v)]만이 사용될 수 있다. 이러한 경우 양성반응은 시험물질을 피부감작성물질로 식별함에 있어 사용될 수 있으며, 그렇지 않은 경우 그 결과는 명확한 예측불가(Inconclusive)로 간주해야 한다(39단락 예측모델 참고). 부형제대조군은 21단락에 설명된 것과 동일하게 준비한다. Clotrimazole(CAS no. 23593-75-1, 순도 98 % 이상) 및 4-nitrobenzyl bromide(4-NBB)(CAS no. 100-11-8, 순도 98 % 이상)이 EpiSensA에서 양성대조군으로 사용되며, 0.78 % (w/v) clotrimazole 및 0.10 % (w/v) 4-NBB 용액을 AOO에 용해하여 준비한다(시험용액). 세포생존율 계산을 위해 비처리대조군 및 사멸대조군을 21단락에 기술된 것과 동일하게 준비한다. 사멸대조물질로 10 % Triton X-100를 사용하지 않는 경우 다른 물질의 사용에 대한 적절한 과학적 근거가 제공되어야 한다.

본 시험을 위한 시험물질 및 대조물질 적용

28. 각 시험물질 별로 예측결과를 얻기 위해 한 번의 시험(Run)이 필요하다. 유전자 발현 분석을 위해서는 각 시험물질 농도 및 양성대조군, 부형제대조군에 대해 세 개의 조직, 사멸대조군에 대해 두 개의 조직 및 비처리대조군에 대해 한 개의 조직이 사용된다. 조직의 수와는 별개로 시험물질 적용은 22단락에 기술된 것과 같이 동일한 조건에서 수행된다(표 3).

표 3. 본 시험을 위한 plate 배열의 예시

1. 비처리	2. 사멸대조군	3. 사멸대조군	13. 시험물질 1.56 % w/v	14. 시험물질 1.56 % w/v	15. 시험물질 1.56 % w/v
4. AOO	5. AOO	6. AOO	16. 시험물질 A 3.13 % w/v	17. 시험물질 A 3.13 % w/v	18. 시험물질 A 3.13 % w/v
7. Clotrimazole 0.78 % w/v	8. Clotrimazole 0.78 % w/v	9. Clotrimazole 0.78 % w/v	19. 시험물질 A 6.25 % w/v	20. 시험물질 A 6.25 % w/v	21. 시험물질 A 6.25 % w/v
10. 4-NBB 0.10 % w/v	11. 4-NBB 0.10 % w/v	12. 4-NBB 0.10 % w/v			

AOO: acetone: olive oil; 4:1 v/v, 4-NBB: 4-nitrobenzyl bromide

세포독성 측정

29. 시험물질에 6시간 노출 후 23~26단락에 기술된 것과 같이 세포생존율을 결정한다.

RNA 분리

30. 유전자 발현 분석을 위해 조직 표면을 0.5 mL의 Phosphate-buffered saline(PBS)으로 3회 세척하고, 시험법 개발 및 검증에서 사용된 두 가지 용해(Lysis) 방법 중 하나를 선정하여 조직을 수집 및 파쇄한다[TRIzol 시약과 볼텍스 믹서(Vortex mixer) 또는 shredder column과 원심분리기].

31. 상업적으로 이용할 수 있는 키트와 시약(예: 시험법 개발 및 검증에서 사용된 RNeasy Mini kit)을 사용하여 mRNA를 포함한 total RNA를 파쇄된 RhE 조직 샘플에서 분리한다.

32. RNA 농도를 정량화하고, 장비 공급자가 제공하는 아래의 시험법에 따라 RNA 분석장비[예: NanoDrop™(Thermo Fisher Scientific)]를 사용하여 각 샘플에서 RNA 품질을 분석한다. Complementary DNA(cDNA) 합성에는 500 ng 이상의 RNA가 필요하다. RNA 농도 및 품질은 이후의 RT-qPCR에 사용되는 시약의 공급자가 기술한 권고사항과 일치해야 한다(예: RNA 농도 100 ng/μL 이상 및 A260/A280 1.8~2.0 범위 이내).

RT-qPCR

33. cDNA는 상업적으로 이용할 수 있는 시약을 사용하여 합성한다(예: 본 시험법의 개발 및 검증에 사용된 Superscript III First-Strand Synthesis System 등).
34. cDNA 합성 이후 마커유전자(*ATF3*, *GCLM*, *DNAJB4* 및 *IL-8*) 및 내인성대조유전자(*GAPDH*)의 발현 수준을 RT-qPCR로 분석한다. EpiSensA 표준작업지침서(14)에 기술된 방법(TaqMan Gene Expression Assay 및 TaqMan Universal PCR Master Mix)을 사용해야 한다. 적절한 과학적 근거를 제공하는 경우 유전자 발현 분석에 다른 시약을 사용할 수 있다. PS(6)를 바탕으로 충분한 과학적 근거가 제공되는 경우 유전자 발현의 변화를 정량화하는 다른 방법을 사용할 수 있다.

데이터 및 결과 보고

데이터 평가

35. 상대적 유전자 발현은 RT-qPCR을 사용하여 분석된다. 임계사이클(Threshold cycle, Ct) 값을 기반으로 아래의 방정식에 따라 유도배수 ΔCt 및 $\Delta\Delta Ct$ 값을 계산한다.

$$\text{마커유전자의 } \Delta Ct \text{ 값} = \text{마커유전자의 } Ct \text{ 값} - \text{GAPDH의 } Ct \text{ 값}$$

$$\text{마커유전자의 } \Delta\Delta Ct \text{ 값} = \text{마커유전자의 } \Delta Ct \text{ 값} - \text{마커유전자(부형제대조군)의 } \Delta Ct \text{ 값}$$

$$\text{유도배수} = 2^{-\text{마커유전자의 } \Delta\Delta Ct \text{ 값}}$$

또한, 25단락에 제공된 방정식에 따라 세포생존율을 계산한다.

인정기준

36. 시험(Run)의 유효성을 인정받기 위해 아래의 인정기준을 충족해야 한다.

- 부형제대조군 조직 두 개 이상의 세포생존율이 95 % 이상이어야 한다. 한 개의 부형제대조군만이 세포생존율 95 % 미만인 경우 나머지 두 개의 조직에서 획득한 Ct 값이 사용되어야 한다.
- 두 개의 양성대조군 모두[0.78 %(w/v) clotrimazole 및 0.10 %(w/v) 4-NBB]에서 세포생존율은 80 % 이상이어야 한다.
- 0.78 %(w/v) clotrimazole 양성대조군에서 *ATF3* 및 *IL-8*의 평균 유도배수 값은 컷오프 값을 초과해야 한다(즉, *ATF3*의 유도배수 값이 15를 초과하고, *IL-8*의 유도배수 값이 4를 초과해야 한다).
- 0.10 %(w/v) 4-NBB 양성대조군에서 *GCLM* 및 *DNAJB4*의 평균 유도배수 값은 컷오프 값을 초과해야 한다(즉, *GCLM*의 유도배수 값이 2를 초과하고, *DNAJB4*의 유도배수 값이 2를 초과해야 한다).

37. 시험된 농도의 결과가 유효한 것으로 인정받기 위해서 아래의 인정기준을 충족해야 한다.

- 최소 한 개의 시험농도에서 평균 세포생존율이 80 % 이상이어야 한다. 시험된 농도에서 평균 세포생존율이 80 % 미만인 경우 해당 농도의 결과는 양성예측에서 제외되어야 하지만(42단락의 구체적 예시 참고) 음성예측에는 사용될 수 있다(39단락 참고).
- 특정 시험물질 농도의 평균 *GAPDH* Ct 값이 해당 부형제대조군 *GAPDH* Ct 값의 평균 ± 1 내의일 때 해당 농도에서 얻은 결과는 인정할 수 있다.

예측모델

38. 각 시험물질은 예측(양성 또는 음성)을 위해 한 번의 시험(Run)으로 평가된다. 아래의 조건 중 하나 이상이 충족되는 경우 EpiSensA 예측은 양성으로 간주된다.

- 최소 하나의 시험농도에서 *ATF3*의 $I_{\max} > 15$
- 최소 하나의 시험농도에서 *GCLM*의 $I_{\max} > 2$
- 최소 하나의 시험농도에서 *DNAJB4*의 $I_{\max} > 2$
- 최소 하나의 시험농도에서 *IL-8*의 $I_{\max} > 4$

39. 아래의 세 가지 조건이 충족되는 경우 EpiSensA의 예측은 음성으로 간주된다.

- 모든 시험농도에서 마커유전자의 평균 유도배수 값이 모든 네 개의 유전자에 대한 각각의 컷오프 값을 초과하지 않는다.
- 최소 세 개의 농도가 시험되어야 한다.
- 시험농도에서 최소 한 개의 평균 세포생존율이 80 % 미만이다.

본 시험의 최고농도가 0.0244 % 또는 0.0122 %(w/v)인 경우 그 결과는 음성이 아닌 명확한 예측불가(Inconclusive)로 간주한다(27단락 참고).

40. 네 가지 유전자의 평균 유도배수 값이 시험농도에서 각각의 컷오프 값을 초과하지 않지만, 모든 시험농도에서 평균 세포생존율이 80 % 이상인 경우가 발생할 수 있다. 이러한 경우 본 시험에서의 최고농도가 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도와 동일하다면 해당 시험물질의 시험결과는 음성으로 판정한다. 그러나 본 시험에서 최고농도가 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도보다 낮은 경우 첫 번째 본 시험에 사용된 최고농도보다 높은 농도에서 시험물질을 2배 연속 희석하여 추가적인 본 시험을 진행해야 한다(그림 1). 이러한 추가시험에서 최대 용해농도 또는 안정적 분산농도에서 평균 세포생존율이 80 % 미만이거나(고체물질) 100 %인 경우(액체물질) 해당 결과는 음성으로 판정한다.

41. 0.0122 %(w/v) 이상의 시험농도에서 모든 평균 세포생존율이 80 % 미만인 경우 해당 물질의 예측은 명확한 예측불가(Inconclusive)로 간주한다.

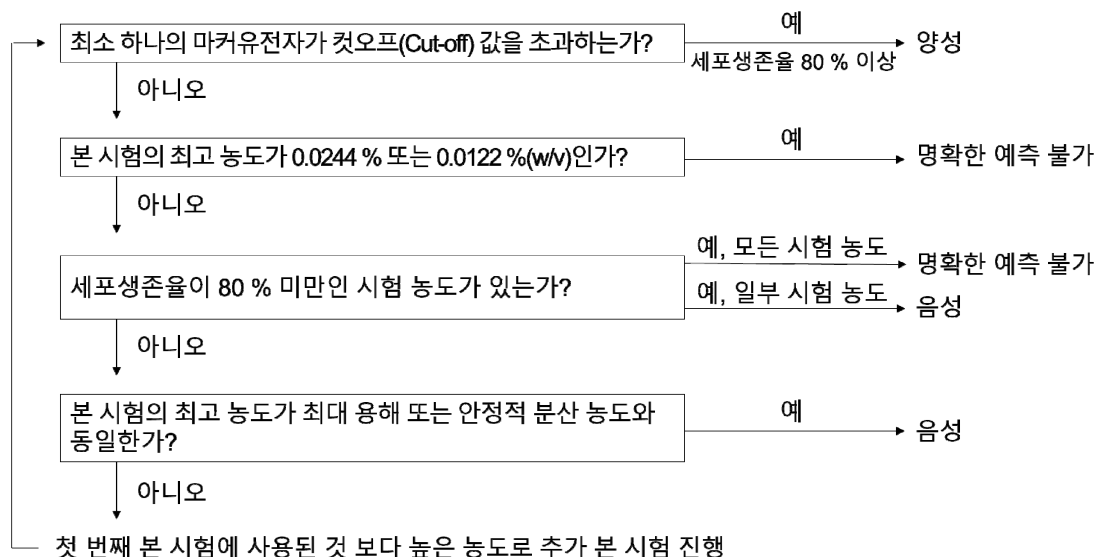


그림 1. EpiSensA 예측모델의 요약 흐름도

42. 평균 세포생존율 80 % 미만을 나타내는 최저농도에서만 유도배수 값이 컷오프 값을 초과하는 경우가 발생할 수 있다. 이 경우 세포독성 수준(평균 세포생존율 80 % ~ 95 %)에서 유도가 발생했는지를 결정하기 위해 더 좁은 범위의 농도-반응 분석 및 더 낮은 희석계수[예: $\sqrt{2}$ (≈ 1.41)배 희석]를 사용하여 해당 시험물질을 재시험해야 한다.

시험보고서

43. 시험결과 보고서는 다음의 정보를 포함해야 한다.

시험물질

단일성분물질

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 및/또는 배치/로트 번호 및 유효기간 등의 기타 식별자를 포함한 화학물질 식별정보
 - 물리적 성상, 수 용해도, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 특성(확보 가능한 범위에서)
 - 순도, 불순물의 화학적 정보 등을 적절하고 실질적으로 가능한 수준까지
 - 해당하는 경우, 시험 전처리 방법(예: 가온, 분쇄 등)
 - 시험에 사용된 농도

- 보관 조건 및 안정성(확보 가능한 범위에서)
- 각 시험물질의 부형제 선정 근거

다성분물질, UVCB 및 혼합물

- 가능한 많은 특성정보, 예를 들어 화학적 정보(위의 내용 참고), 순도 및 성분의 정량적 상태(Quantative occurrence)와 구성성분과 관련된 물리·화학적 특성(위의 내용 참고)
- 물리적 성상, 수 용해도 및 추가적인 관련 물리·화학적 특성(확보 가능한 범위에서)
- 조성이 알려진 혼합물/중합체의 경우 분자량 또는 겉보기 분자량(Apparent molecular weight) 또는 기타 시험 수행과 관련된 정보
 - 해당하는 경우, 시험 전처리 방법(예 가온, 분쇄 등)
 - 시험에 사용된 농도
 - 보관 조건 및 안정성(확보 가능한 범위에서)
 - 각 시험물질의 부형제 선정 근거

대조군

양성대조군

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 식별자 등 화학물질 식별정보
- 물리적 성상, 수용해도, 분자량 및 추가적인 관련 물리·화학적 특성(확보 가능한 범위에서)
 - 순도, 불순물의 화학적 정보(적절하고 실질적으로 가능한 수준까지)
 - 적용한 경우, 시험 전처리 방법(예: 가온, 분쇄 등)
 - 시험에 사용된 농도
 - 보관 조건 및 안정성(확보 가능한 범위에서)
- 해당하는 경우 적합한 시험(Run) 인정기준을 보여주는 과거 양성대조군 결과에 대한 참고자료

부형제대조군

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, 및/또는 식별자 등 화학물질 식별정보
 - 순도, 불순물의 화학적 정보(적절하고 실질적으로 가능한 수준까지)
- 본 문서에 언급된 것과 다른 부형제대조군을 사용하는 경우 물리적 성상, 분자량 및 추가적인 관련 물리·화학적 특성(확보 가능한 범위에서)
- 보관 조건 및 안정성(확보 가능한 범위에서)
 - 각 시험물질의 부형제 선정 근거

시험조건

- 시험의뢰자, 시험기관 및 시험책임자의 이름과 주소
- 사용된 시험법에 대한 설명
- 사용된 RhE 모델(배치번호 포함)
- 490(또는 492) nm 및 ≥ 600 nm 측정 가능 필터를 장착한 96 well plate 흡광도 측정기
- 사용된 RNA 추출방법
- RNA 농도 측정을 위한 분광광도계
- 사용된 열순환기(Thermal cycler) 및 장비 세팅, 프라이머(Primer) 및 Reverse transcription(RT), PCR 시약 등을 포함한 RT-qPCR 체계(모델명)
- 해당 모델의 과거 데이터의 참고자료. 여기에는 최소 과거 배치데이터에 대한 참고자료와 함께 QC 데이터의 인정 가능성이 포함되어야 한다.
- 본 시험법 수행에 대한 실험실의 숙련도에 대한 자료(숙련도 시험물질 시험) 또는 시간 경과에 따른 시험법의 재현성 증명에 대한 자료

시험 절차

- 시험물질 농도, 적용 절차 및 사용된 노출시간(권고된 것과 다른 노출시간 사용의 경우)
- 사용된 평가 및 판정기준에 대한 설명
- 사용된 시험 인정기준에 대한 설명
- 모든 시험절차 변경사항에 대한 설명

결과

- 시험물질 및 양성대조군에서 얻은 C_t , ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$, 유도배수 및 세포생존율 값을 포함한 데이터의 표, 예측모델에 따른 시험물질 등급 표시
- 유전자 발현 유도 및 세포생존율의 농도-반응 곡선을 보여주는 그래프
- 기타 관련 관찰 결과에 대한 설명(해당하는 경우)

결과의 논의

- EpiSensA로 얻은 결과에 대한 논의

결론

참고문헌

- (1) OECD (2012)10/PART1. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. Part 1: Scientific evidence. Series on Testing and Assessment. ENV/JM. Mono, 168.
- (2) Saito, K., Nukada, Y., Takenouchi, O., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., Nishiyama, N. (2013). Development of a new in vitro skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicology in Vitro*, 8, 2213-24, doi: 10.1016/j.tiv.2013.08.007.
- (3) 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. *Toxicology in Vitro*. 40, 11-25. doi: 10.1016/j.tiv.2016.12.005.
- (4) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at:
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (5) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 383: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Peer review Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (6) OECD (2024). Series on Testing & Assessment No 396: Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) test methods; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.)
- (7) OECD (2005), OECD Series on Testing and Assessment No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.

- (8) Mizumachi, H., Sakuma, M., Ikezumi, M., Saito, K., Takeyoshi, M., Imai, N., Okutomi, H., Umetsu, A., Motohashi, H., Watanabe, M., Miyazawa, M. (2018). Transferability and within- and between- laboratory reproducibilities of EpiSensA for predicting skin sensitization potential in vitro: A ring study in three laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1233-1243. doi: 10.1002/jat.3634.
- (9) Mizumachi, H., Watanabe, M., Ikezumi, M., Kajiware, M., Yasuda, M., Mizuno, M., Imai, N., Sakuma, M., Shibata, M., Watanabe, S., Motoyama, J., Basketter, D., Eskes, C., Hoffmann, S., Lehman, D., Ashikaga, T., Sozu, T., Takeyoshi, M., Suzuki, S., Miyazawa, M., Kojima, H. (2024), The inter-laboratory validation study of EpiSensA for predicting skin sensitization potential. *Journal of Applied Toxicology*, 44(4), 510-525. doi: 10.1002/jat.4559.
- (10) Mizumachi, H., Suzuki, S., Sakuma, M., Natsui, M., Imai, N., Miyazawa, M. (2024), Reconstructed human epidermis-based Testing Strategy of skin sensitization hazard and potency classification using EpiSensA and in silico data. *Journal of Applied Toxicology*, 44(3), 415-427. doi: 10.1002/jat.4551
- (11) OECD (2023), Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>
- (12) Kazem, S., Linssen, EC., Gibbs, S. (2019). Skin metabolism phase I and phase II enzymes in native and reconstructed human skin: a short review. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1899-1910, doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.002.
- (13) Oesch, F., Fabian, E., Landsiedel, R. (2018). Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology*, 92(8), 2411-2456. doi: 10.1007/s00204-018-2232-x.
- (14) EURL ECVAM. (2023). EpiSensA standard operating procedure. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2018-01-0>.
- (15) OECD (2021), Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>

부록 IC-부속서 1. 숙련도물질

In Vitro Skin Sensitisation: Epidermal Sensitisation Assay(EpiSensA)

시험가이드라인 442D의 본 부속서에 기술된 시험법의 일상적 사용에 앞서, 실험실에서는 표 1에 권장된 10종의 숙련도물질의 4개 농도 중 최소 3개를 시험하여 기술적 숙련도를 증명해야 한다. 이때, 각 마커유전자 별로 획득한 결과는 숙련도물질 10종 중 8종에서 표 1에 제시된 것과 일치해야 한다. 이들 숙련도물질은 피부감작성 유해성 반응 범위를 대표하도록 선정되었다. 이외의 선정기준은 상업적으로 이용할 수 있을 것, 전문적으로 선별된 생체내(*in vivo*) 참고물질 데이터 및 고품질의 EpiSensA 데이터가 있을 것, 사전검증 공동연구(Pre-validation ring study) 또는 JaCVAM 주도 검증연구에서 사용된 물질일 것 등이 있다.

표 1. EpiSensA의 기술적 숙련도 증명에 권장되는 물질

번호	숙련도물질	CAS 번호	물리적 성상	생체내(<i>in vivo</i>) 예측 ¹	부형제	시험농도 (w/v%)	각 마커유전자에 대한 EpiSensA 결과 ²			
							ATF3	GCLM	DNAJB4	IL-8
1	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	고체	감작성 (GHS Cat. 1A)	AOO	0.39, 0.20, 0.10, 0.05	p	p	p	p/n
2	p-Phenylenediamine	106-50-3	고체	감작성 (GHS Cat. 1A)	AOO	1.56, 0.78, 0.39, 0.20	p/n	p	p	p/n
3	Methyl heptine carbonate	111-12-6	액체	감작성 (GHS Cat. 1A)	AOO	3.13, 1.56, 0.78, 0.39	p	p	p	p
4	Metol	55-55-0	고체	감작성 (GHS Cat. 1A)	DW	3.13, 1.56, 0.78, 0.39	p	p	p	p/n
5	Abietic acid	514-10-3	고체	감작성 (GHS Cat. 1B)	AOO	12.5, 6.25, 3.13, 1.56	p	p	p	p
6	Farnesol	4602-84-0	액체	감작성 (GHS Cat. 1B)	AOO	12.5, 6.25, 3.13, 1.56	p	p/n	p	p
7	Amyl cinnamic aldehyde	122-40-7	액체	감작성 (GHS Cat. 1B)	AOO	100, 50, 25, 12.5	p	n	p	p
8	Cetrimide	57-09-0	고체	비감작성 (분류되지않음)	50 % EtOH	1.56, 0.78, 0.39, 0.20	n	n	n	n
9	Lactic acid ³	50-21-5	액체	비감작성 (분류되지않음)	DW	6.25, 3.13, 1.56, 0.78	n	n	n	n
10	Hexane	110-54-3	액체	비감작성 (분류되지않음)	AOO	100, 50, 25	n	n	n	n

¹: 생체내(*in vivo*) 유해성 및 역가예측(Potency prediction)은 LLNA 데이터(TG497, SD annex 3)(Urbisch, 2015)에 기반한다. 생체내(*in vivo*) 역가는 UN GHS Sub-categorisation에 기반한 인정기준을 사용하여 산출되었다.

²: 'p'는 마커유전자의 유도배수가 컷오프 값을 초과하며, 세포생존율이 80 % 이상임을 나타낸다. 'n'은 마커유전자의 유도배수가 컷오프 값을 초과하지 않지만, 세포생존율이 80 % 이상임을 나타낸다. 'p/n'은 'p'와 'n' 둘 다 인정 가능하다는 것을 의미한다.

³: LDH 분석법 대신 MTT 분석법이 수행되어야 한다.

부록 IC-부속서 2. 숙련도물질의 I_{\max} 범위

아래의 값은 정보 목적으로 제공되며, 검증연구(1)와 사전검증 공동연구(2)에서 실험실이 획득한 범위를 반영한다. 이들 범위는 시험가이드라인의 일부는 아니지만 실험실이 EpiSensA를 일상적으로 사용하기 전 처음으로 확립하는 경우 유용할 수 있다.

표 1. 숙련도물질로부터 얻은 각각의 마커유전자의 I_{\max} 범위

번호	숙련도물질	CAS 번호	생체내(<i>in vivo</i>) 예측 ¹	N ²	각 마커유전자에 대한 I_{\max} 범위			
					<i>ATF3</i>	<i>GCLM</i>	<i>DNAJB4</i>	<i>IL-8</i>
1	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	감작성 (GHS Cat. 1A)	9	30.4-133.2	6.4-18.9	6.2-17.3	2.9-5.9
2	p-Phenylenediamine	106-50-3	감작성 (GHS Cat. 1A)	8	2.4-66.1	11.1-24.3	4.6-22.3	0.8-3.5
3	Methyl heptine carbonate	111-12-6	감작성 (GHS Cat. 1A)	8	113.9-823	9.5-84	40.8-175.7	9.5-74.4
4	Metol	55-55-0	감작성 (GHS Cat. 1A)	9	130.7-460.5	11.6-22.6	16.6-35.9	3.2-8.0
5	Abietic acid	514-10-3	감작성 (GHS Cat. 1B)	7	74-410	2.9-4.9	2.9-5.8	39.4-153.9
6	Farnesol	4602-84-0	감작성 (GHS Cat. 1B)	7	48.4-378.2	0.7-5.3	2.9-5.8	90.4-547.9
7	Amyl cinnamic aldehyde	122-40-7	감작성 (GHS Cat. 1B)	3	116.1-250.7	1-1.3	3.1-5.2	163.8-265.5
8	Cetrimide	57-09-0	비감작성 (분류되지않음)	9	1.2-8.3	0.6-1.4	0.6-1.4	1.6-3.0
9	Lactic acid	50-21-5	비감작성 (분류되지않음)	7	1.1-2.5	1.1-1.5	0.9-1.2	1.5-3.1
10	Hexane	110-54-3	비감작성 (분류되지않음)	9	1.4-5.6	0.7-1.8	0.7-1.3	1-1.7

¹: 생체내(*in vivo*) 유해성 및 역가예측(Potency prediction)은 LLNA 데이터(TG497, SD annex 3)(Urbisch, 2015)에 기반한다. 생체내(*in vivo*) 역가는 UN GHS Sub-categorisation에 기반한 인정기준을 사용하여 산출되었다.

²: I_{\max} 범위를 계산한 EpiSensA 결과의 수

- (1) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at:
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (2) Mizumachi, H., Sakuma, M., Ikezumi, M., Saito, K., Takeyoshi, M., Imai, N., Okutomi, H., Umetsu, A., Motohashi, H., Watanabe, M., Miyazawa, M. (2018). Transferability and within- and between- laboratory reproducibilities of EpiSensA for predicting skin sensitization potential in vitro: A ring study in three laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1233-1243. doi: 10.1002/jat.3634.

III

원문(OECD TG442D, 서론)

OECD/OCDE

442D

Adopted:

30 June 2022

Updated: 25 June 2024

*OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS**In vitro skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Keratinocyte activation*

GENERAL INTRODUCTION

Keratinocyte activation Key Event based Test Guideline

1. A skin sensitizer refers to a substance that will lead to an allergic response following repeated skin contact as defined by the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) (1). There is general agreement on the key biological events underlying skin sensitisation. The current knowledge of the chemical and biological mechanisms associated with skin sensitisation has been summarised as an Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), starting with the molecular initiating event through intermediate events to the adverse effect, namely allergic contact dermatitis. This AOP focuses on chemicals that react with thiol (i.e. cysteine) and primary amines (i.e. lysine) such as organic chemicals. In this instance, the molecular initiating event (i.e. the first key event) is the covalent binding of electrophilic substances to nucleophilic centres in skin proteins. The second key event in this AOP takes place in the keratinocytes and includes inflammatory responses as well as changes in gene expression associated with specific cell signalling pathways such as the antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways. The third key event is the activation of dendritic cells, typically assessed by expression of specific cell surface markers, chemokines and cytokines. The fourth key event is T-cell proliferation.

2. This Test Guideline describes *in vitro* assays that address mechanisms described under the second Key Event of the AOP for skin sensitisation, namely keratinocyte activation (2). The Test Guideline comprises test methods to be used for supporting the discrimination between skin sensitizers and non-sensitizers in accordance with the UN GHS (1). The test methods currently described in this Test Guideline include two *in vitro* ARE-Nrf2 luciferase test methods and a test method based on gene expression quantification:

- The ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ test method (Appendix IA),
- The ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (Appendix IB),
- The Epidermal Sensitisation Assay – EpiSensA (Appendix IC).

3. These three test methods have been considered scientifically valid. The KeratinoSens™ test method first underwent a validation study followed by an independent peer-review by EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) and positive recommendations by EURL ECVAM, and is considered the validated reference method (VRM) with regards to ARE-Nrf2 luciferase test methods (3) (4) (5) (6). The LuSens test method later underwent a Performance Standard-based validation study based on which it was also reviewed and received positive opinion by ESAC (7) (8) (9) (10). The EpiSensA underwent validation studies (11) followed by an independent peer review (12) conducted by the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM). It is considered a VRM with regards to test methods quantifying changes in the expression of marker genes associated with keratinocyte activation (*ATF3*, *IL-8*, *GCLM*, and *DNAJB4*), using Reverse Transcription-quantitative PCR in reconstructed human epidermis (RhE) models. Performance Standards (13) are available for this type of method too, to facilitate the validation and assessment of similar and modified RhE-based test methods.

© OECD, (2024)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at <http://www.oecd.org/termsandconditions/>

OECD/OCDE

442D

Background and principles of the test methods included in the Key Event based Test Guidelines

4. The assessment of skin sensitisation has historically involved the use of laboratory animals. The classical methods that use guinea-pigs, the Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) of Magnusson and Kligman and the Buehler Test (OECD TG 406) (14), assess both the induction and elicitation phases of skin sensitisation. The murine tests, the LLNA (OECD TG 429) (15) and its three non-radioactive modifications, LLNA: DA (OECD TG 442A) (16) as well as LLNA: BrdU-ELISA and BrdU-FCM (OECD TG 442B) (17), all assess the induction response exclusively, and have gained acceptance since they provide an advantage over the guinea pig tests in terms of animal welfare together with an objective measurement of the induction phase of skin sensitisation.

5. Mechanistically-based in chemico and in vitro test methods addressing the first three key events of the skin sensitisation AOP have been adopted for contributing to the evaluation of the skin sensitisation hazard potential of chemicals: the OECD TG 442C describes the Direct Peptide Reactivity Assay (18) addressing the first key event; the present Test Guideline assesses keratinocyte activation addressing the second key event and the OECD TG 442E addresses the activation of dendritic cells, the third key event of the skin sensitisation AOP (16). Finally, the fourth key event representing T-cell proliferation is indirectly assessed in the murine Local Lymph Node Assay (LLNA) (15). It should be noted that not all key events need to be assessed to determine a skin sensitisation categorisation.

6. As keratinocyte activation represents only one key event of the skin sensitisation AOP (2) (20), information generated with test methods developed to address this specific key event may not be sufficient to conclude on the presence or absence of skin sensitisation potential of chemicals. Therefore data generated with the test methods described in this Test Guideline are proposed to support the discrimination between skin sensitisers (i.e. UN GHS Category 1) and non-sensitisers when used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), together with other relevant complementary information, e.g. derived from in vitro assays addressing other key events of the skin sensitisation AOP as well as non-testing methods, including read-across from chemical analogues (20). Examples on the use of data generated with these methods within Defined Approaches, i.e. approaches standardised both in relation to the set of information sources used and in the procedure applied to derive predictions have been published (20) and are implemented in an OECD TG on defined approaches for skin sensitisation. If the intention is to use the data from these methods in a defined approach for skin sensitisation then refer to Test Guideline 497 for application of borderline criteria or other data interpretation procedures (21). For details on the application of the borderline criteria, refer to the Appendix IA, Figure 1.

7. The test methods described in this Test Guideline cannot be used on their own, neither to sub-categorise skin sensitisers into subcategories 1A and 1B as defined by UN GHS (1), for authorities implementing these two optional subcategories, nor to predict potency for safety assessment decisions. However, depending on the regulatory framework, positive results generated with these methods may be used on their own to classify a chemical into UN GHS category 1.

8. The test methods included in this Test Guideline might differ with regard to the procedures, the applicability domain and the limitations, but can each be used to address countries' requirements for test results on the keratinocytes activation Key Event of the AOP for skin sensitisation while benefiting from the Mutual Acceptance of Data. In the context of Defined Approaches (DAs), methods are not automatically interchangeable; it is specified in TG 497 which methods/combination of methods should be used.

9. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is being tested¹ and is not related to the applicability of the test methods to the testing of mono-constituent substances, multi-constituent substances and/or mixtures. When testing in submerged cultures, it should be determined that the test chemical is dissolved in the exposure medium or at least forms a stable dispersion (e.g. by visual inspection

¹ In June 2013, the Joint Meeting agreed that where possible, a more consistent use of the term "test chemical" describing what is being tested should be applied in new and updated Test Guidelines.

OECD/OCDE

442D

of the test chemical dissolved/prepared at the maximal final test concentration in the exposure medium, showing that no undissolved residues remain and that no precipitate or phase separation forms if the solution is left to settle for several hours).

10. Limited information is currently available on the applicability of the test methods to multi-constituent substances/mixtures (22) (23) (24). Although not evaluated in the validation studies, the test methods may nevertheless be technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures. When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are meaningful scientifically. Moreover, when testing multi-constituent substances or mixtures, consideration should be given to possible interference of cytotoxic constituents with the observed responses (e.g. the presence of a high content of non-sensitising cytotoxic constituents may mask the response of weakly sensitising components or sensitising components present at low concentration). It might, depending on the particular case, be scientifically justified to test either single main constituents forming the major fraction or several fractions of the mixture to conclude on the sensitisation potential of the complex mixture.

Literature

- 1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html
- 2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 3) Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- 4) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- 5) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.
- 6) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.
- 7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro* 28, 1482-1497.
- 8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* 32, 278-286.

OECD/OCDE

442D

- 9) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf].
- 10) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- 11) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 12) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 383: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Peer review Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 13) OECD (2024). Series on Testing & Assessment No 396: Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) test methods; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 14) OECD (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 15) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitization: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 16) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 17) OECD (2018). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 18) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 19) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on Activation of Dendritic Cells. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 20) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: 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, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/MONO\(2016\)29](https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- 21) OECD (2023). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>.
- 22) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology In Vitro 27, 1220-1225.
- 23) Kolle, S.N., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2013). Alternative method in practice: Post-validation experience of the skin sensitization in vitro test strategy. Toxicology Letters 221, S204.

OECD/OCDE**442D**

- 24) Settivari RS, Gehen SC, Amado RA, Visconti NR, Boverhof DR, Carney EW (2015). Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. Regul Toxicol Pharmacol; 72(2):350-60.

OECD/OCDE

442D

Annex: DEFINITIONS

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of "relevance." The term is often used interchangeably with "concordance", to mean the proportion of correct outcomes of a test method (3).

AOP (Adverse Outcome Pathway): sequence of events from the chemical structure of a target chemical or group of similar chemicals through the molecular initiating event to an in vivo outcome of interest (2).

ARE: Antioxidant response element (also called EpRE, electrophile response element), is a response element found in the upstream promoter region of many cytoprotective and phase II genes. When activated by Nrf2, it mediates the transcriptional induction of these genes.

CV: Cell viability

Coefficient of variation: a measure of variability that is calculated for a group of replicate data by dividing the standard deviation by the mean. It can be multiplied by 100 for expression as a percentage.

CV75: The estimated concentration resulting in 75% cell viability.

EC1.5: Interpolated concentration resulting in a 1.5 fold luciferase induction.

Fold luciferase activity induction: Represents the ratio of luminescence of treated cells (minus blank) over the luminescence of the cells exposed to the concurrent solvent/vehicle control (minus blank).

IC30: Concentration effecting a reduction of cellular viability by 30%.

IC50: Concentration effecting a reduction of cellular viability by 50%.

Hazard: Inherent property of an agent or situation having the potential to cause adverse effects when an organism, system or (sub) population is exposed to that agent.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): A structured approach used for hazard identification (potential), hazard characterisation (potency) and/or safety assessment (potential/potency and exposure) of a chemical or group of chemicals, which strategically integrates and weighs all relevant data to inform regulatory decision regarding potential hazard and/or risk and/or the need for further targeted and therefore minimal testing.

Imax: Maximal induction factor of luciferase activity compared to the solvent (negative) control measured at any test chemical concentration.

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, is a sensor protein that can regulate the Nrf2 activity. Under un-induced conditions the Keap1 sensor protein targets the Nrf2 transcription factor for ubiquitinylation and proteolytic degradation in the proteasome. Covalent modification of the reactive cysteine residues of Keap 1 by small molecules can lead to dissociation of Nrf2 from Keap1 (4) (5) (6).

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more substances in which they do not react (1).

Mono-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which one main constituent is present to at least 80% (w/w).

Multi-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which more than one main constituent is present in a concentration $\geq 10\%$ (w/w) and $< 80\%$ (w/w). A multi-constituent substance is the result of a manufacturing process. The difference between mixture and multi-constituent substance is that a mixture is obtained by blending of two or more substances without chemical reaction. A multi-constituent substance is the result of a chemical reaction.

OECD/OCDE

442D

Negative control: A sample containing all components of a test system and treated with a substance known not to induce a positive response in the test system. This sample is processed with test chemical-treated samples and other control samples.

Nrf2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, is a transcription factor involved in the antioxidant response pathway. When Nrf2 is not ubiquitinated, it builds up in the cytoplasm and translocates into the nucleus, where it combines to the ARE in the upstream promoter region of many cytoprotective genes, initiating their transcription (4) (5) (6).

Performance standards: Standards, based on a validated test method, that provide a basis for evaluating the comparability of a proposed test method that is mechanistically and functionally similar. Included are (i) essential test method components; (ii) a minimum list of reference chemicals selected from among the chemicals used to demonstrate the acceptable performance of the validated test method; and (iii) the comparable levels of accuracy and reliability, based on what was obtained for the validated test method, that the proposed test method should demonstrate when evaluated using the minimum list of reference chemicals (3).

Positive control: A sample containing all components of a test system and treated with a substance known to induce a positive response. To ensure that variability in the positive control response across time can be assessed, the magnitude of the positive response should not be excessive.

Proficiency chemicals (substances): A subset of the Reference Chemicals included in the Performance Standards that can be used by laboratories to demonstrate technical competence with a standardised test method. Selection criteria for these substances typically include that they represent the range of responses, are commercially available, and have high quality reference data available.

Reference chemicals (substances): A set of chemicals to be used to demonstrate the ability of a new test method to meet the acceptability criteria demonstrated by the validated reference test method(s). These chemicals should be representative of the classes of chemicals for which the test method is expected to be used, and should represent the full range of responses that may be expected from the chemicals for which it may be used, from strong, to weak, to negative.

Relevance: Description of relationship of the test to the effect of interest and whether it is meaningful and useful for a particular purpose. It is the extent to which the test correctly measures or predicts the biological effect of interest. Relevance incorporates consideration of the accuracy (concordance) of a test method (3).

Reliability: Measures of the extent that a test method can be performed reproducibly within and between laboratories over time, when performed using the same protocol. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility and intra-laboratory repeatability (3).

Reproducibility: The agreement among results obtained from testing the same substance using the same test protocol (see reliability) (3).

Sensitivity: The proportion of all positive / active chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (3).

Solvent/vehicle control: A replicate containing all components of a test system except of the test chemical, but including the solvent that is used. It is used to establish the baseline response for the samples treated with the test chemical dissolved in the same solvent.

Specificity: The proportion of all negative / inactive chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (3).

Substance: Chemical elements and their compounds in the natural state or obtained by any production process, including any additive necessary to preserve the stability of the product and any impurities deriving from the process used, but excluding any solvent which may be separated without affecting the stability of the substance or changing its composition (1).

Test chemical: The term "test chemical" is used to refer to what is being tested.

OECD/OCDE

442D

United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS):

A system proposing the classification of chemicals (substances and mixtures) according to standardised types and levels of physical, health and environmental hazards, and addressing corresponding communication elements, such as pictograms, signal words, hazard statements, precautionary statements and safety data sheets, so that to convey information on their adverse effects with a view to protect people (including employers, workers, transporters, consumers and emergency responders) and the environment (1).

UVCB: substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials.

Validated Reference Method (VRM): the first method(s) endorsed as scientific valid and used as a reference for performance-based validation studies.

Valid test method: A test method considered to have sufficient relevance and reliability for a specific purpose and which is based on scientifically sound principles. A test method is never valid in an absolute sense, but only in relation to a defined purpose (3).

Xeno-free: which does not contain any element that is not from the same species as the cells used, in this case, human.

Literature

- 1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- 2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 3) OECD (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.
- 5) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.
- 6) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1, 45-49.

III

원문(OECD TG442D, 부록 IC)

OECD/OCDE

442D

Appendix IC: In Vitro Skin Sensitisation: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA)

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

1. The EpiSensA method is proposed to address the second key event of the skin sensitisation Adverse Outcome Pathway (AOP) (1), namely keratinocyte activation, by quantifying changes in the expression of marker genes associated with keratinocyte activation in reconstructed human epidermis (RhE) models following exposure to sensitisers (2) (3). Two important keratinocyte responses occur in the skin sensitisation AOP: the inflammatory responses and the induction of cytoprotective gene pathways (2). Expression of the activating transcription factor 3 (*ATF3*) and interleukin-8 (*IL-8*) genes reflects the inflammatory response of keratinocytes, whereas expression of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit (*GCLM*) and DnaJ (Hsp40) homolog subfamily B (*DNAJB4*) genes reflects the induction of cytoprotective gene pathways (3). In the EpiSensA, relative changes in marker gene (i.e. *ATF3*, *IL-8*, *GCLM*, and *DNAJB4*) expression are quantified using Reverse Transcription-quantitative PCR (RT-qPCR), and these data are then used for supporting the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers.
2. The EpiSensA test method underwent validation studies (4) followed by an independent peer review conducted by the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) in cooperation with the International Collaboration on Alternative Test Methods (ICATM) (5). The EpiSensA test method was considered scientifically valid to be used as part of an Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) to support the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers for the purpose of hazard identification.
3. The RhE model used in the EpiSensA test method is the LabCyte EPI-MODEL24. The EpiSensA test method is considered a Validated Reference Method (VRM) with regards to test methods quantifying changes in the expression of marker genes associated with keratinocyte activation (*ATF3*, *IL-8*, *GCLM*, and *DNAJB4*), using Reverse Transcription- quantitative PCR in reconstructed human epidermis (RhE) models. PS (6) are available to facilitate the validation of similar or modified EpiSensA test method and allow for timely amendment of this Test Guideline for their inclusion. A similar or modified EpiSensA test method will only be added to the test guideline after review and agreement that all criteria described in the PS are met. Other RhE models can be used after a validation study based on the PS is conducted.
4. The EpiSensA test method was shown to be transferable to laboratories experienced in cell culture techniques (4) (5) (8) (9) (10). The within-laboratory reproducibility of EpiSensA at two participating laboratories was 93.3% (14/15) and one was 86.7% (13/15). The calculated between-laboratory reproducibility at three participating laboratories for analyses of 27 test chemicals was 88.9% (9). Results generated in the validation study (4) and a published study (10) indicated that the accuracy of the EpiSensA in discriminating sensitisers (i.e. UN GHS Cat. 1) from non-sensitisers is 83.3% (120/144) with a sensitivity of 88.8% (95/107) and a specificity of 67.6% (25/37) when compared to LLNA results. The balanced accuracy is 78.2%. Compared to human results, the accuracy of the EpiSensA is 80.7% (71/88) with a sensitivity of 98.1% (53/54) and a specificity of 52.9% (18/34). The balanced accuracy is 75.5%. False negative EpiSensA predictions as

OECD/OCDE

442D

compared with the LLNA are more likely for chemicals exhibiting low to moderate skin sensitisation potency (i.e. UN GHS subcategory 1B) than chemicals exhibiting high skin sensitisation potency (i.e. UN GHS subcategory 1A) (9). However, the accuracy values presented here for EpiSensA as a stand-alone test method are only suggestive, as results obtained with the test method should be considered in combination with information from other sources in the context of a Defined Approach or an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 7 and 8 of the General Introduction of this Test Guideline (11). Furthermore, when using *in vivo* data as a reference to evaluate non-animal methods for assessing skin sensitisation, it should be kept in mind that the LLNA test as well as other animal tests may not fully reflect the situation in humans.

5. Currently available data indicate that the EpiSensA test method is applicable for the testing of chemicals representing a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potencies (as determined through *in vivo* studies), and physico-chemical properties (3) (4) (5) (9) (10). EpiSensA is applicable for testing soluble chemicals or chemicals that form a stable dispersion in an appropriate vehicle (see paragraph 19 on *Vehicle selection and assessment of test chemical solubility*). In addition, as RhE represents a three-dimensional model involving an air-liquid interface, test chemicals are applied directly to the surface of the RhE model. Therefore, lipophilic vehicles can be used, and the test method can be used to test lipophilic chemicals (e.g. logKow > 3.5) (3) (4) (5) (9) (10). Furthermore, a number of putative pro-haptens (i.e. chemicals which are suspected to require enzymatic activation to exert skin sensitisation potential) and pre-haptens (i.e. chemicals that are assumed to become sensitisers via abiotic transformation) were rated as correct-positives by the EpiSensA (3) (4) (5) (9) (10). Metabolic capacity of RhE and human skin has been investigated in a limited number of studies (12) (13). These studies suggest that RhE models have similar metabolic capacity as human skin, but further confirmation is still needed. In view of that, the results can only be used to support the hazard identification (e.g. in the context of a IATA or a Defined Approach). Due to the limitations of the test exposure period, pro-haptens or pre-haptens that require more than 6 hours to be sufficiently metabolised or oxidised may not be detected by the EpiSensA.

6. Some surfactants can lead to false positive results due to non-specific expression of the *ATF3* and *IL-8* genes (4). In addition, testing chemicals at high concentrations (e.g. 100% or 50% (w/v)) using distilled water as the vehicle can induce high osmotic stress conditions that lead to non-specific expression of *ATF3* (4). Therefore, positive results in such cases should be interpreted with caution. However, negative results can still be used to support the classification of a test chemical as a non-sensitiser. When the solubility is assessed, if the chemical is not soluble or does not form a stable dispersion at 0.0122% (see paragraph 19 on *vehicle selection and assessment of test chemical solubility*), the chemical is not applicable for testing using EpiSensA. However, other vehicles can be used if sufficient scientific rationale can be provided. Test chemicals that significantly affect the expression of the endogenous control gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) at concentrations at which cell viability remains ≥ 80% (see *Acceptance criteria* paragraph) may not be applicable to the test method, as marker gene expression cannot be accurately measured by relative quantification using RT-qPCR. However, other endogenous control genes may be used if sufficient scientific rationale can be provided. In addition, test chemicals that either affect RNA itself (e.g. by inducing RNA degradation) or directly interfere with the RNA isolation system may not be applicable to the test method. In cases where there is evidence demonstrating the non-applicability of the EpiSensA test method to specific category of test chemicals, it should not be used for those specific categories of chemicals.

7. In addition to supporting the discrimination between skin sensitisers (i.e. UN GHS Category 1) and non-sensitisers, the EpiSensA test method also provides information (e.g. concentration-response data) that could contribute to the assessment of sensitising potency when used in integrated approaches such as a Defined Approach or an IATA. However, further data (preferably based on human research) are required to determine how EpiSensA test results might contribute to potency assessment.

8. Definitions are provided in the annex of the general introduction.

PRINCIPLE OF THE TEST

9. The EpiSensA test method is an *in vitro* assay that quantifies changes in the expression of four marker genes associated with keratinocyte activation (i.e. *ATF3*, *GCLM*, *DNAJB4*, and *IL-8*) in a RhE model

OECD/OCDE

442D

following a 6-hour exposure to the test chemical of interest. Relative changes in marker gene expression are quantified using RT-qPCR. Cytotoxicity is also assessed concurrently to determine whether upregulated expression of the marker genes occurs at sub-cytotoxic concentrations (cell viability \geq 80%). The relative induction of marker genes is calculated in comparison to vehicle controls. Test chemicals are considered positive in the EpiSensA test method if the expression of at least one marker gene exceeds the respective cut-off value (*ATF3*, 15-fold; *GCLM*, 2-fold; *DNAJB4*, 2-fold; *IL-8*, 4-fold) with cell viability remaining \geq 80%. For this purpose, the mean maximum fold-induction (*I*_{max}) value is determined using data from concentrations at which mean cell viability remains \geq 80%.

10. Prior to routine use of the EpiSensA test method, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the ten proficiency substances listed in Annex 1 of this Appendix. Users of the test method may want to consult Annex 2 for *I*_{max} ranges of each marker gene obtained for proficiency substances in the validation studies.

PROCEDURE

11. The EpiSensA standard operating procedure is available in the Tracking System for Alternative methods towards Regulatory acceptance (TSAR) (14) and should be employed when implementing and using the test method in the laboratory. The following paragraphs describe the main components and procedures of the EpiSensA test method, which comprises two steps: concentration-finding study and main study (Gene expression analysis).

General Test System Characterisation

12. Non-transformed human keratinocytes should be used to reconstruct the epithelium (15). Multiple layers of viable epithelial cells (*basal layer*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) should be present under a functional *stratum corneum*. *Stratum corneum* should be multi layered containing the essential lipid profile to produce a functional barrier with robustness to resist rapid penetration of cytotoxic benchmark chemicals (e.g. the surfactant sodium lauryl sulphate (SLS) is used to test barrier function). The containment properties of the RhE model should prevent the passage of material around the stratum corneum to the viable tissue, which would lead to poor modelling of skin exposure. The RhE model should be free of contamination by bacteria, viruses, mycoplasma, or fungi.

Functional conditions*Barrier function*

13. The RhE model developer/supplier should ensure that each batch of the RhE model meets defined quality control criteria for barrier function. The barrier function should be demonstrated and assessed by determination of the concentration at which a benchmark chemical (e.g. SLS) reduces the viability of the tissues by 50% (IC₅₀) after a fixed exposure time, or by determination of the exposure time required to reduce cell viability by 50% (ET₅₀) upon application of the benchmark chemical at a specified, fixed concentration.

Morphology

14. Histological examination of the RhE model should be provided by the RhE model developer/supplier demonstrating human epidermis-like structure (including multilayered stratum corneum as described in paragraph 12).

Reproducibility

15. The RhE model developer/supplier should maintain a database of the quality control (QC) release test results of the viability and barrier function tests to monitor reproducibility over time. It is recommended that the EpiSensA test method user maintain a database of the EpiSensA positive and vehicle (i.e. negative) control results to monitor reproducibility of test method execution over time.

OECD/OCDE

442D

Quality control (QC)

16. The RhE model should only be used if the RhE model developer/supplier demonstrates that each batch of the RhE model used meets defined production release criteria, among which those for barrier function (paragraph 13) and morphology (paragraph 14) are the most relevant. These data should be provided to the test method users, so that they are able to include this information in the test report. An acceptability range (upper and lower limit) for the IC₅₀ or ET₅₀ should be established by the RhE model developer/supplier (15). Only results produced with qualified tissues can be accepted for reliable prediction. The acceptability range for the test method included in Appendix I C is given in Table 1.

Table 1. QC batch release criteria of the RhE models included in Appendix I C

RhE model	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
LabCytE EPI-MODEL24 (18 hours treatment with SLS) (13)	IC ₅₀ =1.4 mg/mL	IC ₅₀ =4.0 mg/mL

Preparation of RhE model

17. The EpiSensA test method should be conducted utilising an RhE model. The LabCytE EPI-MODEL24 kit (#401124), which can be obtained from Japan Tissue Engineering Co., Ltd. (J-TEC), is currently the sole model that can be used in the EpiSensA test method. Other RhE models can be used after a validation study based on the PS (6) is conducted.

18. RhE models are cultured at 37 ± 1 °C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere in the assay medium included with the LabCytE EPI-MODEL24 kit (#401124).

Vehicle selection and assessment of test chemical solubility

19. Assessment of solubility is conducted prior to testing. The solubility of each chemical is evaluated and confirmed visually. For this purpose, test chemicals are dissolved or stably dispersed at a concentration of 50% in acetone: olive oil; 4:1 (AOO, 20% v/v of olive oil in acetone) as a first vehicle option (e.g. 0.1 g of test chemical is measured, and 0.1 mL of AOO is added), distilled water (DW) as a second vehicle option, or 50 % v/v ethanol in DW (50% EtOH) as a third vehicle option. If the test chemical is not soluble or does not stably disperse (i.e. a colloid or suspension in which the test chemical does not settle or separate from the vehicle into different phases within 10 minutes of preparation at room temperature) at a concentration of 50% in any of the vehicles, the highest soluble concentration should be determined by 2-fold serial dilutions beginning with 50% down to 0.0122%. If the test chemical is not soluble or does not form a stable dispersion at 0.0122%, the chemical is not applicable for testing using EpiSensA. The appropriate vehicle is defined as the vehicle that dissolves the test chemical or forms a stable dispersion at the highest concentration tested. It should be verified whether the highest concentration determined can be prepared at weight per volume in a volumetric flask. If the highest soluble or stably dispersed concentration is determined to be 0.0488%, 0.0244%, or 0.0122%, the subsequent concentration-finding study (paragraphs 20-26) can be skipped, and main study should be performed (see paragraph 27). In cases in which a vehicle other than AOO, DW, or 50% EtOH is used, appropriate scientific rationale for use of that vehicle should be provided.

Concentration-finding study

20. A concentration-finding assay is performed to determine the concentrations of test chemical to be used for the main study (see *Main study (Gene expression analysis)* paragraphs). In the main study, test chemical concentrations that show $\geq 80\%$ mean cell viability should be used, but at least one mean cell viability

OECD/OCDE

442D

should be <80% for negative judgement. Therefore, the lowest test chemical concentration that induces a < 80% cell viability is determined in concentration-finding study.

Preparation of test chemicals and control substances for the concentration-finding study

21. Test chemicals are prepared on the day of testing and dissolved or stably dispersed in an appropriate vehicle at the highest concentration determined as specified in paragraph 19. Starting from the highest concentration, 4-fold serial dilutions are prepared to 0.0122 or 0.0244% (w/v) in the corresponding vehicle. Thus, depending on the starting concentration, a varying number of dilutions are prepared and tested as exemplified in Table 2. The corresponding vehicles utilised for the preparation of the test chemicals are used as the vehicle controls. Both non-treated control and killed control are used for calculation of cell viability. Non-treated control is used to define 100% cell viability, and killed control is used to define 0% cell viability (see paragraph 25). Triton X-100 is used as the control substance for killed control in the EpiSensA test method. Triton X-100 should be prepared as a 10% (w/v) solution in DW. In cases where a control substance for killed control other than Triton X-100 is used, appropriate scientific rationale for the use of that substance should be provided.

Application of test chemicals and control substances for the concentration-finding study

22. For each test chemical, one run is needed to determine the concentration to be used in the main study (Gene expression analysis). One RhE tissue for each test chemical concentration and non-treated control and two tissue units for the killed control are used for the cell viability assay (Table 2). Test chemicals prepared as a working solution (5 µL) and Triton X-100 solution (10 µL) are applied to the centre of each epidermis surface using a positive-displacement pipette and tips. The treated tissue units are then incubated for 6 hours at 37 ± 1 °C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere.

OECD/OCDE

442D

Table 2. Example of plate layout for the concentration-finding study using 24-well plate

1. Non-treated	2. Killed Ctrl.	3. Killed Ctrl.	13. Test chemical B 0.012% w/v	14. Test chemical B 0.049% w/v	15. Test chemical B 0.20% w/v
4. AOO	5. DW	6. 50% EtOH	16. Test chemical B 0.78% w/v	17. Test chemical B 3.13% w/v	
7. Test chemical A 0.024% w/v	8. Test chemical A 0.098% w/v	9. Test chemical A 0.39% w/v			
10. Test chemical A 1.56% w/v	11. Test chemical A 6.25% w/v	12. Test chemical A 25% w/v			

AOO: acetone: olive oil; 4:1 v/v DW: distilled water

50% EtOH: 50 % v/v ethanol in DW

Cytotoxicity assessment

23. Cell viability is measured by a lactate dehydrogenase (LDH) assay utilising formazan as the dye. LDH is a stable cytoplasmic enzyme present in all cell types, and it is released into the cell culture medium as a result of damage to the plasma membrane. The LDH assay measures the amount of formazan dye produced by released LDH. The criteria for interference of test chemical in LDH assay (i.e. inhibition of LDH reaction) is described in the TSAR (14).

24. After a 6-hour exposure, 50 μ L of the medium for each sample is placed into the wells of a 96-well plate, and an equal volume (i.e. 50 μ L) of substrate solution containing lactate and tetrazolium salt is added to each well. The plate is incubated for 30 minutes at room temperature with protection from light, and the reaction is stopped by adding 25 μ L/well of 1 mol/L hydrochloric acid (HCl). The absorbance of each well is then measured at 490 or 492 nm along with the reference wavelength (≥ 600 nm) using a 96-well plate absorbance reader. Δ abs. is calculated by subtracting the absorbance at reference wavelength from the absorbance at 490 or 492 nm. The absorbance should be measured immediately (no longer than 1 hour) after the addition of HCl.

OECD/OCDE

442D

25. Cell viability can be calculated using the following equation:

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 - \frac{\Delta\text{abs. of test chemical treatment} - \Delta\text{abs. of non-treated control}}{\text{mean } \Delta\text{abs. of killed control} - \Delta\text{abs. of non-treated control}} \times 100$$

26. If the LDH assay is not applicable to a test chemical of interest, another cytotoxicity assay (e.g. MTT assay or ATP assay) may be used. In the MTT assay, the activation of the metabolism in a mitochondria in a cell is measured by enzymatic conversion of the vital dye MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue; CAS number 298-93-1], into a blue formazan salt that is quantitatively measured after extraction from tissues. ATP assay is a homogeneous method, in which tissues are lysed and the number of viable cells is determined based on quantitation of the ATP present in tissues. Therefore, total RNA cannot be isolated from the tissues used for the MTT assay or ATP assay. For this reason, tissues used for the cytotoxicity assessment are required besides tissues used for the gene expression analysis when the MTT assay or ATP assay is used. Other methods (e.g. XTT assay) can be used if sufficient scientific rationale is provided based on the PS (6).

Main study (Gene expression analysis)

Preparation of test chemicals and control substances for the main study

27. An appropriate vehicle (AOO, DW, or 50% EtOH; see paragraph 19) should be used to dissolve or stably disperse the test chemical. The lowest concentration that resulted in < 80% cell viability in the *concentration-finding study* should serve as the highest concentration (i.e. the starting concentration) in the *main study* for each chemical and is used in the negative judgement (see paragraph 39). If the cell viability was ≥ 80% at any of the tested concentrations in the *concentration-finding study*, the highest soluble or stably dispersed concentration of the test chemical should be used as the starting concentration. Based on the starting concentration, 2-fold serial dilutions are prepared using the corresponding vehicle to obtain working solutions. At least 3 concentrations should be used, including the lowest concentration that resulted in < 80% cell viability in the *concentration-finding study* or the highest soluble or stably dispersed concentration. Test chemicals that cannot fulfil this condition may still be tested at one or two concentrations (i.e. the highest tested concentration at main study is 0.0122 or 0.0244% (w/v)). If the concentration determined in the solubility check is 0.0244 or 0.0122% (w/v), only 2 concentrations (0.0244, and 0.0122% w/v) or only 1 concentration (0.0122% w/v) can be used, respectively. Likewise, if the lowest test chemical concentration that induces a < 80% cell viability is 0.0244 or 0.0122% (w/v) in the *concentration-finding study*, only 2 concentrations (0.0244, and 0.0122% w/v) or only 1 concentration (0.0122% w/v) can be used, respectively. In such cases, a positive response can still be used to support the identification of the test chemical as a skin sensitizer; otherwise, the result should be considered as inconclusive (see paragraph 39 on *Prediction model*). The vehicle control is prepared as described in paragraph 21. Clotrimazole (CAS no. 23593-75-1, ≥ 98% purity) and 4-nitrobenzyl bromide (4-NBB) (CAS no. 100-11-8, ≥ 98% purity) are used as positive controls in the EpiSensA test method, and 0.78% (w/v) clotrimazole and 0.10% (w/v) 4-NBB solutions are prepared in AOO (working solution). To calculate cell viability, non-treated and killed controls are prepared as described in paragraph 21. In cases where a control substance for killed control other than Triton X-100 is used, appropriate scientific rationale for the use of that substance should be provided.

Application of test chemicals and control substances for the main study

28. For each test chemical, one run is required to obtain a prediction. Three tissue units for each test chemical concentration, positive control substance and vehicle controls, two tissue units for the killed control, and one tissue unit for the non-treated control are used for the gene expression analysis. Other than the number of tissue units, application is conducted in the same condition as described in paragraph 22 (Table 3).

OECD/OCDE

442D

Table 3. Example of plate layout for the main study

1. Non-treated	2. Killed Ctrl.	3. Killed Ctrl.	13. Test chemical 1.56% w/v	14. Test chemical A 1.56% w/v	15. Test chemical A 1.56% w/v
4. AOO	5. AOO	6. AOO	16. Test chemical A 3.13% w/v	17. Test chemical A 3.13% w/v	18. Test chemical A 3.13% w/v
7. Clotrimazole 0.78% w/v	8. Clotrimazole 0.78% w/v	9. Clotrimazole 0.78% w/v	19. Test chemical A 6.25% w/v	20. Test chemical A 6.25% w/v	21. Test chemical A 6.25% w/v
10. 4-NBB 0.10% w/v	11. 4-NBB 0.10% w/v	12. 4-NBB 0.10% w/v			

AOO: acetone: olive oil; 4:1 v/v 4-NBB: 4-nitrobenzyl bromide

Cytotoxicity assessment

29. After a 6-hour exposure to the test chemical, cell viability is determined as described in paragraphs 23-26.

RNA isolation

30. For gene expression analysis, the tissue surface is washed three times with 0.5 mL of phosphate-buffered saline, and the tissue is collected and lysed using one of two lysis methods that were used during test method development and validation (TRIZol reagent and a vortex mixer, or a shredder column and centrifuge).

31. Total RNA, including mRNA, is isolated from lysed RhE tissue samples using a commercially available kit and reagents (e.g. RNeasy Mini kit which was used during test method development and validation).

32. The RNA concentration is quantified, and the RNA quality is analysed from each sample using an RNA analysis equipment, e.g. NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific), with following the protocols provided by the instrument supplier. More than 500 ng of RNA is required for complementary DNA (cDNA) synthesis. RNA concentration and quality should correspond to the recommendations described by the supplier of the reagents which are used in subsequent RT-qPCR (e.g. ≥ 100 ng/μl RNA concentration and A260/A280 in range 1.8- 2.0).

RT-qPCR

33. cDNA is synthesised using the commercially available reagents (e.g. Superscript III First- Strand Synthesis System which was used during test method development and validation).

34. After cDNA synthesis, the expression levels of marker genes (i.e. *ATF3*, *GCLM*, *DNAJB4*, and *IL-8*) and the endogenous control gene (i.e. *GAPDH*) are analysed using RT-qPCR. The method described in the *EpiSensA standard operating procedure* (14) should be used (i.e. TaqMan Gene Expression Assay and TaqMan Universal PCR Master Mix). Another reagent for gene expression analysis can be used if appropriate scientific rationale for use of that reagent is provided. Other methods that quantify changes in the gene expression can be used if sufficient scientific rationale is provided based on the PS (6).

OECD/OCDE

442D

DATA AND REPORTING

Data evaluation

35. Relative gene expression is analysed using RT-qPCR. Based on the threshold cycle (Ct) value, the Δ Ct and $\Delta\Delta$ Ct values as well as fold-induction are calculated according to the following equation:

$$\Delta\text{Ct value of marker gene} = \text{Ct value of marker gene} - \text{Ct value of GAPDH}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct value of marker gene}$$

$$= \Delta\text{Ct value of marker gene} - \Delta\text{Ct value of marker gene (vehicle control)}$$

$$\text{fold induction} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct value of marker gene}}$$

Cell viability is also calculated according to the equation provided in paragraph 25.

Acceptance criteria

36. The following acceptance criteria should be met for a run to be considered valid:
- The cell viability of at least two tissue units of the vehicle control should be $\geq 95\%$. If the cell viability of only one vehicle control is $< 95\%$, the Ct values obtained from the remaining two tissue units should be used.
 - The mean cell viability of both positive controls (i.e. 0.78% [w/v] clotrimazole and 0.10% [w/v] 4NBB) should be $\geq 80\%$.
 - In the 0.78% (w/v) clotrimazole positive control, the mean fold-induction values for *ATF3* and *IL-8* should exceed the cut-off value (i.e. the *ATF3* fold-induction value should be > 15 , and the *IL-8* fold-induction value should be > 4).
 - In the 0.10% (w/v) 4NBB positive control, the mean fold-induction values for *GCLM* and *DNAJB4* should exceed the cut-off value (i.e. the *GCLM* fold-induction value should be > 2 , and the *DNAJB4* fold-induction value should be > 2).
37. The following acceptance criteria should be met in order to consider a tested concentration's result valid:
- The result of at least one tested concentration should show $\geq 80\%$ mean cell viability. If the mean cell viability is $< 80\%$ for a given tested concentration, the result for that tested concentration should be excluded for a positive prediction (see para 42 for a specific case) but might be used for negative prediction (see para 39).
 - When the mean *GAPDH* Ct value for a given test chemical concentration is within ± 1 of the mean *GAPDH* Ct value of the corresponding vehicle control, the result obtained at that concentration is acceptable.

OECD/OCDE

442D

Prediction model

38. Each test chemical is evaluated in one run to derive a prediction (positive or negative). An EpiSensA prediction is considered positive if at least one of the following conditions is met:

- The I_{max} for ATF3 is > 15 for at least one tested concentration.
 - The I_{max} for GCLM is > 2 for at least one tested concentration.
 - The I_{max} for *DNAJB4* is > 2 for at least one tested concentration.
 - The I_{max} for *IL-8* is > 4 for at least one tested concentration.

39. The EpiSensA prediction is considered negative if the three conditions below are met:

- The mean fold-induction value of the marker genes does not exceed the respective cut-off values for any of the four genes, at any of the tested concentrations
- At least 3 concentrations were tested;
- At least one mean cell viability at the tested concentrations is < 80%.

If the highest tested concentration of main study is 0.0244 or 0.0122% (w/v), the result should not be considered as negative but as inconclusive (see paragraph 27).

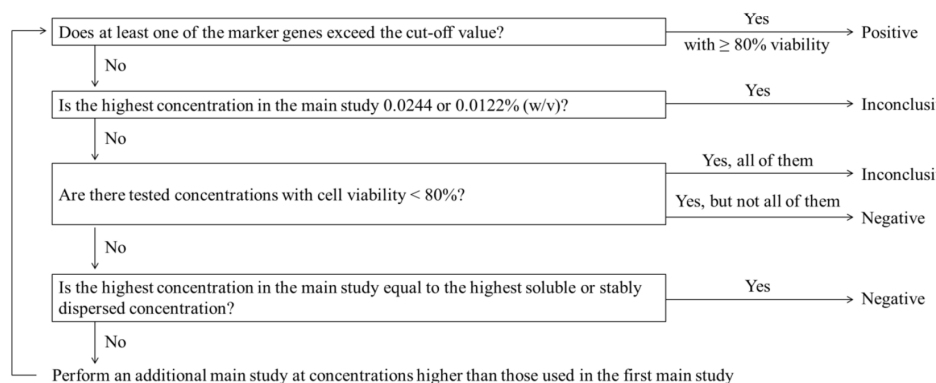
40. Cases can occur in which the mean fold-induction value of all four marker genes does not exceed the respective cut-off values at the tested concentration but the mean cell viability at all tested concentrations is ≥ 80%. In such cases, if the highest concentration tested in the main study was equal to the highest soluble or stably dispersed concentration, the test chemical result is judged as negative. However, if the highest concentration tested in the main study was lower than the highest soluble or stably dispersed concentration, an additional main study should be performed using 2-fold serial dilutions beginning with the concentration greater than the highest concentration used in the first main study (Figure 1). In this additional study, if the test chemical does not produce a mean cell viability of < 80% at either the highest soluble or stably dispersed concentration (for solid substances) or 100% (for liquids), the test chemical result is judged as negative.

41. If all mean cell viabilities are < 80% at the tested concentrations greater than or equal to 0.0122% (w/v), the prediction is considered inconclusive.

OECD/OCDE

442D

Figure 1. Brief flow-chart of the EpiSensA prediction model



42. Other cases can occur in which the fold-induction value of a marker gene exceeds the cut-off value only at the lowest concentration showing < 80% mean cell viability. In such a case, the test chemical should be retested using a narrower concentration-response analysis and lower dilution factor (e.g. $\sqrt{2}$ [=1.41]-fold dilution) in order to determine whether induction has occurred at a cytotoxic level (80 to 95% mean cell viability).

Test report

43. The test report should include the following information:

Test chemical

- Mono-constituent substance
- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers, such as batch/lot number and expiration date;
- Physical appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Purity, chemical identity of impurities, etc., as appropriate and practically feasible;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability, to the extent available;
 - Justification for choice of vehicle for each test chemical.

OECD/OCDE

442D

- Multi-constituent substance, UVCB and mixture:
- Characterisation as far as possible, for example, by chemical identity (see above), purity, and quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available;
- Physical appearance, water solubility, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
- Molecular weight or apparent molecular weight in cases of mixtures/polymers of known composition, or other information relevant for the conduct of the study;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability, to the extent available;
 - Justification for choice of vehicle for each test chemical.

Controls

- Positive control
- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
- Physical appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Purity, chemical identity of impurities, etc., as appropriate and practically feasible;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability, to the extent available;
- Reference to historical positive control results demonstrating suitable run acceptance criteria, if applicable.
- Vehicle control
- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), and/or other identifiers;
 - Purity, chemical identity of impurities, etc., as appropriate and practically feasible;
- Physical appearance, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties in cases in which vehicles controls other than those mentioned in this Appendix are used and to the extent available;

OECD/OCDE

442D

- Storage conditions and stability, to the extent available;
 - Justification for choice of vehicle for each test chemical.

Testing conditions

- Name and address of the sponsor, test facility, and study director;
- Description of test method used;
- RhE model used (including batch number);
- 96-well plate absorbance reader equipped for reading at 490 (or 492) nm and ≥ 600 nm;
- RNA extraction method used;
- Spectral photometer for measurement of RNA concentration;
- Thermal cycler and RT-qPCR system used (e.g. model), including instrument settings, primers, and reverse transcription (RT) and PCR reagents;
- Reference to historical data of the model. This should include, but is not limited to acceptability of the QC data with reference to historical batch data;
- A statement of the proficiency of the laboratory in performing the test method (e.g. by testing of proficiency substances) or to demonstrate reproducibility of the test method over time.

Testing procedure

- Test chemical concentrations, application procedure, and exposure time used (if different than that recommended);
- Description of evaluation and decision criteria used;
- Description of study acceptance criteria used;
- Description of any modifications of the test procedure.

Results

- Tabulation of data, including individual Ct, Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct, fold-induction, and cell viability values obtained for the test chemical and for the positive control, and an indication of the rating of the test chemical according to the prediction model;
- A graph depicting concentration-response curves for induction of gene expression and cell viability;
- Description of any other relevant observations, if applicable.

OECD/OCDE

442D

Discussion of the results

- Discussion of the results obtained with the EpiSensA test method;

Conclusions

OECD/OCDE

442D

LITERATURE

- (1) OECD (2012)10/PART1. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. Part 1: Scientific evidence. Series on Testing and Assessment. ENV/JM. Mono, 168.
- (2) Saito, K., Nukada, Y., Takenouchi, O., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., Nishiyama, N. (2013). Development of a new *in vitro* skin sensitization assay (Epidermal Sensitization Assay; EpiSensA) using reconstructed human epidermis. *Toxicology in Vitro*, 8, 2213-24, doi: 10.1016/j.tiv.2013.08.007.
- (3) 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. *Toxicology in Vitro*. 40, 11-25. doi: 10.1016/j.tiv.2016.12.005.
- (4) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (5) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 383: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Peer review Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (6) OECD (2024). Series on Testing & Assessment No 396: Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) test methods; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.)
- (7) OECD (2005). OECD Series on Testing and Assessment No. 34. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.
- (8) Mizumachi, H., Sakuma, M., Ikezumi, M., Saito, K., Takeyoshi, M., Imai, N., Okutomi, H., Umetsu, A., Motohashi, H., Watanabe, M., Miyazawa, M. (2018). Transferability and within- and between-laboratory reproducibilities of EpiSensA for predicting skin sensitization potential *in vitro*: A ring study in three laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1233-1243. doi: 10.1002/jat.3634.
- (9) Mizumachi, H., Watanabe, M., Ikezumi, M., Kajiwar, M., Yasuda, M., Mizuno, M., Imai, N., Sakuma, M., Shibata, M., Watanabe, S., Motoyama, J., Basketter, D., Eskes, C., Hoffmann, S., Lehman, D., Ashikaga, T., Sozu, T., Takeyoshi, M., Suzuki, S., Miyazawa, M., Kojima, H. (2024). The inter-laboratory validation study of EpiSensA for predicting skin sensitization potential. *Journal of Applied Toxicology*, 44(4), 510-525. doi: 10.1002/jat.4559.
- (10) Mizumachi, H., Suzuki, S., Sakuma, M., Natsui, M., Imai, N., Miyazawa, M. (2024). Reconstructed human epidermis-based Testing Strategy of skin sensitization hazard and potency classification using EpiSensA and *in silico* data. *Journal of Applied Toxicology*, 44(3), 415-427. doi: 10.1002/jat.4551
- (11) OECD (2023), *Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>
- (12) Kazem, S., Linssen, EC., Gibbs, S. (2019). Skin metabolism phase I and phase II enzymes in native and reconstructed human skin: a short review. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1899-1910, doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.002.
- (13) Oesch, F., Fabian, E., Landsiedel, R. (2018). Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Archives of Toxicology*, 92(8), 2411-2456. doi: 10.1007/s00204-018-2232-x.
- (14) EURL ECVAM. (2023). EpiSensA standard operating procedure. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2018-01-0>.

OECD/OCDE

442D

(15) OECD (2021), *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>

OECD/OCDE

442D

APPENDIX IC - ANNEX 1 - PROFICIENCY SUBSTANCES

In Vitro Skin Sensitisation: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA)

Prior to routine use of the test method described in this Annex to Test Guideline 442D, laboratories should demonstrate technical proficiency by testing at least three of the four fixed concentrations of the 10 proficiency substances recommended in Table 1. Then, the results obtained for each marker gene should be consistent with those specified in Table 1 for 8 out of the 10 proficiency substances. These proficiency substances were selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazards. Other selection criteria were that they are commercially available, that curated *in vivo* reference data and high quality EpiSensA data are available, and that they were used during pre- validation ring study or the JaCVAM-coordinated validation study.

Table 1: Recommended substances for demonstrating technical proficiency with the EpiSensA method

No.	Proficiency substances	CAS No.	Physical state	<i>in vivo</i> prediction ¹	Vehicle	Test concentration (w/v%)	EpiSensA results for each marker gene ²			
							ATF3	GCLM	DNAJB4	IL-8
1	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Sensitiser (GHS Cat. 1A)	AOO	0.39, 0.20, 0.10, 0.05	p	p	p	p/n
2	p-Phenylenediamine	106-50-3	Solid	Sensitiser (GHS Cat. 1A)	AOO	1.56, 0.78, 0.39, 0.20	p/n	p	p	p/n
3	Methyl heptene carbonate	111-12-6	Liquid	Sensitiser (GHS Cat. 1A)	AOO	3.13, 1.56, 0.78, 0.39	p	p	p	p
4	Metol	55-55-0	Solid	Sensitiser (GHS Cat. 1A)	DW	3.13, 1.56, 0.78, 0.39	p	p	p	p/n
5	Abietic acid	514-10-3	Solid	Sensitiser (GHS Cat. 1B)	AOO	12.5, 6.25, 3.13, 1.56	p	p	p	p
6	Farnesol	4602-84-0	Liquid	Sensitiser (GHS Cat. 1B)	AOO	12.5, 6.25, 3.13, 1.56	p	p/n	p	p
7	Amyl cinnamic aldehyde	122-40-7	Liquid	Sensitiser (GHS Cat. 1B)	AOO	100, 50, 25, 12.5	p	n	p	p
8	Cetrimide	57-09-0	Solid	Non-sensitiser (Not classified)	50%EtOH	1.56, 0.78, 0.39, 0.20	n	n	n	n
9	Lactic acid ³	50-21-5	Liquid	Non-sensitiser (Not classified)	DW	6.25, 3.13, 1.56, 0.78	n	n	n	n
10	Hexane	110-54-3	Liquid	Non-sensitiser (Not classified)	AOO	100, 50, 25	n	n	n	n

¹: The *in vivo* hazard and potency prediction is based on LLNA data (TG497, SD Annex3) (Urbisch, 2015). The *in vivo* potency is derived using the criteria based on UN GHS Sub-categorisation.

²: "p" indicates that the fold-induction of marker gene exceeds the cut-off value with $\geq 80\%$ viability. "n" indicates that the fold-induction of marker gene doesn't exceed the cut-off value with $\geq 80\%$ viability. "p/n" means both "p" and "n" are acceptable.

³: MTT assay should be performed instead of LDH assay.

OECD/OCDE

442D

APPENDIX IC - ANNEX 2 - I_{max} ranges for proficiency substances

These values are provided for information purpose and reflect the ranges obtained by laboratories in the validation study (1) and pre-validation ring study (2). These ranges are not part of the TG but can be useful for a laboratory setting up the EpiSensA for the first time before routine use.

Table 1: I_{max} range of each marker gene obtained for proficiency substances

No.	Proficiency substances	CAS No.	<i>in vivo</i> prediction ¹	N ²	I _{max} range of each marker gene			
					<i>ATF3</i>	<i>GCLM</i>	<i>DNAJB4</i>	<i>IL-8</i>
1	2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Sensitiser (GHS Cat. 1A)	9	30.4-133.2	6.4-18.9	6.2-17.3	2.9-5.9
2	p-Phenylenediamine	106-50-3	Sensitiser (GHS Cat. 1A)	8	2.4-66.1	11.1-24.3	4.6-22.3	0.8-3.5
3	Methyl heptene carbonate	111-12-6	Sensitiser (GHS Cat. 1A)	8	113.9-823	9.5-84	40.8-175.7	9.5-74.4
4	Metol	55-55-0	Sensitiser (GHS Cat. 1A)	9	130.7-460.5	11.6-22.6	16.6-35.9	3.2-8.0
5	Abietic acid	514-10-3	Sensitiser (GHS Cat. 1B)	7	74-410	2.9-4.9	2.9-5.8	39.4-153.9
6	Farnesol	4602-84-0	Sensitiser (GHS Cat. 1B)	7	48.4-378.2	0.7-5.3	2.9-5.8	90.4-547.9
7	Amyl cinnamic aldehyde	122-40-7	Sensitiser (GHS Cat. 1B)	3	116.1-250.7	1-1.3	3.1-5.2	163.8-265.5
8	Cetrimide	57-09-0	Non-sensitiser (Not classified)	9	1.2-8.3	0.6-1.4	0.6-1.4	1.6-3.0
9	Lactic acid	50-21-5	Non-sensitiser (Not classified)	7	1.1-2.5	1.1-1.5	0.9-1.2	1.5-3.1
10	Hexane	110-54-3	Non-sensitiser (Not classified)	9	1.4-5.6	0.7-1.8	0.7-1.3	1-1.7

¹: The *in vivo* hazard and potency prediction is based on LLNA data (TG497, SD Annex3) (Urbisch, 2015). The *in vivo* potency is derived using the criteria based on UN GHS Sub-categorisation.

²: The number of EpiSensA results to calculate the I_{max} range.

- (1) OECD (2023). Series on Testing & Assessment No. 384: Epidermal Sensitisation Assay (EpiSensA) Validation Study Report; Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (2) Mizumachi, H., Sakuma, M., Ikezumi, M., Saito, K., Takeyoshi, M., Imai, N., Okutomi, H., Umetsu, A., Motohashi, H., Watanabe, M., Miyazawa, M. (2018). Transferability and within- and between- laboratory reproducibilities of EpiSensA for predicting skin sensitization potential *in vitro*: A ring study in three laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 38(9), 1233-1243. doi: 10.1002/jat.3634.

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(*In vitro* 피부감작성시험법, EpiSensA)
가이드라인(민원인 안내서)

발행일 2025년 6월

발행인 식품의약품안전평가원장

편집위원장 독성평가연구부장 오재호

편집위원 우선욱, 김주환, 강남희, 김소희, 현민경, 차민희, 길가애

도움주신분 임경민(이화여자대학교), 오정자(코아시스템켄온(주)),
조선아((주)아모레퍼시픽)

문의처 식품의약품안전평가원 비임상자원연구과 및 한국동물대체시험법검증센터
Tel: 043-719-5506, 5502

주소 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,
오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

공익신고자 보호제도란?

- 공익신고자(친족 또는 동거인 포함)등이 공익신고 등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장, 불이익보호조치, 신분보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

[공직자 부조리 및 공익신고안내]

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 '국민신문고 >공직자 부조리 신고' 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 '국민소통 >신고 센터 >부패·공익신고 상담' 코너

♣ 보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과.
전화 044-200-7773