

화장품 피부감작성 동물대체시험법
[ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법] 가이드라인
(민원인 안내서)

2017. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 피부감작성 동물대체시험법(ARE-Nrf2 루시페라아제 시험법)
가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2017년 9월 7일		
담당자 확 인(부서장)		이 정 선 이 종 권

이 안내서는 화장품 피부감작성 동물대체시험법(ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 ('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2017년 9월 7일 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 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 특수독성과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5152, 5154

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연 번	제·개 정 번 호	승 인 일 자	주 요 내 용
1	안 내 서-0787-01	2017. 9. 7.	화장품 피부감작성 동물대체시험법(ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인 제정

목 차

I . 개요	6
II . 시험원리	7
III . 제한점 및 고려사항	7
IV . 시험방법	8
V . 인정요건	10
VI . 시험결과 및 보고	11
- 별첨 1 : 번역본	
- 별첨 2 : 원문	

화장품 피부감작성 동물대체시험법 (ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인

I. 개요

본 시험법은 UN GHS 기준에 따른 피부감작물질과 비감작물질을 구별하는데 사용되는 체외 피부감작성 평가 시험법(ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법)으로 피부감작성 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 두 번째 핵심 단계(Key Event)인 각질세포에서의 유전자 발현의 변화를 평가하는 방법이다.

선별적 플라스미드를 안정적으로 도입한 인체피부각질세포주(HaCaT)에서 Nrf2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) 의존성 유전자인 항산화 반응요소(Antioxidant Response Element, ARE)의 전사조절을 받는 루시퍼라아제(Luciferase) 유전자 발현을 측정함으로써 감작성물질과 비감작성물질을 구별할 수 있다. 현재 본 시험법 가이드라인에 따른 ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법은 KeratinoSensTM를 이용한 시험법이 유일하다. 본 시험법은 다양한 유기 작용기, 반응기전, 피부감작성(체내 시험결과), 물리화학적 성질을 가지는 시험물질에 적용할 수 있다. 그러나 본 시험법 결과는 안전성 평가를 위한 단일시험법(Stand-alone)으로 사용하기보다 독성발현경로의 핵심 단계를 다루는 다른 시험법 결과와 조합하여 통합독성평가(Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA)의 일부로 사용되어야 한다. UN GHS에 따른 화학물질의 위험성 분류와 표시의 목적으로 피부감작성(사람에게 감작을 일으키는 물질: Category 1)과 비감작성 구분에 사용되지만 본 시험법만으로는 Category 1A(심한 감작을 일으키는 물질), 1B(약하거나 중간 감작을 일으키는 물질)의 하위기준으로 세분화 할 수 없다.

본 시험법을 일상적으로 사용하는 실험실은 가이드라인(별첨 1의 부록 2)에서 제시된 10개의 숙련도 물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고, 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건 모두를 만족시키는 결과 값만이 유효한 것으로 인정된다.

시험방법은 크게 두 단계로 나누어져 있다. 첫 번째 단계는 루시퍼라아제 활성을 구하기 위한 단계이며, 두 번째 단계는 세포독성을 평가하는 단계이다. 시험결과값은 I_{max} 값(시험물질과 양성대조군의 모든 농도에서 측정한 루시퍼라아제 활성 중 최대 유도 배수 평균값), $EC_{1.5}$ 값(루시퍼라아제 활성이 음성(용매)대조군 발광측정값 대비 1.5배 초과하는 시험물질의 농도), 세포생존율이다.

시험 결과는 1) 음성대조군과 통계적으로 유의한 차이가 있는 I_{max} 값이 1.5배 초과, 2) $EC_{1.5}$ 값에서 세포생존율은 70% 이상, 3) $EC_{1.5}$ 값 1000 μM 미만, 4) 시험물질에 대한 루시퍼라아제 활성유도가 명확한 용량-반응성을 가졌을 때 양성으로 판정한다. 결과 판정은 두 번의 독립적인 반복실험에서 두 번 모두가 양성이면 양성으로 판정하며, 두 번의 반복실험 결과가 일치하지 않을 경우 세 번째 실험을 수행하여 세 번 중 두 번이 양성일 때 양성으로 판정한다.

II. 시험원리

피부감작성은 각질세포에서 일어나며 염증반응과 항산화/전자친화성 반응요소-의존성 경로[Antioxidant/electrophile Response Element(ARE)-dependent pathways]와 같이 특정한 세포 신호전달경로와 관련된 유전자 발현의 변화와 생물학적 상관성이 있다고 알려져 있다. 피부감작성 물질과 같은 작은 전자친화성 물질은 센서 단백질인 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)에 작용하여 전사인자인 Nrf2를 분리시킨다. 분리된 Nrf2는 핵내 phase II 해독효소를 코딩하는 유전자와 같은 ARE-의존성 유전자를 활성화한다. ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법은 시험물질을 인체피부각질세포주(HaCaT)에 48시간 동안 노출시킨 후 루시퍼라아제 유전자 발현 변화를 관찰하는 생체외 시험법이다. 루시퍼라아제 유전자 발현 수준은 루시퍼라아제 기질을 이용하여 발광측정기(luminometer)로 측정한다. 결과 평가는 감작물질과 비감작물질을 구별하기 위해 용매/부형제 대조군과 비교한 시험물질의 루시퍼라아제 유전자 발현의 상대적인 변화를 이용한다.

III. 제한점 및 고려사항

Keap1-Nrf2-ARE 경로 활성화는 피부감작성 독성발현 기전 중 하나의 단계에 불과하여, 본 시험법의 정보만으로 화학물질의 피부감작성을 결정짓기 어렵기 때문에 통합적인 접근법을 사용하여야 한다. 본 시험법으로 UN GHS에 따른 피부감작성(Category 1)과 비감작성 구별이 가능하지만 Category 1A, 1B 하위 분류기준으로는 구분할 수 없다.

ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법의 실험실 내 및 실험실 간 재현성은 대략 85% 수준이다. 국소림프절시험(LLNA) 결과와 비교하였을 때 피부감작성과 비감작성을 구분하는 정확도 77%(155/201), 민감도 78%(71/91), 특이도 76%(84/110)를 나타낸다. 그리고 본 시험법에서는 Category 1A(강감작성)에 비해 Category 1B(약중감작성)의 경우에는 피부감작능이 낮게 예측되는 경향이 있다. 결론적으로 본 시험법은 피부감작 위험성 여부를 식별하는데 유용하며, 단일 시험법보다 통합독성평가의 맥락에서 다른 정보와의 조합을 고려해야 한다.

본 시험법으로 LogP가 5까지인 시험물질은 성공적으로 시험할 수 있지만 LogP가 7을 초과하는 극단적인 소수성 물질은 이 시험법의 적용범위 밖에 있다고 알려져 있다. LogP가 5와 7 사이에 있는 시험물질에 대해서는 제한된 정보밖에 없다. 리신-잔기에만 반응성을 갖는 물질은 본 시험법에 따라 음성으로 검출될 수 있어 음성결과는 신중하게 해석한다. 또한, 본 시험법에서 사용되는 세포주의 제한적인 대사능력 및 실험적 조건 때문에 프로합텐(pro-hapten, P450 효소를 통해 효소 활성화가 필요한 물질)과 프리합텐(pre-hapten, 자가산화에 의해 활성화되는 물질) 물질에서 음성결과가 도출될 수 있다. 세포독성이 높은 시험물질은 신뢰성 있는 평가를 내리기 어렵다. 루시퍼라아제 효소 활성을 방해하는 시험물질은 루시퍼라아제의 활성을 교란시켜 발광(luminescence)을 증가시키거나 확연히 감소시킬 수 있어, 고농도의 식물에스트로젠 같이 루시퍼라아제 리포터 유전자를 과활성시키는 유사 화합물에서 얻어진 루시퍼라아제 발현은 신중하게 분석되어야 한다.

IV. 시험방법

4.1. 세포배양

KeratinSens™ 세포는 우태아 혈청과 항생제를 포함한 세포배양배지에서 37°C, 5% CO₂를 함유하는 가습조건에서 배양된다. 세포주를 수령하여 2-4 계대(passage) 증식시키고 균일한 원액으로 저장하며, 계대 수는 25 계대를 초과할 수 없다. KeratinSens™ 세포는 플레이트에 80%~90% 정도 채워지면 세포와 배지를 1:3 - 1:12 (1:3은 2일, 1:6은 3일, 1:12는 4일 정도 소요)비율로 재계대한다. 채취한(harvested) 세포는 시험 전날 4개의 96-well 플레이트에 10,000 cells/well의 밀도로 분주한다.

4.2. 시험물질 및 대조물질 조제

시험물질은 DMSO(Dimethyl sulfoxide, CAS No. 67-68-5, ≥99% 순도)에 최종 농도 200 mM로 녹인다. 시험물질이 DMSO에 용해되지 않는 경우 멸균수 또는 배양배지를 선택한다. 분자량(MW)이 정해지지 않은 시험물질의 경우 원액을 40 mg/mL 또는 4% (w/v) 농도로 제조한다. 시험물질의 DMSO 원액을 DMSO로 점차적으로 희석하여 0.098부터 200 mM까지 12개의 마스터(master) 농도를 만든다. 사용한 용매와 상관없이 마스터 농도는 혈청을 함유한 배양배지로 1차로 25배 희석하고, 배양 well에 최종 첨가되어 추가로 4배 더 희석됨으로써 시험물질의 최종 농도는 0.98부터 2000 μM이 된다. 시험법에 사용된 음성(용매)대조군은 DMSO로 플레이트당 6개의 well을 준비하며, 마스터 농도와 동일한 희석과정을 거친 최종 음성(용매)대조군의 농도는 1%이다. 양성대조군 cinnamic aldehyde(CAS No. 14371-10-9, ≥98% 순도)는 DMSO에 녹여 6.4 mM의 원액을 만들고 점차적으로 희석하여 0.4에서 6.4 mM까지 5개의 마스터 농도를 제조한다. 마스터 농도는 시험물질과 동일하게 희석하면 양성대조군의 최종 농도가 4에서 64 μM이 된다. (그림 1, 2)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	comp.1 0.098	comp.1 0.195	comp.1 0.39	comp.1 0.78	comp.1 1.56	comp.1 3.125	comp.1 6.25	comp.1 12.5	comp.1 25	comp.1 50	comp.1 100	comp.1 200
B	comp.2 0.098	comp.2 0.195	comp.2 0.39	comp.2 0.78	comp.2 1.56	comp.2 3.125	comp.2 6.25	comp.2 12.5	comp.2 25	comp.2 50	comp.2 100	comp.2 200
C	comp.3 0.098	comp.3 0.195	comp.3 0.39	comp.3 0.78	comp.3 1.56	comp.3 3.125	comp.3 6.25	comp.3 12.5	comp.3 25	comp.3 50	comp.3 100	comp.3 200
D	comp.4 0.098	comp.4 0.195	comp.4 0.39	comp.4 0.78	comp.4 1.56	comp.4 3.125	comp.4 6.25	comp.4 12.5	comp.4 25	comp.4 50	comp.4 100	comp.4 200
E	comp.5 0.098	comp.5 0.195	comp.5 0.39	comp.5 0.78	comp.5 1.56	comp.5 3.125	comp.5 6.25	comp.5 12.5	comp.5 25	comp.5 50	comp.5 100	comp.5 200
F	comp.6 0.098	comp.6 0.195	comp.6 0.39	comp.6 0.78	comp.6 1.56	comp.6 3.125	comp.6 6.25	comp.6 12.5	comp.6 25	comp.6 50	comp.6 100	comp.6 200
G	comp.7 0.098	comp.7 0.195	comp.7 0.39	comp.7 0.78	comp.7 1.56	comp.7 3.125	comp.7 6.25	comp.7 12.5	comp.7 25	comp.7 50	comp.7 100	comp.7 200
H	blank solvent	blank solvent	blank solvent	blank solvent	blank solvent	blank solvent	0.4 mM cinn. ald.	0.8 mM cinn. ald.	1.6 mM cinn. ald.	3.2 mM cinn. ald.	6.4 mM cinn. ald.	no cells blank

그림 1. 100 x DMSO 마스터 플레이트(mM)

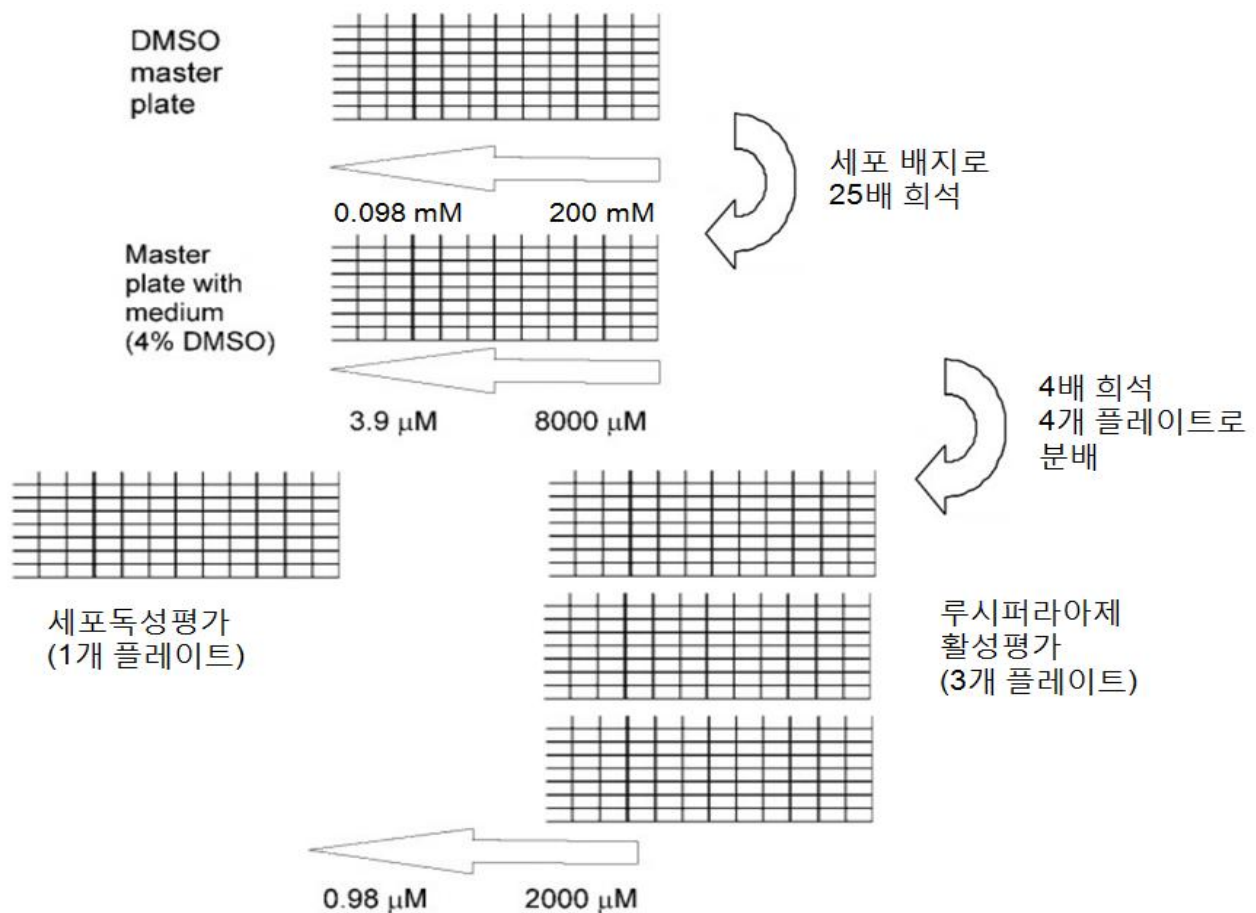


그림 2. 루시퍼라아제 활성및 세포독성평가 플레이트 모식도
(마스터 플레이트 준비 및 희석 과정)

4.3. 시험물질 및 대조물질 적용

각각의 시험물질과 양성대조물질에 대해 예측(양성 또는 음성)을 하기 위해 한 번의 실험이 필요하며, 이 실험은 매회 3개의 동일시료(three replicate)를 이용한 최소한 2회의 독립적인 반복실험이 필요하다($n=6$). 두 번의 독립적인 반복실험의 결과가 불일치하면 3개의 동일시료(triplicate)를 포함한 세 번째 반복실험을 해야 한다($n=9$). 각각의 독립적인 반복실험은 다른 날에 수행하고 그때마다 시험물질의 원액을 새로 만들고 세포도 새로 채취해야 한다. 그러나 같은 계대수의 세포를 사용하는 것은 허용된다.

세포를 96-well 플레이트에 분주한 다음 24시간 배양한다. 배지를 제거하고 새로운 배양배지(KeratinSensTM 시험법에서 항생제를 포함하지 않고 혈청을 포함하는 배양배지 150 μ L)로 갈아준 다음 25배 희석한 시험물질 또는 대조물질 50 μ L를 첨가한다. 플레이트당 배경 값(치)(background values)를 평가하기 위해 적어도 1개의 플레이트 당 1개의 well은 비워둔다(무세포이며 시험물질 무처리). KeratinSensTM 시험법에서 처리한 플레이트는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% CO_2 환경에서 48시간 배양한다. 시험물질을 배양하기 전에 휘발성 시험물질의 증발과 well 간 교차오염이 일어나지 않도록 주의한다.

4.4. 루시퍼라아제 활성 측정

세포를 48시간 동안 시험물질과 대조물질에 노출시킨 뒤 인산 완충 생리식염수(PBS)로 세척하고 발광측정을 위하여 적절한 용해완충액을 각 well에 첨가해 20분 동안 상온에 둔다. 세포 용해물을 포함한 플레이트를 발광측정기에 장착시키고, 각 well에 루시퍼라아제 기질 50 μ L를 첨가 한 후 1초 간 기다린 다음, 2초 간 루시퍼라아제 활성을 적산(integrate)한다. 발광측정기 기종에 따라 다르게 설정할 수 있다.

4.5. 세포독성 측정

세포생존율(cell viability, CV) 분석을 위해 시험물질과 대조물질을 포함한 배지에 48시간 노출시킨 후, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1)를 함유한 새 배지로 갈아주고, 세포를 5% CO_2 , 37°C 조건에서 4시간 배양한다. MTT 배지를 제거하고 각 well에 10% SDS 용액을 첨가하여 세포를 하루 동안 용해한다. 진탕한 후 광도계로 600 nm에서 흡광도를 측정한다.

V. 인정요건

ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법은 다음의 인정요건을 충족하여야 한다.

- 5.1 양성대조물질의 루시퍼라아제 활성 유도는 최소한 시험농도(4-64 μM) 중 하나에서 루시퍼라아제 활성이 음성(용매)대조군 발광 측정값 대비 1.5배 높은 값을 보이며, 통계적으로 유의성이 있어야 한다.

5.2. 양성대조물질의 $EC_{1.5}$ 값은 시험기관이 과거로부터 수행해온 데이터 평균 값 기준으로 표준편차 2배 이내(2SD)에 들어야 한다. 또한 $64 \mu M$ 농도의 cinnamic aldehyde에 대한 3번의 동일시료 측정의 평균 루시퍼라아제 유도 비율은 2에서 8사이여야 한다. 후자의 조건이 충족되지 않는 경우, cinnamic aldehyde의 농도 증가에 따라 루시퍼라아제 활성 유도의 상승을 볼 수 있다는 명확한 용량반응이 인정되는 경우에 한하여, 시험결과를 수용할 수 있다.

5.3 각각 6개의 well로 구성된 3번의 실험에서 음성(용매)대조군 DMSO의 발광 측정 값의 변동계수 평균은 20% 미만이어야 한다.

VI. 시험결과 및 보고

6.1. 결과의 처리

ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법의 결과값 계산은 I_{max} 값, $EC_{1.5}$ 값, IC_{50} 및 IC_{30} 을 이용하여 다음 등식에 따라 계산 할 수 있다.

6.1.1. 루시퍼라아제 활성의 유도배수

$$\text{유도 배수} = \frac{L_{\text{시료}} - L_{\text{공시료}}}{L_{\text{용매}} - L_{\text{공시료}}}$$

$L_{\text{시료}}$: 시험물질을 처리한 well에서의 발광 측정값

$L_{\text{공시료}}$: 무세포이며 시험물질 무처리한 well에서의 발광 측정값

$L_{\text{용매}}$: 용매(음성)대조군을 처리한 well에서의 평균 발광 측정값

6.1.1.1 시험물질과 양성대조군의 모든 농도에서 측정한 루시퍼라아제 활성 중 최대 유도 배수 평균 값 : I_{max} 값

6.1.2. 루시퍼라아제 활성을 음성(용매)대조군 발광 측정값보다 1.5배 초과하는 시험 물질의 농도 : $EC_{1.5}$ 값

$$EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1.5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

C_a : 1.5배 초과를 유도한 최저 농도(μM)

C_b : 1.5배 미만을 유도한 최고 농도(μM)

I_a : 1.5배 초과를 유도한 최저 농도에서 측정한 유도 배수 (3개 well의 평균)

I_b : 1.5배 미만을 유도한 최고 농도에서 측정한 유도 배수 (3개 well의 평균)

6.1.3. 세포생존율

$$\text{세포생존율} = \frac{V_{\text{시료}} - V_{\text{공시료}}}{V_{\text{용매}} - V_{\text{공시료}}} \times 100$$

$V_{\text{시료}}$: 시험물질 well에서의 MTT-흡광도 값

$V_{\text{공시료}}$: 무세포이며 시험물질 무처리한 비어 있는 well에서 측정한 MTT-흡광도 값

$V_{\text{용매}}$: 용매(음성)대조군을 처리한 well에서 측정한 MTT-흡광도 값의 평균

6.1.4. 세포생존율을 50%, 혹은 30% 감소시키는 시험물질의 농도: IC_{50} 및 IC_{30}

$$IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

x : 산출된 농도에서 세포생존율 감소율 % (IC_{50} 은 50%, IC_{30} 은 30%)

C_a : 세포생존율 감소율이 $x\%$ 보다 큰 농도 중 최저 농도(μM)

C_b : 세포생존율 감소율이 $x\%$ 보다 작은 농도 중 최고 농도(μM)

V_a : 세포생존율의 감소율이 $x\%$ 보다 큰 농도 중 최저 농도에서 측정한 세포생존율 %

V_b : 세포생존율의 감소율이 $x\%$ 보다 작은 농도 중 최고 농도에서 측정한 세포생존율 %

6.2. 결과의 해석 및 예측 모델

두 번의 반복실험에서 두 번 모두 또는 세 번의 반복실험 중 두 번이 아래 조건을 모두 만족한다면 그 결과는 양성으로 판정한다 (그림 3).

6.2.1. $I_{\max}$ 값이 1.5배 보다 높으며 음성대조군과 통계적으로 유의한 차이가 있다.

6.2.2. 루시퍼라아제 활성의 유도배수가 1.5가 넘는 최저농도($EC_{1.5}$ 값)에서 세포생존율은 70%보다 높다.

6.2.3. $EC_{1.5}$ 값이 1000 μM 보다 적다.

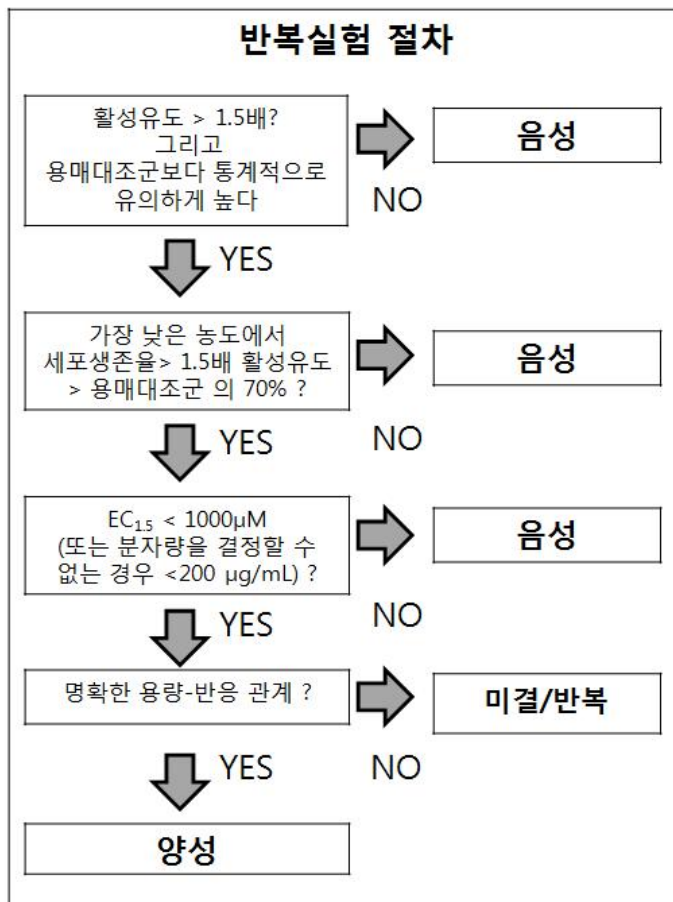
6.2.4. 시험물질에 대한 루시퍼라아제 활성유도가 명확한 용량-반응성을 나타낸다.

※ 참고문헌

ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법의 결과는 DB 프로토콜 155번에 제시된 엑셀 템플릿을 사용하여 계산이 가능하다.

- DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSensTM, 17pp.

웹주소: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>]



최소한 두 번의 반복 실험 수행

- 두 번의 반복실험이 양성일 경우, 최종결과는 양성
- 두 번의 반복실험이 음성일 경우, 최종결과는 음성

처음 두 번의 반복실험이 일치하지 않을 경우 세 번째 반복실험을 수행하여 그 결과에 근거하여 결정 (3번 중 2번)

그림 3. ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법 예측 모델

별첨 1. 번역본(OECD TG 442D)

체외 피부감작성 : ARE-Nrf2 루시페라아제 시험법

In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method

I. 서론

1. UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(GHS)의 정의에 따르면 피부감작물 기준에 따라 피부감작물질과 비감작물질을 구별하는데 사용되는 체외 시험법(ARE-Nrf2 루시페라아제 시험법, ARE-Nrf2 Luciferase Test)을 설명한다⁽¹⁾.
2. 피부감작에 관여하는 주요 생물학적 현상들이 존재한다. 피부감작과 관련된 화학적/생물학적 기전들에 대한 기존 지식들은 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 형식으로 설명된다⁽²⁾. 독성발현경로는 분자 수준의 초기 현상에서 중간 현상을 거쳐 유해건강영향, 즉 접촉성 피부염을 일으키는 과정으로 이루어진다⁽²⁾⁽³⁾. 분자 수준의 초기 단계는 피부 단백질의 친핵성 중심에 전자친화성 물질이 공유결합하는 것이다. 독성발현경로에서 두 번째 핵심 단계는 각질세포에서 일어나며, 염증반응과 항산화/전자친화성 반응요소-의존성 경로(Antioxidant/electrophile Response Element (ARE)-dependent pathways)와 같이 특정한 세포 신호전달경로와 관련된 유전자 발현의 변화로 나타난다. 세 번째 핵심 단계는 수지상세포(Dendritic Cells, DC)의 활성화이며 일반적으로 특정 세포 표면 표지자, 케모카인, 싸이토카인의 발현으로 평가한다. 네 번째 핵심 단계는 T-세포의 증식이며 마우스를 이용한 국소 림프절 시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)을 이용하여 간접적으로 평가한다⁽⁴⁾.
3. 피부감작성의 평가는 일반적으로 실험동물을 이용한다. 기니피그를 이용한 전통적인 방식인 Magnusson 및 Kligman의 Guinea Pig Maximization Test (GPMT)와 Buehler Test (TG 406)⁽⁵⁾는 피부감작의 유도단계와 유발단계를 모두 평가한다. 설치류를 이용한 시험법인 국소림프절 시험법(LLNA, TG 429)⁽⁴⁾ 및 LLNA의 비방사선 변형법인 LLNA: DA(TG 442A)⁽⁶⁾와 LLNA: BrdU-ELISA (TG 442B)⁽⁷⁾는 모두 유도단계의 반응만을 반영한 시험이다. 이 방법들은 동물복지 차원에서 기니피그 시험법보다 이점이 있고 유도단계의 피부감작성을 객관적으로 측정할 수 있기 때문에 피부감작성 시험법으로 인정되었다.
4. 최근에는 기전에 근거한 *in chemico*와 체외 시험법이 화학물질의 피부감작 유해성 평가에 과학적으로 타당하다고 여겨지고 있다. 그러나 현재 사용 가능한 각각의 비동물 시험법들이 독성 발현경로 기전을 제한적으로 충족시키기 때문에 현재 사용되고 있는 동물시험법을 완전히 대체하기 위해 비동물 시험법들(*in silico*, *in chemico*, *in vitro*)을 조합하는 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)가 필요하다⁽²⁾⁽³⁾.
5. 본 가이드라인에서 설명하는 시험법(ARE-Nrf2 루시페라아제 시험법)은 2항에 기술된 두 번째 핵심 단계를 다룬다. 피부감작물질은 항산화 반응요소(Antioxidant Response Element, ARE)

가 조절하는 유전자를 유도한다고 알려져 있다⁽⁸⁾⁽⁹⁾. 피부감작성 물질과 같은 작은 전자친화성 물질은 센서 단백질인 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)에 작용하여(예를 들어 시스테인 잔기의 공유결합적 변형) 전사인자인 Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2)로부터 분리시킨다. 분리된 Nrf2는 핵내 phase II 해독효소를 코딩하는 유전자와 같은 ARE-의존성 유전자를 활성화한다⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

6. 현재, 본 시험법 가이드라인에 다룬 체외 ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법은 KeratinoSens™를 이용한 시험법에 한정되어 있는데, 본 시험법은 검증시험이 종료되었고⁽⁹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾, 유럽동물대체시험법검증센터(European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, EURL ECVAM)의 독립적인 전문가 평가도 완료되었다⁽¹⁴⁾. KeratinoSens™ 시험법은 화학물질의 위험성 분류와 표시의 목적으로 피부감작성과 비감작성을 구별하기 위한 화학물질 유해성 시험과 평가에 대한 통합적 접근의 일부로 사용하는 것이 과학적으로 타당하다고 인정되었다⁽¹⁴⁾. 본 시험법을 수행하고자 한다면 KeratinoSens™ 시험법 개발자와 사용권 계약을 체결하여 본 시험법에 사용되는 재조합 세포주를 확보할 수 있다⁽¹⁵⁾.

7. 본 가이드라인에서 사용된 용어의 정의는 부록 1에 기술되어 있다.

II. 초기 고려사항과 제한점

8. Keap1-Nrf2-ARE 경로 활성화는 피부감작 독성발현경로 중 두 번째 핵심 단계에 불과하기 때문에, 이에 의한 시험법으로 얻어진 정보만으로 화학물질의 피부감작성 정도에 대해 결론을 내리기 어렵다. 따라서 본 시험법 가이드라인에서 얻어진 데이터는 다른 보완적인 정보들, 예를 들어 피부감작 독성발현경로의 다른 핵심 단계들을 다루는 체외 시험법과 유사한 화학물질과의 상관성방식(Read-across)을 포함한 비시험법으로부터 유래된 정보들과 조합하여 통합독성평가와 같은 통합적인 접근법의 맥락에서 고려되어야 한다. ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법을 다른 정보와 조합하여 사용한 예는 문헌에 보고되어 있다⁽¹³⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾.

9. 본 가이드라인에서 설명한 시험법은 통합독성평가의 맥락에서 피부감작성(UN GHS Category 1)과 비감작성을 구별하는데 사용할 수 있다. 1A와 1B의 분류기준을 운영하는 규제당국의 경우, 본 가이드라인만으로는 피부감작성물질을 UN GHS에서 규정한 이 두 가지 하위기준으로 세분화할 수 없으며, 안전성 평가를 위한 예측에도 사용할 수 없다. 그러나 규제 체계에 따라 양성결과만으로도 화학물질을 UN GHS Category 1로 분류할 수 있다.

10. 본 시험법의 독립된 제3차 평가에 사용된 검증 연구의 결과와 본 시험법의 개발 실험실에서 얻어진 데이터세트에 근거하면, KeratinoSens™ 시험법은 세포배양에 경험이 있는 실험실에서의 기술이전이 가능하다는 것이 확인되고 있다. 본 시험법으로 예측할 수 있는 실험실 내 재현가능성과 실험실 간의 재현가능성은 모두 대략 85% 수준이다⁽¹⁴⁾. 본 시험의 평가 및 독립적인 전문가 평가로 EURL ECVAM에 제출된 모든 데이터에 따르면, LLNA 결과와 비교한 경우 KeratinoSens™에 의한 피부감작성물질(UN GHS Category 1)과 비감작성물질을 식별하는 정확도는

77%(155/201), 민감도는 78%(71/91), 특이도는 76% (84/110)이었다⁽¹⁴⁾. 이 수치는 최근에 발표된 145개의 시험물질을 대상으로 한 실험실 내 시험 결과(정확도 77%, 민감도 79%, 특이도 72%)와 유사하다⁽¹³⁾. KeratinoSens™ 시험법은 Category 1A(강감작성)에 비해 Category 1B(약중감작성)의 경우에는 피부감작성이 낮게 예측되는 경향이 있다.⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ 종합하면 이러한 정보는 KeratinoSens™ 시험법이 피부감작 위험성을 식별하는 데 유용하다는 점을 나타낸다. 그러나 여기에서 제시된 KeratinoSens™의 단일시험법(Stand-alone)으로서의 정확도 값은 단순한 지표일 뿐이다. 왜냐하면 이 시험법은 화학물질 위험성 시험과 평가에 대한 통합적 접근의 맥락에서 다른 정보와의 조합을 고려해야 하며, 9항에서 제시된 항목과도 일치되어야 하기 때문이다. 또한, 피부감작성을 평가하기 위해 비동물 시험법을 활용할 때, 다른 동물실험뿐만 아니라 LLNA 역시 인체의 상황을 완벽하게 반영하지 못할 수 있다는 사실을 염두에 두어야 한다.

11. 본 가이드라인에서 “시험물질(test chemical)”은 시험대상을 의미하며¹⁾, 단일성분물질, 다성분물질 또는 혼합물 시험에 대한 ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법의 적용 가능성(applicability)과는 무관하다. 현재 이용 가능한 데이터에 따르면 KeratinoSens™ 시험법은 다양한 유기 작용기, 반응기전, 피부감작성(체내 시험에서 확인한 바와 같이), 물리화학적 성질을 가지는 시험물질에 적용할 수 있는 것으로 나타났다⁽⁹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾. 혼합물 시험에 대한 데이터가 제한적으로 존재하긴 하지만, 주로 단일성분물질을 시험하였다⁽²⁰⁾. 그럼에도 불구하고, 본 시험법은 기술적으로는 다성분물질과 혼합물을 시험하는데 적용될 수 있다. 그러나 규제의 목적으로 데이터를 생산하기 위해 본 가이드라인을 혼합물에 적용할 때, 이 시험법이 그러한 목적에 적합한 결과를 제공할 수 있을지, 적합하다면 그 이유는 무엇인지를 고려해야 한다. 이러한 고려사항은 혼합물 시험에 대한 규제요건이 있는 경우에는 필요하지 않다. 더구나 다성분물질이나 혼합물을 시험할 때는 세포독성을 나타내는 성분에 의한 관찰 반응에 대해 간섭할 가능성을 고려해야 한다. ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법은 물 또는 DMSO에서 가용성이거나 안정적인 분산(시험물질이 침전하거나 용매로부터 다른 단계로 분리되지 않는 콜로이드 또는 현탁액)을 이루는 시험물질에 적용할 수 있다(다성분물질 또는 혼합물을 시험하는 경우 모든 시험물질 구성 성분 포함). 최종 최고 농도 2000 μ M에서(22항 참조) 이러한 조건을 충족하지 못하는 시험물질은 낮은 농도에서 시험할 수 있다. 이 경우, 39항에서 설명한 양성 기준을 충족하는 결과는 시험물질을 피부감작물질로 구별하는데 이용할 수 있지만, 농도 < 1000 μ M에서 얻어진 음성 결과는 미결로 간주한다(39항의 예측 모델 참조). 일반적으로 LogP가 5까지의 시험물질은 성공적으로 시험할 수 있지만 LogP가 7을 초과하는 극단적인 소수성 물질은 이 시험법의 적용범위 밖에 있다고 알려져 있다⁽¹⁴⁾. LogP가 5와 7 사이인 시험물질에 대해서는 제한된 정보밖에 없다.

12. 리신(lysine)-잔기에만 반응성을 갖는 물질은 본 시험법에 따라 음성으로 검출될 수 있어 신중하게 해석한다. 더욱이 사용된 세포주의 제한된 대사능력과⁽²¹⁾ 실험조건 때문에 특히 산화율이 더딘 프로하펜(pro-haptens, P450 효소를 통해 효소 활성화가 필요한 화학물질)과 프리하펜(pre-hapten, 자가산화에 의해 활성화된 화학물질)의 경우도 음성 결과를 생성할 수 있다. 반면에 감작물질은 아니지만 화학적 스트레스성 시험물질은 위양성 결과를 도출할 수 있다⁽¹⁴⁾. 더

1) 2013년 6월, 합동회의에서 시험대상을 언급할 때 “시험물질”이라는 용어를 신규 및 개정판 시험법 가이드라인에서 가능한 한 보다 일관되게 사용하기로 합의했다.

구나 세포독성이 높은 시험물질은 신뢰성 있는 평가를 내리기 어렵다. 마지막으로 루시페라아제(luciferase) 효소를 방해하는 시험물질은 세포 기반의 시험에서 루시페라아제의 활성을 교란시켜 발광(luminescence)을 증가시키거나 확연히 감소시킬 수 있다⁽²²⁾. 예를 들어, 1 μ M 이상 농도의 식물에스트로젠은 다른 루시페라아제-기반 시험에서 루시페라아제 리포터 유전자(reporter gene)를 과활성시켜 발광 신호를 간섭한다고 알려져 있다⁽²³⁾. 따라서 고농도의 식물에스트로젠 또는 식물에스트로젠과 같이 루시페라아제 리포터 유전자를 과활성시키는 유사한 화합물에서 얻어진 루시페라아제 발현 결과는 신중하게 관찰해야 한다⁽²³⁾. 기타 다른 특정한 범주의 시험물질에 대하여 본 시험법 가이드라인을 적용할 수 없다는 증거가 있는 경우에는 이 시험법을 사용하지 말아야 한다.

13. 위에서 설명한 바와 같이, KeratinoSens™ 시험법은 피부감작성과 비감작성을 구별하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라 농도-반응 정보를 제공하여 통합독성평가와 같은 통합적 접근 방식으로 사용할 경우 감작능을 평가하는 데도 유용하다⁽¹⁹⁾. 그러나 KeratinoSens™ 시험법 결과가 어떻게 피부감작 정도의 평가에 기여할지를 파악하고⁽²⁴⁾ UN GHS⁽¹⁾에 따라 감작물질을 세분하기 위해서는 더 많은 연구(특히, 인체 데이터에 바탕을 둔 신뢰성 있는 연구)가 요구된다.

III. 시험원리

14. ARE-Nrf2 루시페라아제 시험법은 선별적 플라스미드를 안정적으로 도입한 인체피부각질 세포주(HaCaT)에서 유래한 부착성 불멸화 세포주를 이용한다. 이 세포주는 구성 프로모터의 전사 조절을 받는 루시페라아제 유전자를 가지고 있으며, 이 프로모터는 접촉 감작물질에 의하여 과발현-조절을 받는다고 알려진 유전자의 ARE 요소와 융합되어 있다⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾. 루시페라아제 신호는 감작물질이 내인성 Nrf2 의존성 유전자를 활성화하는 것을 반영하며, 재조합 세포주에서 루시페라아제 신호가 Nrf2에 의존한다는 점이 입증되었다⁽²⁷⁾. 루시페라아제 기질(substrate)을 이용하여 루시페라아제 유전자 유도를 정량적으로 측정(발광 검출)할 수 있다. 이런 방식으로 전자친화성 시험물질에 노출된 후 세포에서 일어난 Nrf2 전사인자의 활성을 측정할 수 있다.

15. KeratinoSens™ 시험법에서 세포 생존에 유의한 영향을 주지 않는 농도(1000 μ M 미만 및 세포생존율이 70%초과인 농도⁽⁹⁾⁽¹²⁾)에서 루시페라아제 활성이 용매대조군보다 1.5 배 또는 50% 초과하면서 통계적으로 유의할 경우 시험물질을 양성으로 간주한다. 이를 위하여 용매(음성)대조군과 비교한 루시페라아제 활성의 최대 유도 배수(maximal fold induction of the luciferase activity over negative control, $I_{\max}$ 값)를 정한다. 또한, 세포가 일련의 시험물질 농도에 노출되기 때문에, 통계적으로 유의하게 $EC_{1.5}$ 값을 초과하여 루시페라아제 활성을 유도하는 농도를 용량-반응 곡선(32항의 계산방법 참조)에 대입하여 구한다. 마지막으로 루시페라아제 활성 유도가 세포독성을 나타내는 농도보다 낮은 농도에서 일어나는지 판단하기 위하여 세포독성시험을 병행하여 측정한다.

16. 본 가이드라인에서 설명한 ARE-Nrf2 루시페라아제 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 부록 2에 수록된 10개의 숙련도 물질을 이용하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다.

17. 새로운 또는 KeratinoSens™ 시험법과 유사한 변형 체외 ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법을 검증하고 이들을 포함하기 위해 본 시험법 가이드라인을 적절한 시기에 개정할 수 있도록 시험법평가기준(Performance Standards, PS)⁽²⁸⁾이 마련되었다. 이들 시험법은 OECD에서 검토하고 본 시험법 가이드라인에 포함된 경우, 시험법이 시험법평가기준에 준하여 검증되었을 때만 데이터 상호인정(Mutual Acceptance of Data, MAD)을 보증할 수 있다.

IV. 시험방법

18. 현재, 본 시험법 가이드라인을 충족시키는 시험법은 과학적으로 검증된 KeratinoSens™ 시험법 단 하나이다⁽⁹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾. KeratinoSens™ 시험법에 대한 표준작업지침서(Standard Operating Procedure, SOP)가 마련되어 있으며 실험실에서 이 시험법을 운용하고자 할 때 준수하여야 한다⁽¹⁵⁾. 본 시험법을 운용하고자 하는 실험실은 KeratinoSens™ 시험법 개발자와 사용권 계약을 체결하여 본 시험법에 사용되는 재조합 세포주를 확보할 수 있다. 다음 항에서 ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법의 주요 구성과 절차를 설명한다.

가. 각질세포 배양

19. ARE-요소의 조절에 의해 루시퍼라아제 리포터 유전자가 안정적으로 삽입된 형질전환 세포주(transgenic cell line)인 KeratinoSens™ 세포주를 이용한다. 세포주를 수령 후 2-4 계대(passage) 증식시키고 균질한 원액으로 냉동 저장한다. 이 최초 원액은 최대 계대수(KeratinoSens™의 경우 25계대)까지 증식시킬 수 있고, 적절한 유지배양액(maintenance medium)(KeratinoSens™의 경우 혈청과 Geneticin을 함유한 DMEM)에서 일상적인 시험을 할 수 있다.

20. 시험에 사용하기 위해서 세포는 플레이트에 80%~90%정도 채워져 있어야 하며, 세포가 플레이트 전체를 완전히 덮지 않도록 주의한다. 시험 전날 세포를 채취하여 96 well 플레이트에 분산시킨다(KeratinoSens™의 경우 10,000 cells/well). Well에 세포가 균일하게 분산되도록 하기 위하여 세포를 분주하는(seeding) 과정에서 세포가 침전되지 않도록 주의한다. 이 과정이 잘못되면 well 간의 변동성이 커진다. 매 반복실험(repetition)마다 3개의 동일시료(three replicate)를 사용하여 루시퍼라아제 활성을 측정하며, 1개의 병행 시료를 세포 생존율 실험에 사용한다.

나. 시험물질과 대조물질 조제

21. 시험물질과 대조물질은 시험 당일에 제조한다. KeratinoSens™ 시험법에서 시험물질은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 최종 희방농도(200 mM)로 용해한다. DMSO 용액은 자체적으로 멸균되었다고 가정하기 때문에 멸균여과 처리할 필요는 없다. 시험물질이 DMSO에 용해되지 않는 경우 멸균수 또는 배양배지에 용해한 다음 여과 멸균시킨다. KeratinoSens™ 시험법에서

분자량(MW)이 정해지지 않은 시험물질의 경우 원액을 40 mg/mL 또는 4% (w/v) 농도로 제조한다. DMSO, 물, 배지 이외의 용매를 사용하는 경우 과학적으로 타당한 이유를 제공하여야 한다.

22. 시험물질의 DMSO 원액을 DMSO로 점차적으로 희석하여 12개의 마스터(master) 농도를 만든다(KeratinSens™ 시험법에서는 0.098 mM~200 mM). DMSO에 용해되지 않는 시험물질은 멸균수 또는 멸균배양배지로 희석하여 마스터 농도를 만든다. 사용한 용매와 상관없이 마스터 농도는 혈청을 함유한 배양배지로 25배 더 희석하고, 최종적으로 4배 더 희석하여 사용한다. 따라서 KeratinSens™ 시험법에서 시험물질의 최종 농도는 0.98부터 2000 μ M이다. 세포독성 또는 낮은 용해도와 같은 타당한 이유가 있을 경우 다른 농도를 사용할 수 있다.

23. KeratinSens™ 시험법에서 사용된 음성(용매)대조군은 DMSO(CAS No. 67-68-5, $\geq$ 99% 순도)이고 플레이트당 6개의 well이 준비된다. DMSO는 22항에서 기술한 마스터 농도와 동일한 희석과정을 거치고 최종 음성(용매)대조군의 농도는 1%이다. DMSO는 1% 농도에서 세포 생존에 영향을 주지 않으며 시험물질과 양성대조군에서 같은 농도로 함유되어 있다. DMSO에 용해되지 않는 시험물질을 물에 희석하였을 경우 다른 시험물질과 대조군과 마찬가지로 모든 well의 최종 시험용액에서 DMSO 농도를 1%가 되도록 한다.

24. KeratinSens™ 시험법에서 사용되는 양성대조군은 cinnamic aldehyde(CAS No. 14371-10-9, $\geq$ 98% 순도)이다. Cinnamic aldehyde를 DMSO에 녹여 6.4 mM의 원액을 만들고 점차적으로 희석하여 0.4부터 6.4 mM까지 5개의 마스터 농도를 제조한다. 마스터 농도는 22항에서 설명한 바와 같이 희석하여 양성대조군의 최종 농도가 4에서 64 μ M이 되게 한다. 만일 허용기준을 충족하는 과거 데이터가 있다면 되도록 중간 범위의 EC_{1.5} 값을 갖는 다른 적당한 양성대조군을 이용할 수 있다.

다. 시험물질과 대조물질의 적용

25. 각각의 시험물질과 양성대조물질에 대해 예측(양성 또는 음성)을 하기 위해 한 번의 실험이 필요하며, 이 실험은 각각 3개의 동일시료를 포함한 최소한 두 번의 독립적인 반복실험(repetitions)이 필요하다(n=6). 두 번의 독립적인 반복실험의 결과가 불일치하면 3개의 동일시료를 포함한 세 번째 반복실험을 해야 한다(n=9). 각각의 독립적인 반복실험은 다른 날에 수행하고 그때마다 시험물질의 원액을 새로 만들고 세포도 새로 채취해야 한다. 같은 계대수의 세포를 사용하는 것은 허용된다.

26. 20항에 기술된 대로 세포를 96-well 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)에 분주한 다음 24시간 배양한다. 배지를 제거하고 새로운 배양배지(KeratinSens™ 시험법에서 geneticin을 포함하지 않고 혈청을 포함하는 배양배지 150 μ L)로 갈아준 다음 25배 희석한 시험물질 또는 대조물질 50 μ L를 첨가한다. 플레이트당 배경 값(치)(background values)를 평가하기 위해 적어도 1플레이트 1개의 well은 비워둔다(무세포이고 무처리).

27. KeratinoSens™ 시험법에서 처리한 플레이트는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% CO_2 환경에서 48시간 배양한다. 시험물질을 배양하기 전에 휘발성 시험물질의 증발과 well간 교차오염이 일어나지 않도록 주의한다(예를 들어 호일로 플레이트를 덮음).

라. 루시퍼라아제 활성 측정

28. 적절한 발광측정을 위해 세 가지 요소가 중요하다.

- 감도가 좋은 발광측정기(luminometer) 선택
 - 빛의 교차오염을 막을 수 있도록 충분히 높은 플레이트 사용
 - 충분한 감도와 낮은 변동성을 보장하기 위해 충분히 빛을 발산하는 루시퍼라아제 기질사용
- 시험을 시작하기 전에 부록 3에 설명한 대조실험 설정에 따라 시험하여 이 세 가지 요건이 충족되는지 확인한다.

29. KeratinoSens™ 시험법에서 세포를 48시간 동안 시험물질과 대조물질에 노출시킨 뒤 인산 완충 생리식염수(PBS)로 세척하고 발광측정을 위하여 적절한 용해완충액을 각 well에 첨가해 20분 동안 상온에 둔다.

30. KeratinoSens™ 시험법의 경우 세포 용해물을 포함한 플레이트를 발광측정기에 장착시키고 다음 절차를 따라 측정한다. (i) 각 well에 루시퍼라아제 기질($50 \mu\text{L}$)을 첨가한다. (ii) 1초간 기다린다. (iii) 2초간 루시퍼라아제 활성을 적산(integrate)한다. 발광측정기 기종 등에 따라 다르게 설정할 경우 타당한 사유를 밝혀야 한다. 또한 부록 3의 정도 관리 실험을 충분히 충족시키는 경우, 글로우형 기질(glow substrate)도 사용할 수 있다.

마. 세포독성 측정

31. KeratinoSens™ 시험법의 세포생존율(cell viability, CV) 분석을 위해 배지를 시험물질과 대조물질을 포함한 배지에 48시간 노출시킨 후, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1)를 함유한 새 배지로 갈아주고, 5% CO_2 , 37°C 조건에서 4시간 배양한다. 그런 다음 MTT 배지를 제거하고 각 well에 10% SDS 용액을 첨가하여 세포를 하루 동안(over night) 용해한다. 진탕한 후 광도계로 600 nm에서 흡광도를 측정한다.

IV. 시험결과 및 보고

가. 데이터 평가

32. KeratinoSens™ 시험법에서 다음의 지표들을 계산한다:

- 시험물질과 양성대조군의 모든 농도에서 측정된 루시페라아제 활성 중 최대 유도 배수 평균($I_{\max}$) 값
- 루시페라아제 활성이 음성(용매)대조군 발광 측정값보다 1.5배 초과하는(루시페라아제 활성 50% 증가) 시험물질의 농도를 나타내는 $EC_{1.5}$ 값
- 세포생존율이 50%와 30%로 감소되는 IC_{50} 와 IC_{30} 농도 값

1) 루시페라아제 활성 유도 배수(fold induction)는 방정식 1로 구하고, 전체 최대 유도 배수 ($I_{\max}$ 값)는 각 반복실험의 평균으로 구한다.

$$\text{방정식 1: 유도 배수} = \frac{L_{\text{시료}} - L_{\text{공시료}}}{L_{\text{용매}} - L_{\text{공시료}}}$$

$L_{\text{시료}}$ 는 시험물질을 처리한 well에서의 발광 측정값

$L_{\text{공시료}}$ 는 무세포이며 시험물질 무처리한 well에서의 발광 측정값

$L_{\text{용매}}$ 는 용매(음성)대조군을 처리한 well에서의 평균 발광 측정값

2) $EC_{1.5}$ 값은 방정식 2에 따라 선형내삽법을 이용하여 구한다. 전체 $EC_{1.5}$ 값은 각 반복실험의 기하평균 값으로 산출한다.

$$\text{방정식 2: } EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1.5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

C_a : 1.5배 초과 유도를 가진 최저 농도(μM)

C_b : 1.5배 미만의 유도를 가진 최고 농도(μM)

I_a : 1.5배 초과 유도를 가진 최저 농도에서 측정된 유도 배수 (3개 well의 평균)

I_b : 1.5배 미만의 유도를 가진_최고 농도에서 측정된 유도 배수 (3개 well의 평균)

3) 세포생존율은 방정식 3으로 구한다.

$$\text{방정식 3: 세포생존율} = \frac{V_{\text{시료}} - V_{\text{공시료}}}{V_{\text{용매}} - V_{\text{공시료}}} \times 100$$

$V_{\text{시료}}$ 는 시험물질 well에서의 MTT-흡광도 값

$V_{\text{공시료}}$ 는 무세포이며 시험물질 무처리한 well에서 측정된 MTT-흡광도 값

$V_{\text{용매}}$ 는 세포 및 용매(음성)대조군을 처리한 well에서 측정된 MTT-흡광도 값의 평균

4) IC_{50} 과 IC_{30} 은 선형내삽법을 이용하여 방정식 4로 구한다. 전체 IC_{50} 과 IC_{30} 은 각 반복실험의

기하평균 값으로 구한다.

$$\text{방정식 4: } IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100-x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

X는 산출된 농도에서 세포 생존율 감소율 % (IC₅₀은 50%, IC₃₀은 30%)

C_a는 세포생존율 감소율이 x%보다 큰 농도 중 최저 농도(μM)

C_b는 세포생존율 감소율이 x%보다 작은 농도 중 최고 농도(μM)

V_a는 세포생존율의 감소율이 x%보다 큰 농도 중 최저 농도에서 측정된 세포생존율 %

V_b는 세포생존율의 감소율이 x%보다 작은 농도 중 최고 농도에서 측정된 세포생존율 %

1.5배가 넘는 루시퍼라아제 활성을 유도하는 각각의 농도에 대해 (two-tailed Student's t-test 등으로) 통계적 유의성을 산출하기 위해 3개의 동일시료에 대한 발광 측정값과 용매(음성)대조군의 발광 측정값을 비교하여 루시퍼라아제 활성 유도가 통계적으로 유의한지를 판별한다($p < 0.05$). 1.5배가 넘는 루시퍼라아제 활성을 유도하는 가장 낮은 농도는 EC_{1.5} 값을 결정하는 값이다. 각각의 경우 이 값이 IC₃₀ 보다 낮은지 확인한다. 즉 EC_{1.5} 값 결정 농도에서 세포생존율이 30% 미만 감소하는 것을 확인한다.

33. 데이터를 그래프로 표시하여 육안으로 확인할 것을 권장한다. 만약 용량-반응 곡선이 명확하지 않거나 불연속으로 두 번 초과하는 반응(biphasic)인 경우 재시험을 실시하여 이것이 시험물질의 특징인지 실험상의 오류인지 확인한다. 독립적인 실험에서 2상 반응이 재현되면 낮은 쪽 EC_{1.5} 값을 보고해야 한다.

34. 1.5배를 넘는 활성을 유도하지만 통계적 유의성이 없다가 더 높은 농도에서 통계적 유의성이 발견되는 드문 경우도 있다. 이때는 1.5배 초과하는 유도에 대한 통계적 유의성이 세포독성이 없는 농도에서 발견될 경우에만 반복실험 결과가 유효하며 양성으로 간주한다.

35. 가장 낮은 시험농도인 0.98 μM에서 이미 1.5 배 초과 유도를 하는 시험물질의 경우 용량-반응 곡선을 육안으로 검사하여 <0.98인 EC_{1.5} 값을 정한다.

나. 인정요건

36. KeratinoSens™ 시험법을 사용할 경우 다음 인정요건을 충족시켜야 한다. 첫째, 양성대조군 cinnamic aldehyde에 의한 루시퍼라아제 활성 유도는 최소한 시험농도(4~64 μM) 중 하나에서 (t-test 검정 등으로) 루시퍼라아제 활성이 음성(용매)대조군 발광 측정값보다 1.5배 초과하는 값에서 통계적으로 유의성이 있어야 한다.

37. 둘째, cinnamic aldehyde의 EC_{1.5} 값은(예를 들어, 검증된 데이터세트에 근거하여 7 μM~30 μM 사이에서) 시험기관의 정기적으로 갱신된 평균 값의 표준편차 2배(2SD)이내여야 한다.

또한 64 μM 농도의 cinnamic aldehyde에 대한 3개의 동일시료 측정의 평균 루시퍼라아제 유도 비율은 2에서 8사이여야 한다. 후자의 조건이 충족되지 않는 경우, cinnamic aldehyde의 농도 증가에 따라 루시퍼라아제 활성 유도의 상승을 볼 수 있다는 명확한 용량반응이 인정되는 경우에 한하여, 시험결과를 받아들일 수 있다.

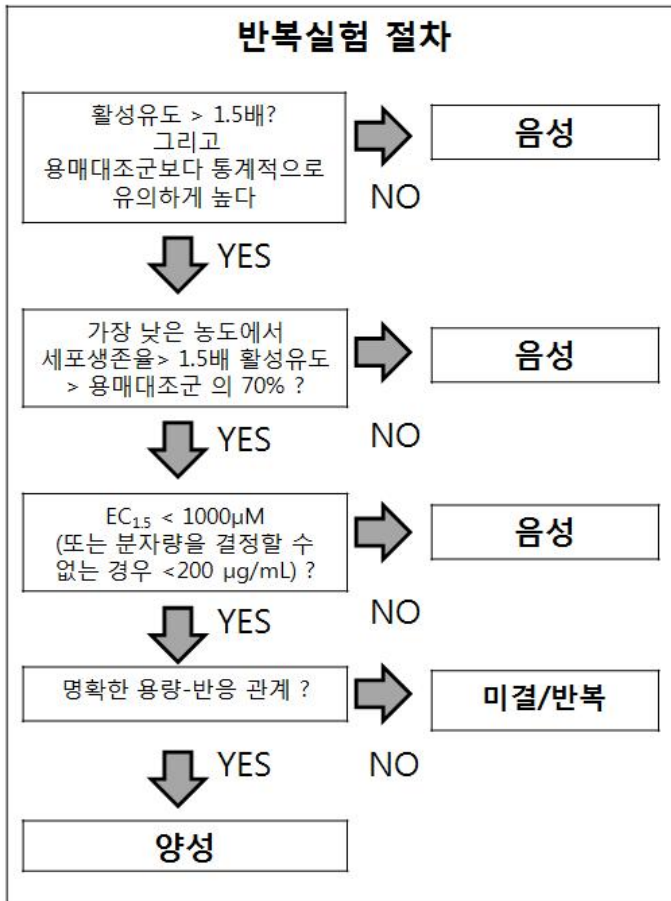
38. 마지막으로, 각각 6개의 well로 구성된 3번의 실험에서 음성(용매)대조군 DMSO의 발광 측정값 변동계수 평균은 20% 미만여야 한다. 만약 변동계수가 이 보다 높을 경우 시험결과는 사용될 수 없다.

다. 결과의 해석과 예측모델

39. 두 번의 반복실험에서 모두 또는 세 번의 반복실험 중 두 번에서 다음 네가지 조건이 모두 충족되면 KeratinoSensTM 시험법에서 양성으로 예측하고, 그렇지 않으면 음성으로 예측한다(그림 1).

1. $I_{\max}$ 값이 1.5배 보다 크고 용매(음성)대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 차이가 있다 (two-tailed, unpaired Student's t-test로 검정).
2. 루시퍼라아제 활성을 1.5배 보다 크게 유도하는 가장 낮은 농도에서 세포생존율이 70% 보다 높다($EC_{1.5}$ 값 결정 농도).
3. $EC_{1.5}$ 값이 1000 μM 보다 작다(또는 분자량을 결정할 수 없는 시험물질의 경우 <200 $\mu\text{g/mL}$).
4. 루시퍼라아제 활성 유도에 대한 전체 용량-반응 관계가 명확하다(또는 33항에서 설명한 2상의 용량-반응 관계).

반복실험에서 앞의 세 조건을 충족하지만 루시퍼라아제 활성 유도에 대한 용량-반응 관계가 명확하지 않으면 그 중복실험의 결과는 미결로 간주되고 추가시험이 요구될 수 있다(그림 1). 또한 <1000 μM (또는 분자량을 결정할 수 없는 시험물질의 경우 <200 $\mu\text{g/mL}$) 농도에서 얻은 음성 결과 역시 미결로 간주된다(11항 참조).



최소한 두 번의 반복 실험 수행

- 두 번의 반복실험이 양성일 경우,
최종결과는 양성

- 두 번의 반복실험이 음성일 경우,
최종결과는 음성

처음 두 번의 반복실험이 일치하지
않을 경우 세 번째 반복실험을 수행
하여 그 결과에 근거하여 결정
(3번 중 2번)

그림 1. KeratinoSens™ 시험법에서 사용되는 예측 모델. KeratinoSens™ 예측은 통합독성평가의 체계와 9항과 11항의 조건에 따라 고려되어야 한다.

40. 드문 경우, 세포독성 수준에 매우 가까운 농도에서 루시퍼라아제 활성을 유도하는 시험물질은 어떤 반복실험에서는 세포독성을 일으키지 않는(non-cytotoxic) 수준에서(EC_{15} 값 결정 농도가 $< IC_{30}$ 보다 낮음), 다른 반복실험에서는 세포독성(cytotoxic)을 일으키는 수준에서(EC_{15} 값 결정 농도가 $> IC_{30}$ 보다 높음) 양성으로 나올 수 있다. 이런 시험물질은 활성 유도가 세포독성 수준에서 일어나는지 여부를 확인하기 위하여 더 낮은 희석배수(예: well 간에 1.33 또는 $\sqrt{2}$ (=1.41)배 희석)를 사용하여 보다 제한적인 용량-반응 분석과 함께 다시 시험을 수행해야 한다⁽⁹⁾.

라. 시험보고서

41. 시험보고서는 다음의 정보를 포함하여야 한다.

- 시험물질
 - 단일성분물질
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 또는 다른 식별

자료 등의 화학물질 식별정보

- 물리적 성상, 용해도, DMSO 용해도, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 특성(확보 가능한 범위에서)
- 순도, 불순물의 종류
- 해당하는 경우, 시험 전 처리방법(예: 가운, 분쇄)
- 시험 농도
- 보관 조건과 안정성
- 다성분물질, UVCB(Unknown or Variable composition. Complex reaction products and Biological materials)와 혼합물
 - 물질의 특성 정보, 식별정보(위 참조), 순도, 함유량 및 해당 성분의 관련 물리화학적 성질(위 참조)(확보 가능한 범위에서)
 - 물리적 성상, 용해도, DMSO 용해도 및 기타 관련 물리화학적 특성(확보 가능한 범위에서)
 - 분자량 또는 조성이 알려진 혼합물/중합체의 경우 외관상의 분자량(apparent molecular weight) 또는 시험 수행과 관련된 기타 정보
 - 해당하는 경우, 시험 전 처리방법(예: 가운, 분쇄)
 - 시험 농도
 - 보관 조건과 안정성
- 대조군
 - 양성대조군
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 또는 다른 식별 자료 등의 화학물질 식별정보
 - 물리적 성상, 용해도, DMSO 용해도, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 특성
 - 순도, 불순물의 종류
 - 해당하는 경우, 시험 전 처리방법(예: 가운, 분쇄)
 - 시험 농도
 - 보관 조건과 안정성
 - 해당하는 경우, 적합한 인정요건을 입증할 수 있는 기존 양성대조군 결과에 대한 참고 자료
 - 음성(용매)대조군

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호 또는 다른 식별자료 등의 화학물질 식별정보
- 순도, 불순물의 종류
- 본 가이드라인에 언급된 것 이외의 다른 음성대조군/부형제가 사용되는 경우 물리적 외관, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 성질
- 보관 조건과 안정성
- 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 근거
- 시험법 조건
 - 시험의뢰자, 시험기관, 시험책임자의 이름과 주소
 - 사용한 시험법의 설명
 - 사용한 세포주, 세포주 보관 조건과 공급처(예: 세포주 제공 기관)
 - 세포주의 계대수, 시험에 사용한 세포가 플레이트에 채워진 정도
 - 시험 전 세포 분주 시 사용한 세포수 측정 방법과 균일한 세포수 배분을 위해 취한 조치 (20항 참조)
 - 실험기기 설정 포함, 사용한 발광측정기(예: 모델), 사용한 루시페라아제 기질 (substrate), 부록 3에서 설명한 대조실험에 근거한 발광 측정의 적절성 제시
 - 시험법 수행에서 실험실의 숙련도 확인용 물질 시험을 통한 숙련도 입증 과정 또는 지속적인 시험법의 재현성 입증 과정
- 시험 절차
 - 반복실험(repetitions)과 반복측정(replicates)의 횟수
 - 시험물질 농도, 시험물질 처리 절차, 노출 시간(권장된 것과 다를 경우)
 - 사용한 평가 및 결정 기준 설명
 - 인정요건에 대한 설명
 - 시험 절차의 모든 변경 사항에 대한 설명
- 결과
 - 각각의 반복실험에 대한 시험물질과 양성대조군으로부터 얻은 I_{max} 값, $EC_{1.5}$ 값, 세포생존율(IC_{50} , IC_{30}), 개별 반복시험 값으로부터 얻은 모든 데이터를 이용하여 계산된 평균 값 (I_{max} :평균 값, $EC_{1.5}$ 값과 세포생존율 ; 기하평균 값)과 표준편차를 표로 제시, 즉, 예측모델에 따라 시험물질의 평가 제시.
 - 각 시험에 대한 음성대조군의 발광 측정값으로부터 얻은 변동계수
 - 루시페라아제 활성 유도과 생존율에 대한 용량-반응 곡선 그래프

- 다른 관련된 관찰사항
- 결과 토의
 - KeratinoSensTM 시험법으로 얻은 결과에 대한 토의
 - 다른 관련 정보가 이용 가능한 경우 통합독성평가의 맥락에서 시험법 결과 고려
- 결론

V. 참고문헌

1. United nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.]
2. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.
3. Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
4. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
5. OECD (1992). Skin Sensitisation. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
6. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
7. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
8. 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.

- 9 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.
10. 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.
11. Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 18,1, 45-49.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSensTM., 17pp. Available: [<http://ecvam\~dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
16. Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol Sci.* 107, 106-121.
17. Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul Toxicol Pharmacol.* 60, 389-400.
18. Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining in vitro

methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.

19. Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A., 2013. Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353\1364.
20. 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.
21. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
22. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
23. OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
25. Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J Invest Dermatol*, 126, 1813-1822.
26. Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I. And Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
27. Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol In Vitro* 27, 2225-2232.
28. OECD (2014, in preparation). Performance Standards for the assessment of proposed

similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods in TG xxx. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N.XXX, OECD, Paris.

29. 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. OECD, Paris, France.
30. NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides - (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. Disponible à l'adresse suivante :
<http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>

부록 1. 용어정의

정확도(Accuracy) : 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면임. 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”과 “정확도(Accuracy)”는 같은 의미로 쓰임.⁽²⁹⁾

독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway) : 분자 수준의 시작단계를 거쳐 체내 유해반응까지 표적 화학물질 또는 유사한 화학물질 그룹으로부터 일어나는 일련의 현상.⁽²⁾

항산화 반응요소(Antioxidant Response Element, ARE) : 전자친화 반응요소(EpRE, electrophile response element)로도 불리며, 세포보호 및 phase II 유전자의 상류 프로모터 부위에서 발견되는 반응요소. Nrf2에 의하여 활성화 되면 ARE는 이들 유전자의 전사를 유도.

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

EC_{1.5} 값 : 1.5배 루시퍼라아제 활성 유도의 내삽 농도

IC₃₀ : 세포생존율을 30% 감소시키는 농도

IC₅₀ : 세포생존율을 50% 감소시키는 농도

위험성(Hazard) : 물질이 생명체, 생태계 또는 특정 인구집단에 노출될 때, 유해한 영향을 야기할 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적 특성

통합독성평가(IATA, Integrated Approach to Testing and Assessment) : 화학물질 또는 화학물질 그룹의 위험성 확인(잠재력), 위험성 결정(효력) 또는 안전성 평가(잠재력/효력, 노출)를 위하여 사용되는 구조적 접근 방법. 유해성 잠재력 또는 위해성(risk) 또는 심화 추적 필요성에 관한 규제 결정을 위하여 모든 관련 데이터를 전략적으로 통합하고 경중을 가림으로써 최소한의 시험만 수행하도록 함.

I_{max} 값 : 특정 시험물질 농도에서 용매(음성)대조군과 비교하여 증가한 루시퍼라아제 활성 유도의 최대치

Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) : Nrf2 활성을 조절하는 센서 단백질. 활성 유도가 되지 않은 상태에서 Keap1 센서 단백질은 Nrf2 전사인자에 ubiquitin 표지를 매개하고 proteasome에서 단백질해가 되게 함. 저분자 물질이 Keap1의 반응성 시스테인 잔기에 공유결합하면 Nrf2가 Keap1으로부터 분리됨. ⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

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

단일성분물질(Mono-constituent substance) : 정량적인 구성으로 정의되며, 하나의 주요성분이 적어도 80% (w/w) 이상인 물질

다성분물질(Multi-constituent substance) : 두 가지 이상의 주요성분의 양이 $\geq 10\%$ (w/w) 및 $< 80\%$ (w/w)인 물질. 다성분물질은 생산과정의 산물이다. 혼합물과 다성분물질의 차이는 혼합물은 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 섞어서 얻고, 다성분물질은 화학반응의 산물임.

Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) : 항산화 반응요소 경로에 관여하는 전사인자. Nrf2가 ubiquitin 표지가 되지 않으면 세포질에 많아지고, 핵으로 이동하여 많은 세포보호 유전자의 상류 프로모터 부위의 ARE에 결합하면 이들 유전자의 전사가 시작됨.⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

양성대조군(Positive control) : 시험계의 모든 구성요소를 포함하고 양성반응을 유도한다고 알려진 물질로 처리한 군(replicate). 시간에 따른 양성대조군 반응의 변동성을 평가할 수 있다는 확신을 갖기 위하여 양성반응의 범위가 초과해서는 안 됨.

상관성(Relevance) : 시험과 관심 효과의 관련성 및 시험이 특정 목적에 의미 있고 유용한 지에 대한 설명. 상관성은 시험이 얼마나 관심 생물학적 효과를 정확하게 측정하고 예측하는 지 나타내며, 상관성은 시험법의 정확도(일치성)를 내포함.⁽²⁹⁾

신뢰도(Reliability) : 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내, 실험실 간 재현성(reproducibility)과 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가됨⁽²⁹⁾

재현성(Reproducibility) : 동일한 방법으로 동일한 물질을 시험하였을 때 나온 결과의 일치(신뢰도 참조)⁽²⁹⁾

민감도(Sensitivity) : 시험법으로 모든 양성/활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항.⁽²⁹⁾

용매/부형제 대조군 (Solvent/vehicle control) : 용매 등 시험계의 모든 구성요소를 포함하지만 시험물질은 처리하지 않는 군. 동일한 용매에 녹인 시험물질로 처리한 시료의 기본반응을 평가하기 위해 사용.

특이도(Specificity) : 시험법으로 모든 음성/비활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 특이도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항.⁽²⁹⁾

물질(Substance) : 생산과정을 통해 얻어지거나 자연상태로 얻어진 화학원소들(element)과 이들
로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 첨가제와 생산과정
에서 유래하는 불순물을 포함하지만, 해당물질의 안정성이나 조성의 변화에 영향을 주지 않고
분리될 수 있는 용매는 제외함.⁽¹⁾

시험물질(Test chemical) : "시험물질"은 시험할 때 무엇을 사용하였는지 언급할 때 사용됨.

UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템 (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS) : 물리적, 보건적, 환경적 위험성의 수준 및 표준화된 유형에 따른 화학물질(물질 또는 혼합물)의 분류체계로, 픽토그램(pictogram), 신호어, 위험사항, 사전 주의사항, 안전 데이터 시트 등의 소통 방식을 통해 화학물질의 유해 정보를 전달하여, 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하고자 제시된 체계.⁽¹⁾

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

검증된 시험법(Validated test method) : 특정한 목적에 대한 상관성과 신뢰도를 충족시키고 과학적으로 입증된 원리에 근거한 시험법. 절대적으로 완벽하게 검증된 시험법은 없지만 특정한 목적과 관련됨.⁽²⁹⁾

부록 2. 숙련도 물질

(*In vitro* 피부감작성 시험법: ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법)

본 가이드라인에 따른 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 표 1에서 권고하는 10개의 물질에 대하여 KeratinoSens™ 예측을 정확하게 판별하고, 10가지 숙련도 물질 중 적어도 8가지 이상에 대해 각각의 기준 범위에 포함되는 EC_{1.5} 값과 IC₅₀ 값을 얻음으로써 숙련도를 입증하여야 한다. 이 숙련도 물질들은 피부감작 위험성에 대한 반응 범위를 나타내기 위해 선정되었다. 다른 물질 선정 기준으로는 상업적으로 구매 가능하며, 신뢰성 높은 체내 참고 데이터와 KeratinoSens™으로 얻은 체내 데이터가 있어야 한다.

표 1. KeratinoSens™ 시험법 숙련도 확인용 권장물질

숙련도 물질	CASRN	성상	체내 예측력 ⁽¹⁾	KeratinoSens™ 예측력 ⁽²⁾	EC _{1.5} (μM) 참고범위 ⁽³⁾	IC ₅₀ (μM) 참고범위 ⁽³⁾
Isopropanol	67-63-0	액체	비감작성	음성	> 1000	> 1000
Salicylic acid	69-72-7	고체	비감작성	음성	> 1000	> 1000
Lactic acid	50-21-5	액체	비감작성	음성	> 1000	> 1000
Glycerol	56-81-5	액체	비감작성	음성	> 1000	> 1000
Cinnamyl alcohol	104-54-1	고체	감작성 (약함)	양성	25 - 175	> 1000
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	액체	감작성 (약함)	양성	5 - 125	> 500
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	고체	감작성 (보통)	양성	25 - 250	> 500
Methyldibromoglutaronitrile	35691-65-7	고체	감작성 (강함)	양성	< 20	20 - 100
4--Methylaminophenol sulfate	55-55-0	고체	감작성 (강함)	양성	< 12.5	20- 200
2,4-Dinitro-chlorobenzene	97-00-7	고체	감작성 (매우강함)	양성	< 12.5	5 - 20

1. 체내 위험성(과 감작능) 예측은 LLNA 데이터를 기반으로 한다⁽¹⁸⁾. 체내 감작능은 ECETOC가 제안한 기준을 이용해 도출한다⁽²⁴⁾.
2. KeratinoSens™ 예측은 통합독성평가의 체계와 본 시험법 가이드라인의 9항과 11항에 따라 고려되어야 한다.
3. 기준에 관찰된 값 기반⁽¹²⁾.

부록 3. 발광 측정의 정도 관리 (KeratinoSens™ 시험법에서 최적의 발광 측정을 위한 기초 실험)

다음은 발광측정기로 측정할 때 신뢰성 있는 결과를 도출하는데 있어 중요한 세 가지 지표이다.

- 1) 대조군 well에서 안정된 배경발광도를 생성하는 충분한 민감도를 가질 것.
- 2) 플레이트 전체를 오래 측정하는 동안 시간이 지남에 따라 광도 측정 값이 점진적으로 변하지 않을 것.
- 3) 강한 활성을 나타내는 well로부터 인접한 well로 빛의 오염이 없을 것.

시험을 하기 전에 아래 대조군 플레이트의 설정대로 시험하여 발광 측정이 적절하게 이루어지는지 확인할 것을 권장한다(3번 반복측정).

3. 1. 첫 번째 숙련도 실험을 위한 플레이트 설정

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0.98	EGDMA 1.95	EGDMA 3.9	EGDMA 7.8	EGDMA 15.6	EGDMA 31.25	EGDMA 62.5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Blank

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method

INTRODUCTION

1. A skin sensitiser refers to a substance that will lead to an allergic response following skin contact as defined by the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) (1). This Test Guideline (TG) provides an *in vitro* procedure (the ARE-Nrf2 luciferase test method) to be used for supporting the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers in accordance with the UN GHS (1).

2. There is general agreement regarding the key biological events underlying skin sensitisation. The existing knowledge of the chemical and biological mechanisms associated with skin sensitisation has been summarised in the form of an Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), going from the molecular initiating event through the intermediate events up to the adverse health effect, i.e. allergic contact dermatitis in humans or contact hypersensitivity in rodents (2) (3). The molecular initiating 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 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, which is indirectly assessed in the murine Local Lymph Node Assay (4).

3. The assessment of skin sensitisation has typically involved the use of laboratory animals. The classical methods based on guinea-pigs, the Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test (GMPT) and the Buehler Test TG 406 (5), study both the induction and elicitation phases of skin sensitisation. A murine test, the Local Lymph Node Assay (LLNA) (TG 429) (4) and its two non-radioactive modifications, LLNA: DA (TG 442A) (6) and LLNA: BrdU-ELISA (TG 442B) (7), which all assess the induction response exclusively, have also gained acceptance since they provide advantages over the guinea pig tests in terms of both animal welfare and objective measurement of the induction phase of skin sensitisation.

4. More recently, mechanistically-based *in chemico* and *in vitro* test methods have been considered scientifically valid for the evaluation of the skin sensitisation hazard of chemicals. However, combinations of non-animal methods (*in silico*, *in chemico*, *in vitro*) within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) will be needed to be able to fully substitute for the animal tests currently in use given the restricted AOP mechanistic coverage of each of the currently available non-animal test methods (2) (3).

5. The test method described in this Test Guideline (ARE-Nrf2 luciferase test method) is proposed to address the second key event as explained in paragraph 2. Skin sensitisers have been reported to induce genes that are regulated by the antioxidant response element (ARE) (8) (9). Small electrophilic substances
© OECD, (2015)

You are free to use this material for personal, non-commercial purposes without seeking prior consent from the OECD, provided the source is duly mentioned. Any commercial use of this material is subject to written permission from the OECD.

such as skin sensitisers can act on the sensor protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), by e.g. covalent modification of its cysteine residue, resulting in its dissociation from the transcription factor Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). The dissociated Nrf2 can then activate ARE-dependent genes such as those coding for phase II detoxifying enzymes (8) (10) (11).

6. Currently, the only *in vitro* ARE-Nrf2 luciferase test method covered by this Test Guideline is the KeratinoSens™ test method for which validation studies have been completed (9) (12) (13) followed by an independent peer review conducted by the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) (14). The KeratinoSens™ test method was considered scientifically valid to be used as part of an IATA, to support the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers for the purpose of hazard classification and labelling (14). Laboratories willing to implement the test method can obtain the recombinant cell line used in the KeratinoSens™ test method by establishing a licence agreement with the test method developer (15).

7. Definitions are provided in Annex 1.

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

8. Since activation of the Keap1-Nrf2-ARE pathway addresses only the second key event of the skin sensitisation AOP, information from test methods based on the activation of this pathway is unlikely to be sufficient when used on its own to conclude on the skin sensitisation potential of chemicals. Therefore data generated with the present Test Guideline should be considered in the context of integrated approaches, such as IATA, combining them with other 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. Examples on how to use the ARE-Nrf2 luciferase test method in combination with other information are reported in literature (13) (16) (17) (18) (19).

9. The test method described in this Test Guideline can be used to support the discrimination between skin sensitisers (i.e. UN GHS Category 1) and non-sensitisers in the context of IATA. This TG cannot be used on its own, neither to sub-categorise skin sensitisers into subcategories 1A and 1B as defined by the UN GHS (1), for authorities implementing these two optional subcategories, nor to predict potency for safety assessment decisions. However, depending on the regulatory framework, a positive result may be used on its own to classify a chemical into UN GHS category 1.

10. Based on the dataset from the validation study and in-house testing used for the independent peer-review of the test method, the KeratinoSens™ test method proved to be transferable to laboratories experienced in cell culture. The level of reproducibility in predictions that can be expected from the test method is in the order of 85% within and between laboratories (14). The accuracy (77% - 155/201), sensitivity (78% - 71/91) and specificity (76% - 84/110) of the KeratinoSens™ for discriminating skin sensitisers (i.e. UN GHS Cat. 1) from non-sensitisers when compared to LLNA results were calculated by considering all of the data submitted to EURL ECVAM for evaluation and peer-review of the test method (14). These figures are similar to those recently published based on in-house testing of about 145 test substances (77% accuracy, 79% sensitivity, 72% specificity) (13). The KeratinoSens™ is more likely to under predict chemicals showing a low to moderate skin sensitisation potency (i.e. UN GHS subcategory 1B) than chemicals showing a high skin sensitisation potency (i.e. UN GHS subcategory 1A) (13) (14). Taken together, this information indicates the usefulness of the KeratinoSens™ assay to contribute to the identification of skin sensitisation hazard. However, the accuracy values given here for the KeratinoSens™ as a stand-alone test method are only indicative since the test method should be considered in combination with other sources of information in the context of an IATA and in accordance with the provisions of paragraph 9 above. Furthermore when evaluating non-animal methods for skin sensitisation, it should be

kept in mind that the LLNA as well as other animal tests, may not fully reflect the situation in the species of interest i.e. humans.

11. 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 ARE-Nrf2 luciferase test method to the testing of substances and/or mixtures. On the basis of the current data available the KeratinoSensTM test method was shown to be applicable to test chemicals covering a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potency (as determined with *in vivo* studies) and physico-chemical properties (9) (12) (13) (14). Mainly mono-constituent substances were tested, although a limited amount of data also exist on the testing of mixtures (20). The test method is nevertheless technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures. However, before use of this Test Guideline on a mixture for generating data for an intended regulatory purpose, it should be considered whether, and if so why, it may provide adequate results for that purpose. Such considerations are not needed, when there is a regulatory requirement for testing of the mixture. Moreover, when testing multi-constituent substances or mixtures, consideration should be given to possible interference of cytotoxic constituents with the observed responses. The test method is applicable to test chemicals soluble or that form a stable dispersion (i.e. a colloid or suspension in which the test chemical does not settle or separate from the solvent into different phases) either in water or DMSO (including all of the test chemical components in the case of testing a multi-constituent substance or a mixture). Test chemicals that do not fulfil these conditions at the highest final required concentration of 2000 µM (cf. paragraph 22) may still be tested at lower concentrations. In such a case, results fulfilling the criteria for positivity described in paragraph 39 could still be used to support the identification of the test chemical as a skin sensitizer, whereas a negative result obtained with concentrations < 1000 µM should be considered as inconclusive (see prediction model in paragraph 39). In general test substances with a LogP of up to 5 have been successfully tested whereas extremely hydrophobic substances with a LogP above 7 are outside the known applicability of the test method (14). For test substances having a LogP falling between 5 and 7, only limited information is available.

12. Negative results should be interpreted with caution as substances with an exclusive reactivity towards lysine-residues can be detected as negative by the test method. Furthermore, because of the limited metabolic capability of the cell line used (21) and because of the experimental conditions, pro-haptens (i.e. chemicals requiring enzymatic activation for example via P450 enzymes) and pre-haptens (i.e. chemicals activated by auto-oxidation) in particular with a slow oxidation rate may also provide negative results. Test chemicals that do not act as a sensitizer but are nevertheless chemical stressors may lead on the other hand to false positive results (14). Furthermore, highly cytotoxic test chemicals cannot always be reliably assessed. Finally, test chemicals that interfere with the luciferase enzyme can confound the activity of luciferase in cell-based assays causing either apparent inhibition or increased luminescence (22). For example, phytoestrogen concentrations higher than 1 µM were reported to interfere with the luminescence signals in other luciferase-based reporter gene assays due to over-activation of the luciferase reporter gene (23). As a consequence, luciferase expression obtained at high concentrations of phytoestrogens or similar compounds suspected of producing phytoestrogen-like over-activation of the luciferase reporter gene needs to be examined carefully (23). In cases where evidence can be demonstrated on the non-applicability of the Test Guideline to other specific categories of test chemicals, the test method should not be used for those specific categories.

13. In addition to supporting discrimination between skin sensitizers and non-sensitizers, the KeratinoSensTM assay also provides concentration-response information that may potentially contribute to the assessment of sensitizing potency when used in integrated approaches such as IATA (19). However,

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 now be applied in new and updated Test Guidelines.

further work preferably based on reliable human data is required to determine how KeratinoSens™ results can contribute to potency assessment (24) and to sub-categorisation of sensitisers according to UN GHS (1).

PRINCIPLE OF THE TEST

14. The ARE-Nrf2 luciferase test method makes use of an immortalised adherent cell line derived from HaCaT human keratinocytes stably transfected with a selectable plasmid. The cell line contains the luciferase gene under the transcriptional control of a constitutive promoter fused with an ARE element from a gene that is known to be up-regulated by contact sensitisers (25) (26). The luciferase signal reflects the activation by sensitisers of endogenous Nrf2 dependent genes, and the dependence of the luciferase signal in the recombinant cell line on Nrf2 has been demonstrated (27). This allows quantitative measurement (by luminescence detection) of luciferase gene induction, using well established light producing luciferase substrates, as an indicator of the activity of the Nrf2 transcription factor in cells following exposure to electrophilic test substances.

15. Test chemicals are considered positive in the KeratinoSens™ if they induce a statistically significant induction of the luciferase activity above a given threshold (i.e. > 1.5 fold or 50% increase), below a defined concentration which does not significantly affect cell viability (i.e. below 1000 µM and at a concentration at which the cellular viability is above 70% (9) (12)). For this purpose, the maximal fold induction of the luciferase activity over solvent (negative) control (I_{max}) is determined. Furthermore, since cells are exposed to series of concentrations of the test chemicals, the concentration needed for a statistically significant induction of luciferase activity above the threshold (i.e. $EC_{1.5}$ value) should be interpolated from the dose-response curve (see paragraph 32 for calculations). Finally, parallel cytotoxicity measurements should be conducted to assess whether luciferase activity induction levels occur at sub-cytotoxic concentrations.

16. Prior to routine use of the ARE-Nrf2 luciferase test method that adheres to this Test Guideline, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the ten Proficiency Substances listed in Annex 2.

17. Performance standards (PS) (28) are available to facilitate the validation of new or modified *in vitro* ARE-Nrf2 luciferase test methods similar to the KeratinoSens™ and allow for timely amendment of this Test Guideline for their inclusion. Mutual Acceptance of Data (MAD) will only be guaranteed for test methods validated according to the PS, if these test methods have been reviewed and included in this Test Guideline by the OECD.

PROCEDURE

18. Currently, the only test method covered by this Test Guideline is the scientifically valid KeratinoSens™ test method (9) (12) (13) (14). The Standard Operating Procedures (SOP) for the KeratinoSens™ is available and should be employed when implementing and using the test method in the laboratory (15). Laboratories willing to implement the test method can obtain the recombinant cell line used in the KeratinoSens™ test method by establishing a licence agreement with the test method developer. The following paragraphs provide with a description of the main components and procedures of the ARE-Nrf2 luciferase test method.

Preparation of the keratinocyte cultures

19. A transgenic cell line having a stable insertion of the luciferase reporter gene under the control of the ARE-element should be used (e.g. the KeratinoSens™ cell line). Upon receipt, cells are propagated

(e.g. 2 to 4 passages) and stored frozen as a homogeneous stock. Cells from this original stock can be propagated up to a maximum passage number (i.e. 25 in the case of KeratinoSens™) and are employed for routine testing using the appropriate maintenance medium (in the case of KeratinoSens™ this represents DMEM containing serum and Geneticin).

20. For testing, cells should be 80-90% confluent, and care should be taken to ensure that cells are never grown to full confluence. One day prior to testing cells are harvested, and distributed into 96-well plates (10,000 cells/well in the case of KeratinoSens™). Attention should be paid to avoid sedimentation of the cells during seeding to ensure homogeneous cell number distribution across wells. If this is not the case, this step may give rise to high well-to-well variability. For each repetition, three replicates are used for the luciferase activity measurements, and one parallel replicate used for the cell viability assay.

Preparation of the test chemical and control substances

21. The test chemical and control substances are prepared on the day of testing. For the KeratinoSens™ test method, test chemical are dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to the final desired concentration (e.g. 200 mM). The DMSO solutions can be considered self-sterilising, so that no sterile filtration is needed. Test chemical not soluble in DMSO is dissolved in sterile water or culture medium, and the solutions sterilised by e.g. filtration. For a test chemical which has no defined molecular weight (MW), a stock solution is prepared to a default concentration (40 mg/mL or 4% (w/v)) in the KeratinoSens™ assay. In case solvents other than DMSO, water or the culture medium are used, sufficient scientific rationale should be provided.

22. Based on the stock DMSO solutions of the test chemical, serial dilutions are made using DMSO to obtain 12 master concentrations of the chemical to be tested (from 0.098 to 200 mM in the KeratinoSens™ test method). For a test chemical not soluble in DMSO, the dilutions to obtain the master concentrations are made using sterile water or sterile culture medium. Independent of the solvent used, the master concentrations, are then further diluted 25 fold into culture medium containing serum, and finally used for treatment with a further 4 fold dilution factor so that the final concentrations of the tested chemical range from 0.98 to 2000 µM in the KeratinoSens™ test method. Alternative concentrations may be used upon justification (e.g. in case of cytotoxicity or poor solubility).

23. The negative (solvent) control used in the KeratinoSens™ test method is DMSO (CAS No. 67-68-5, ≥ 99% purity), for which six wells per plate are prepared. It undergoes the same dilution as described for the master concentrations in paragraph 22, so that the final negative (solvent) control concentration is 1%, known not to affect cell viability and corresponding to the same concentration of DMSO found in the tested chemical and in the positive control. For a test chemical not soluble in DMSO, for which the dilutions were made in water, the DMSO level in all wells of the final test solution must be adjusted to 1% as for the other test chemicals and control substances.

24. The positive control used in the case of KeratinoSens™ is cinnamic aldehyde (CAS No. 14371-10-9, ≥ 98% purity), for which a series of 5 master concentrations ranging from 0.4 to 6.4 mM are prepared in DMSO (from a 6.4 mM stock solution) and diluted as described for the master concentrations in paragraph 22, so that the final concentration of the positive control range from 4 to 64 µM. Other suitable positive controls, preferentially providing EC₁₅ values in the mid-range, may be used if historical data are available to derive comparable run acceptance criteria.

Application of the test chemical and control substances

25. For each test chemical and positive control substance, one experiment is needed to derive a prediction (positive or negative), consisting of at least two independent repetitions containing each three

replicates (i.e. n=6). In case of discordant results between the two independent repetitions, a third repetition containing three replicates should be performed (i.e. n=9). Each independent repetition is performed on a different day with fresh stock solution of test chemicals and independently harvested cells. Cells may come from the same passage however.

26. After seeding as described in paragraph 20, cells are grown for 24 hours in the 96-wells microtiter plates. The medium is then removed and replaced with fresh culture medium (150 µl culture medium containing serum but without Geneticin in the case of KeratinoSens™) to which 50 µl of the 25 fold diluted test chemical and control substances are added. At least one well per plate should be left empty (no cells and no treatment) to assess background values.

27. The treated plates are then incubated for about 48 hours at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ in the presence of 5% CO₂ in the KeratinoSens™ test method. Care should be taken to avoid evaporation of volatile test chemicals and cross-contamination between wells by test chemicals by e.g. covering the plates with a foil prior to the incubation with the test chemicals.

Luciferase activity measurements

28. Three factors are critical to ensure appropriate luminescence readings:

- the choice of a sensitive luminometer,
- the use of a plate format with sufficient height to avoid light-cross-contamination; and
- the use of a luciferase substrate with sufficient light output to ensure sufficient sensitivity and low variability.

Prior to testing, a control experiment setup as described in Annex 3 should be carried out to ensure that these three points are met.

29. After the 48 hour exposure time with the test chemical and control substances in the KeratinoSens™ test method, cells are washed with a phosphate buffered saline, and the relevant lysis buffer for luminescence readings added to each well for 20 min at room temperature.

30. Plates with the cell lysate are then placed in the luminometer for reading which in the KeratinoSens™ test method is programmed to: (i) add the luciferase substrate to each well (i.e. 50 µl), (ii) wait for 1 second, and (iii) integrate the luciferase activity for 2 seconds. In case alternative settings are used, e.g. depending on the model of luminometer used, these should be justified. Furthermore, a glow substrate may also be used provided that the quality control experiment of Annex 3 is successfully fulfilled.”

Cytotoxicity Assessment

31. For the KeratinoSens™ cell viability assay, medium is replaced after the 48 hour exposure time with fresh medium containing MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1) and cells incubated for 4 hours at 37°C in the presence of 5% CO₂. The MTT medium is then removed and cells are lysed (e.g. by adding 10% SDS solution to each well) overnight. After shaking, the absorption is measured at i.e. 600 nm with a photometer.

DATA AND REPORTING

Data evaluation

32. The following parameters are calculated in the KeratinoSens™ test method:

- - the maximal average fold induction of luciferase activity ($I_{\max}$) value observed at any concentration of the tested chemical and positive control;
- - the $EC_{1.5}$ value representing the concentration for which induction of luciferase activity is above the 1.5 fold threshold (i.e. 50% enhanced luciferase activity) was obtained; and
- - the IC_{50} and IC_{30} concentration values for 50% and 30% reduction of cellular viability.

Fold luciferase activity induction is calculated by Equation 1, and the overall maximal fold induction ($I_{\max}$) is calculated as the average of the individual repetitions.

$$\text{Equation 1: } \text{Fold induction} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

where

L_{sample} is the luminescence reading in the test chemical well

L_{blank} is the luminescence reading in the blank well containing no cells and no treatment

L_{solvent} is the average luminescence reading in the wells containing cells and solvent (negative) control

$EC_{1.5}$ is calculated by linear interpolation according to Equation 2, and the overall $EC_{1.5}$ is calculated as the geometric mean of the individual repetitions.

$$\text{Equation 2: } EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1.5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

where

C_a is the lowest concentration in μM with > 1.5 fold induction

C_b is the highest concentration in μM with < 1.5 fold induction

I_a is the fold induction measured at the lowest concentration with > 1.5 fold induction (mean of three replicate wells)

I_b is the fold induction at the highest concentration with < 1.5 fold induction (mean of three replicate wells)

Viability is calculated by Equation 3:

$$\text{Equation 3: } \text{Viability} = \frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}})}{(V_{\text{solvent}} - V_{\text{blank}})} \times 100$$

where

V_{sample} is the MTT-absorbance reading in the test chemical well

V_{blank} is the MTT-absorbance reading in the blank well containing no cells and no treatment

V_{solvent} is the average MTT-absorbance reading in the wells containing cells and solvent (negative) control

IC_{50} and IC_{30} are calculated by linear interpolation according to Equation 4, and the overall IC_{50} and IC_{30} are calculated as the geometric mean of the individual repetitions.

$$\text{Equation 4: } IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100-x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

where

- X is the % reduction at the concentration to be calculated (50 and 30 for IC₅₀ and IC₃₀)
 C_a is the lowest concentration in µM with > x% reduction in viability
 C_b is the highest concentration in µM with < x% reduction in viability
 V_a is the % viability at the lowest concentration with > x% reduction in viability
 V_b is the % viability at the highest concentration with < x% reduction in viability

For each concentration showing > 1.5 fold luciferase activity induction, statistical significance is calculated (e.g. by a two-tailed Student's t-test), comparing the luminescence values for the three replicate samples with the luminescence values in the solvent (negative) control wells to determine whether the luciferase activity induction is statistically significant ($p < 0.05$). The lowest concentration with > 1.5 fold luciferase activity induction is the value determining the EC_{1.5} value. It is checked in each case whether this value is below the IC₃₀ value, indicating that there is less than 30% reduction in cellular viability at the EC_{1.5} determining concentration.

33. It is recommended that data are visually checked with the help of graphs. If no clear dose-response curve is observed, or if the dose-response curve obtained is biphasic (i.e. crossing the threshold of 1.5 twice), the experiment should be repeated to verify whether this is specific to the test chemical or due to an experimental artefact. In case the biphasic response is reproducible in an independent experiment, the lower EC_{1.5} value (the concentration when the threshold of 1.5 is crossed the first time) should be reported.

34. In the rare cases where a statistically non-significant induction above 1.5 fold is observed followed by a higher concentration with a statistically significant induction, results from this repetition are only considered as valid and positive if the statistically significant induction above the threshold of 1.5 was obtained for a non-cytotoxic concentration.

35. Finally, for test chemicals generating a 1.5 fold or higher induction already at the lowest test concentration of 0.98 µM, the EC_{1.5} value of <0.98 is set based on visual inspection of the dose-response curve.

Acceptance criteria

36. The following acceptance criteria should be met when using the KeratinoSensTM test method. First, the luciferase activity induction obtained with the positive control, cinnamic aldehyde, should be statistically significant above the threshold of 1.5 (e.g. using a t-test) in at least one of the tested concentrations (from 4 to 64 µM).

37. Second, the EC_{1.5} value should be within two standard deviations of the historical mean of the testing facility (e.g. between 7 µM and 30 µM based on the validation dataset) which should be regularly updated. In addition, the average induction in the three replicates for cinnamic aldehyde at 64 µM should be between 2 and 8. If the latter criterion is not fulfilled, the dose-response of cinnamic aldehyde should be carefully checked, and tests may be accepted only if there is a clear dose-response with increasing luciferase activity induction at increasing concentrations for the positive control.

38. Finally, the average coefficient of variation of the luminescence reading for the negative (solvent) control DMSO should be below 20% in each repetition which consists of 6 wells tested in triplicate. If the variability is higher, results should be discarded.

Interpretation of results and prediction model

39. A KeratinoSens™ prediction is considered positive if the following 4 conditions are all met in 2 of 2 or in the same 2 of 3 repetitions, otherwise the KeratinoSens™ prediction is considered negative (Figure 1):

1. the $I_{\max}$ is higher than (>) 1.5 fold and statistically significantly different as compared to the solvent (negative) control (as determined by a two-tailed, unpaired Student's T-test);
2. the cellular viability is higher than (>) 70% at the lowest concentration with induction of luciferase activity above 1.5 fold (i.e. at the $EC_{1.5}$ determining concentration);
3. the $EC_{1.5}$ value is less than (<) 1000 μM (or < 200 $\mu\text{g/mL}$ for test chemicals with no defined MW);
4. there is an apparent overall dose-response for luciferase induction (or a biphasic response as mentioned under paragraph 33).

If in a given repetition, all of the three first conditions are met but a clear dose-response for the luciferase induction cannot be observed, then the result of that repetition should be considered inconclusive and further testing may be required (Figure 1). In addition, a negative result obtained with concentrations < 1000 μM (or < 200 $\mu\text{g/mL}$ for test chemicals with no defined MW) should also be considered as inconclusive (see paragraph 11).

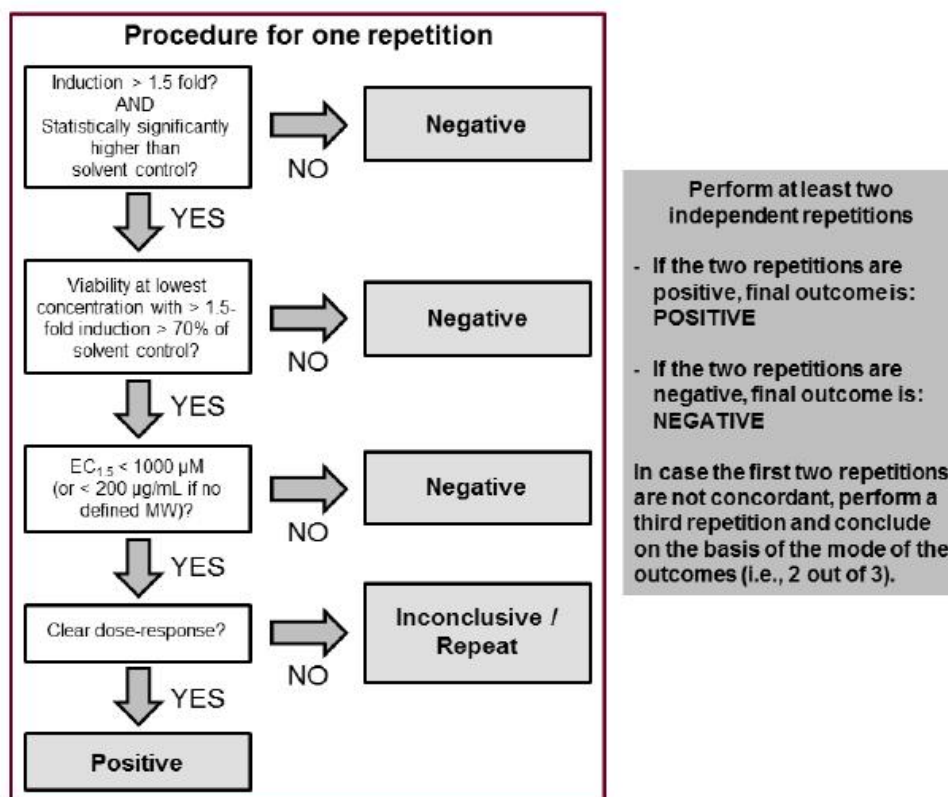


Figure 1: Prediction model used in the KeratinoSens™ test method. A KeratinoSens™ prediction should be considered in the framework of an IATA and in accordance with the provision of paragraphs 9 and 11.

40. In rare cases, test chemicals which induce the luciferase activity very close to the cytotoxic levels can be positive in some repetitions at non-cytotoxic levels (i.e. EC_{1.5} determining concentration below (<) the IC₃₀), and in other repetitions only at cytotoxic levels (i.e. EC_{1.5} determining concentration above (>) the IC₃₀). Such test chemicals shall be retested with more narrow dose-response analysis using a lower dilution factor (e.g. 1.33 or $\sqrt{2}$ (=1.41) fold dilution between wells), to determine if induction has occurred at cytotoxic levels or not (9).

Test report

41. 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;
 - Physical appearance, water solubility, DMSO solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available.
- Multi-constituent substance, UVCB and mixture:
 - Characterisation as far as possible by e.g. chemical identity (see above), purity, quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available;
 - Physical appearance, water solubility, DMSO solubility and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Molecular weight or apparent molecular weight in case of mixtures/polymers of known compositions 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.

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, DMSO solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available and where applicable;
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
 - 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.
- Negative (vehicle) control
- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), and/or other identifiers;
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
 - Physical appearance, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties in the case other negative controls / vehicles than those mentioned in the Test Guideline are used and to the extent available;
 - Storage conditions and stability to the extent available;
 - Justification for choice of solvent for each test chemical.

Test method conditions

- Name and address of the sponsor, test facility and study director;
- Description of test method used;
- Cell line used, its storage conditions and source (e.g. the facility from which they were obtained);
- Passage number and level of confluence of cells used for testing;
- Cell counting method used for seeding prior to testing and measures taken to ensure homogeneous cell number distribution (cf. paragraph 20);
- Luminometer used (e.g. model), including instrument settings, luciferase substrate used, and demonstration of appropriate luminescence measurements based on the control test described in Annex 3;
- The procedure used to demonstrate proficiency of the laboratory in performing the test method (e.g. by testing of proficiency substances) or to demonstrate reproducible performance of the test method over time.

Test procedure

- Number of repetitions and replicates used;
- Test chemical concentrations, application procedure and exposure time used (if different than the one recommended)

TG 442D

OECD/OCDE

- Description of evaluation and decision criteria used;
- Description of study acceptance criteria used;
- Description of any modifications of the test procedure.

Results

- Tabulation of $I_{\max}$, $EC_{1.5}$ and viability values (i.e. IC_{50} , IC_{30}) obtained for the test chemical and for the positive control for each repetition as well as the mean values ($I_{\max}$: average; $EC_{1.5}$ and viability values: geometric mean) and SD calculated using data from all individual repetitions and an indication of the rating of the test chemical according to the prediction model;
- Coefficient of variation obtained with the luminescence readings for the negative control for each experiment;
- A graph depicting dose-response curves for induction of luciferase activity and viability;
- Description of any other relevant observations, if applicable.

Discussion of the results

- Discussion of the results obtained with the KeratinoSensTM test method;
- Consideration of the test method results within the context of an IATA, if other relevant information is available.

Conclusion

LITERATURE

1. United nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.]
2. OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.
3. Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleijnans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.
4. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
5. OECD (1992). Skin Sensitisation. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
6. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
7. OECD (2010). Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 18,1, 45-49.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSensTM, 17pp. Available: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
16. Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol Sci.* 107, 106-121.
17. Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul Toxicol Pharmacol.* 60, 389-400.
18. Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
19. Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A., 2013. Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J Appl Toxicol.* 33, 1353-1364.
20. 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.
21. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87, 1683-1699.
22. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
23. OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
24. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
25. Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J Invest Dermatol*, 126, 1813-1822.

26. Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I. And Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
27. Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol In Vitro* 27, 2225-2232.
28. OECD (2014, in preparation). Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods in TG xxx. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N.XXX, OECD, Paris.
29. 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. OECD, Paris, France.
30. NAFTA (North American Free Trade Agreement) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. Disponible à l'adresse suivante :
<http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf>

ANNEX 1

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 (29).

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.

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.

EC_{1.5}: Interpolated concentration for a 1.5 fold luciferase induction.

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 weights all relevant data to inform regulatory decision regarding potential hazard and/or risk and/or the need for further targeted and therefore minimal testing.

I_{max}: 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 (8) (10) (11).

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.

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 (8) (10) (11).

Positive control: A replicate 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.

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 (29).

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 (29).

Reproducibility: The agreement among results obtained from testing the same substance using the same test protocol (see reliability) (29).

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 (29).

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 (29).

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.

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.

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 (29).

ANNEX 2

PROFICIENCY SUBSTANCES

In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method

Prior to routine use of a test method that adheres to this Test Guideline, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly obtaining the expected KeratinoSens™ prediction for the 10 Proficiency Substances recommended in Table 1 and by obtaining the EC_{1.5} and IC₅₀ values that fall within the respective reference range for at least 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 commercial availability, availability of high quality *in vivo* reference, and availability of high quality *in vitro* data from the KeratinoSens™ test method.

Table 1: Recommended substances for demonstrating technical proficiency with the KeratinoSens™ test method

Proficiency Substances	CASRN	Physical Form	<i>In Vivo</i> Prediction (1)	KeratinoSens™ Prediction (2)	EC _{1.5} (µM) Reference Range (3)	IC ₅₀ (µM) Reference Range (3)
Isopropanol	67-63-0	Liquid	Non-sensitiser	Negative	> 1000	> 1000
Salicylic acid	69-72-7	Solid	Non-sensitiser	Negative	> 1000	> 1000
Lactic acid	50-21-5	Liquid	Non-sensitiser	Negative	> 1000	> 1000
Glycerol	56-81-5	Liquid	Non-sensitiser	Negative	> 1000	> 1000
Cinnamyl alcohol	104-54-1	Solid	Sensitiser (weak)	Positive	25 - 175	> 1000
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	Liquid	Sensitiser (weak)	Positive	5 - 125	> 500
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Solid	Sensitiser (moderate)	Positive	25 - 250	> 500
Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7	Solid	Sensitiser (strong)	Positive	< 20	20 - 100
4-Methylaminophenol sulfate	55-55-0	Solid	Sensitiser (strong)	Positive	< 12.5	20 - 200
2,4-Dinitro-chlorobenzene	97-00-7	Solid	Sensitiser (extreme)	Positive	< 12.5	5 - 20

(1) The *in vivo* hazard (and potency) predictions are based on LLNA data (13). The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (24).

(2) A KeratinoSens™ prediction should be considered in the framework of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 9 and 11 of the Test Guideline.

(3) Based on the historical observed values (12).

QUALITY CONTROL OF LUMINESCENCE MEASUREMENTS

Basic experiment for ensuring optimal luminescence measurements in the KeratinoSens™ assay

The following three parameters are critical to ensure obtaining reliable results with the luminometer:

- having a sufficient sensitivity giving a stable background in control wells;
- having no gradient over the plate due to long reading times; and
- having no light contamination in adjacent wells from strongly active wells.

Prior to testing it is recommended to ensure having appropriate luminescence measurements, by testing a control plate set-up as described below (triplicate analysis).

Plate setup of first training experiment

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA	EGDMA
	0.98	1.95	3.9	7.8	15.6	31.25	62.5	125	250	500	1000	2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Blank

EGDMA = Ethylene glycol dimethacrylate (CAS No.: 97-90-5) a strongly inducing compound

CA = Cinnamic aldehyde, positive reference (CAS No.: 104-55-2)

The quality control analysis should demonstrate:

- a clear dose-response in row D, with the $I_{\max} > 20$ fold above background (in most cases $I_{\max}$ values between 100 and 300 are reached);
- no dose-response in row C and E (no induction value above 1.5 (ideally not above 1.3) due to possible light contamination especially next to strongly active wells in the EGDMA row;
- no statistically significant difference between the rows A, B, C, E, F and G. (i.e. no gradient over plate); and
- variability in any of the rows A, B, C, E, F and G and in the DMSO wells in row H should be below 20% (i.e. stable background).

“화장품 피부감작성 동물대체시험법(ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법)
가이드라인 (민원인 안내서)”

발 행 일 2017 년 9 월

발 행 인 식품의약품안전평가원장 이선희

편집위원장 독성평가연구부장 박혜경

편 집 위 원 이종권, 김태성, 김주환, 이정선, 고경육, 안일영, 김지영
최보경, 이정표

도움주신분 김배환, 김주현, 박창언, 안수선, 임경민, 전태원, 허용

문 의 처 식품의약품안전평가원, 특수독성과

Tel : 043-719-5152, 5154 Fax : 043-719-5150

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