

화장품 피부감작성 동물대체시험법
[인체 세포주 활성화 방법, h-CLAT] 가이드라인
(민원인 안내서)

2017. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 피부감작성 동물대체시험법(인체 세포주 활성화 방법, h-CLAT)
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)		안 일 영 이 종 권

이 안내서는 화장품 피부감작성 동물대체시험법(인체 세포주 활성화 방법, h-CLAT) 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, 5162

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-0788-01	2017. 9. 7.	화 장 품 피 부 감 작 성 동 물 대 체 시 험 법(인 체 세 포 주 활 성 화 방 법, h-CLAT) 가 이 드 라 인 제 정

목 차

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

화장품 피부감작성 동물대체시험법 (인체 세포주 활성화 방법, h-CLAT) 가이드라인

I. 개요

본 시험법은 UN GHS 기준에 따른 피부감작물질과 비감작물질을 구별하는데 사용되는 체외 피부감작성 평가 시험법(인체 세포주 활성화를 이용한 피부감작성 시험법)[영문명 : human Cell Line Activation Test(h-CLAT)]으로 피부감작성 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 세 번째 단계인 수지상세포의 활성화를 특정 세포 표면 표지자(Cell surface marker)의 발현으로 평가하는 방법이다.

인체 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1에 시험물질을 노출시킨 후 단핵구와 수지상세포의 활성화와 관련된 세포 표면 표지자인 CD86과 CD54의 발현을 정량화하여 피부감작물질과 비감작물질을 구별할 수 있다. 본 시험법은 다양한 유기 작용기, 반응기전, 피부감작성(체내 시험결과), 물리화학적 성질을 가지는 시험물질에 적용할 수 있다. 그러나 본 시험법 결과는 안전성 평가를 위한 독립실험으로 사용하기보다 독성발현경로의 다른 핵심 단계(Key Event)를 다루는 다른 시험법 결과와 조합하여 IATA(Integrated Approach to Testing and Assessment)와 같은 통합적 접근법의 일부로 사용되어야 한다. UN GHS에 따른 화학물질의 위험성 분류와 표시의 목적으로 피부감작성(Category 1)과 비감작성 구분에 사용되지만 본 시험법만으로는 Category 1A, 1B의 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.

시험 방법은 크게 두 단계로 나뉜다. 첫 번째는 최고 농도를 설정하기 위해 PI 염색을 통한 THP-1 세포의 세포 생존율(CV75값)을 구하기 위한 단계이며, 그 이후는 세포 표면 표지자를 형광색소 항체로 염색하고 유세포 분석을 통해 발현 정도를 측정하여 피부감작물질과 비감작물질을 구별하는 단계이다. 시험결과 평가는 세포 표면 표지자인 CD86 및 CD54의 상대적 형광 강도(Relative fluorescence intensity, RFI)를 통해 계산한다. 결과 판정은 하나 이상의 농도에서 CD86의 RFI는 150%, CD54의 RFI는 200% 이상인 경우를 기준으로 최소한 두 번의 독립적인 반복실험에서 두 번 이상이 양성인 경우 양성이며, 그렇지 않으면 음성으로 판정한다.

II. 시험원리

인체 세포주 활성화를 이용한 피부감작성 시험법은 시험물질에 24시간 동안 노출된 인체 단핵구 백혈병 세포주(THP-1 세포)의 세포 표면 표지자(CD86과 CD54) 발현 수준을 정량화하는 체외 분석법이다. 세포 표면 표지자의 발현 정도는 형광색소 항체를 세포에 염색한 후 유세포 분석을 통해 측정한다. 결과 평가는 감작물질과 비감작물질을 구별하기 위해 용매/부형제 대조군과 비교한 시험물질의 표면 표지자의 상대적인 형광강도를 이용한다.

III. 제한점 및 고려사항

피부감작성은 수지상세포 활성화와 관련된 세포막 표지자의 발현과 생물학적 상관성이 있다고 알려져 있다. 단, 수지상세포 활성화가 피부감작성 독성발현 기전 중 하나의 단계에 불과하여, 본 시험법의 정보만으로 화학물질이 피부감작성이 있다는 결론을 내기 어렵기 때문에 통합적인 접근법을 사용하여야 한다. 본 시험법으로 UN GHS에 따른 피부감작성(Category1)과 비감작성 구별이 가능하지만 Category 1A, 1B 하위 분류기준으로는 구분할 수 없다.

본 시험법의 실험실 내 및 실험실 간 재현성은 대략 80% 수준이다. 또한 본 시험법은 국소림프절시험(LLNA) 결과와 비교하였을 때 피부감작성과 비감작성을 구분하는 정확도 85%(N=142), 민감도 93%(94/101), 특이도 66%(27/41)를 나타낸다. 그리고 본 시험법에서는 Category 1A(강감작성)의 피부감작성보다 Category 1B(약중감작성)의 피부감작성의 화학물질인 경우 위음성 예측이 나오기 쉽다. 결론적으로 본 시험법은 피부감작 위험성 여부를 식별하는데 유용하며, 독립적 시험법보다 통합독성평가(IATA)의 맥락에서 다른 정보와의 조합을 고려해야 한다.

본 시험법에서 낮은 용해도를 갖는 시험물질은 위음성 결과가 도출되는 경향이 있으므로 낮은 용해도(Log Kow>3.5)를 갖는 시험물질의 음성 결과는 신뢰하지 않는다. 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, 산화에 의해 활성화되는 물질) 물질에서 음성결과가 도출될 수 있다. 형광 시험물질인 경우 본 시험법으로 평가할 수 있지만 형광색소 항체(FITC) 또는 세포사멸 표지자(PI)와 유사한 파장을 방출하는 강한 형광 시험물질의 경우는 파장의 감지를 방해하므로 유세포 분석으로 정확한 평가가 어렵다. 그러한 경우 다른 형광색소 항체 또는 세포독성 표지자를 숙련도 물질(Proficiency substances)을 이용하여 유사한 결과를 보이는지 확인한 후 사용할 수 있다.

IV. 시험방법

4.1. 세포배양

THP-1 세포는 10% 우태아 혈청(FBS), 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 100 units/mL 페니실린, 100 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI-1640 세포배양배지에서 37°C, 5% CO₂를 함유하는 가습조건에서 배양된다. 세포는 해동 후 최대 2개월까지 계대배양이 가능하며, 계대 수(passage number)는 30을 초과할 수 없다. THP-1 세포는 일상적으로 $0.1\sim0.2\times10^6$ cells/mL의 밀도로 2-3일마다 계대하며, $0.1\sim1.0\times10^6$ cells/mL 밀도를 유지한다. 시험 전에 THP-1세포는 0.1×10^6 cells/mL 또는 0.2×10^6 cells/mL의 밀도로 각각 72시간 또는 48시간 동안 배양 플라스크에서 전배양 한다. 시험 당일은 배양 플라스크에서 수확한 세포는 2×10^6 cells/mL의 농도로 새로운 세포배양배지에 재현탁하여 24 well 평판 바닥 플레이트¹⁾에 500 μL (1×10^6 cells/well)의 세포 용액을 분주하거나 96 well 플레이트에 80 μL (1.6×10^5 cells/well)의 세포 용액을 분주한다.

4.2. 세포반응성시험

시험 전에, THP-1 세포에 대한 반응성 확인은 세포를 녹인 후 2주간 양성대조군, 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB) 및 황산니켈(NiSO₄)과 음성대조군, 젖산(Lactic acid)을 이용하여 수행한다. 반응성 확인을 통과한 세포만 시험에 이용될 수 있다.

4.3. 시험물질 및 대조물질 조제

시험물질은 첫 번째 용매/부형제로 생리식염수나 세포배양배지를 선택하거나, 만약 시험물질이 이 두 용매/부형제에 녹지 않거나 안정적으로 분산되지 않을 경우 두 번째 용매/부형제로 dimethylsulfoxide(DMSO)를 선택한다. 표준원액(stock solution)은 생리식염수 또는 세포배양배지의 경우는 100 mg/mL, DMSO의 경우는 500 mg/mL로 준비한다. 시험물질은 해당 용매/부형제를 이용하여 2배 연속 희석하여 8개의 표준원액(8가지 농도)을 조제하고, 이를 세포배양배지에 희석한다(생리식염수 또는 세포배양배지 : 50 배, DMSO : 250배). 생리식염수나 세포배양배지의 경우, 플레이트의 최고 최종농도인 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 무독성일 경우, 세포독성시험을 실시하여 최대농도를 재결정해야 하며, 최종적으로 5000 $\mu\text{g/mL}$ 을 초과해서는 안 된다. DMSO의 경우, 무독성이어도 플레이트에서의 최종농도는 1000 $\mu\text{g/mL}$ 를 초과해서는 안 된다.

4.4. 시험물질 및 대조물질 적용

세포배양배지 또는 희석된 시험용액(working solution)은 24 well 또는 96 well 플레이트에 준비된 세포 현탁액과 1:1(v/v)로 혼합한다. 처리된 플레이트는 37°C, 5% CO₂환경에서 24 $\pm$ 0.5시간 동안 배양한다. 24 $\pm$ 0.5시간 동안 노출한 후, 세포는 샘플 튜브로 옮겨

1) 플레이트로 표기된 경우 평판 바닥 플레이트를 의미하며 그 외에는 둥근 바닥 플레이트 표기

저 원심분리로 수집된 후 염색 완충액으로 두 번 세척한다(필요 시 세척과정이 추가될 수 있다).

4.5. 용량설정시험(PI 염색, 세포생존율 측정)

시험물질을 8 농도로 24 ± 0.5 시간 처리한 세포를 PI 용액으로 염색하여 세포 생존율을 계산한다. 염색방법은 세포를 세척 후 염색 완충액($400 \mu\text{L}$)으로 재현탁하고, PI 용액($20 \mu\text{L}$)을 첨가한다(예, 최종 PI 농도는 $0.625 \mu\text{g/mL}$ 이다). PI 염색은 유세포분석기의 획득 채널(acquisition channel) FL-3을 활용하여 분석된다. 75%의 THP-1 세포 생존율을 나타내는 농도인 CV75 값(25%의 세포독성)을 측정하여, 본시험 최고 농도를 설정한다(그림 1 참고).

4.6. 본시험(CD86/CD54 발현 측정)

시험물질은 먼저 용량설정시험에서 확인한 $1.2 \times \text{CV75}$ 의 100배(식염수나 세포배양배지의 경우) 또는 500배(DMSO의 경우)에 상응하는 농도로 희석한다. CV75를 결정할 수 없는 경우(독성이 관찰되지 않을 경우), 식염수나 세포배양배지의 경우는 $5000 \mu\text{g/mL}$, DMSO의 경우는 $1000 \mu\text{g/mL}$ 를 초과해서는 안 된다. 그 다음, 해당 용매/부형제로 1.2 배 연속 희석을 하여 표준원액[$100 \times 1.2 \times \text{CV75} \sim 100 \times 0.335 \times \text{CV75}$ (생리식염수나 세포배양배지의 경우) 또는 $500 \times 1.2 \times \text{CV75} \sim 500 \times 0.335 \times \text{CV75}$ (DMSO의 경우)]의 8농도를 확보한다. CD86/CD54 발현을 측정하기 위해서는 24 well 플레이트만 이용해야 한다. 각 실험은 최소한 두 번의 독립적인 반복실험을 수행해야 한다. 양성대조군은 DNCB(일반적으로 최종농도 $4.0 \mu\text{g/mL}$)를 사용한다.

시험물질을 8 농도로 24 ± 0.5 시간 처리한 세포를 CD86/CD54의 세포 표면 표지자로 염색한다. 염색방법은 세포를 세척 후 비특이적 항체결합 차단용액으로 처리하고 4°C 에서 15분 동안 배양한다. 이 후, 세포는 $180 \mu\text{L}$ 의 3개의 시료 분취액으로 나누어 96 well 둥근 바닥 플레이트나 마이크로 튜브로 분주한다. 원심분리 후 세포는 $50 \mu\text{L}$ 의 FITC-labelled anti-CD86, anti-CD54 또는 마우스 IgG1 (isotype) 항체로 4°C 에서 30분 동안 염색한다. 염색 완충액으로 세척한 후 세포를 염색 완충액($400 \mu\text{L}$)에 다시 부유시키고, PI용액 또는 다른 세포독성 표지자의 용액을 첨가한다. CD86/CD54의 발현을 유세포 분석기로 측정한다(그림 1 참고).

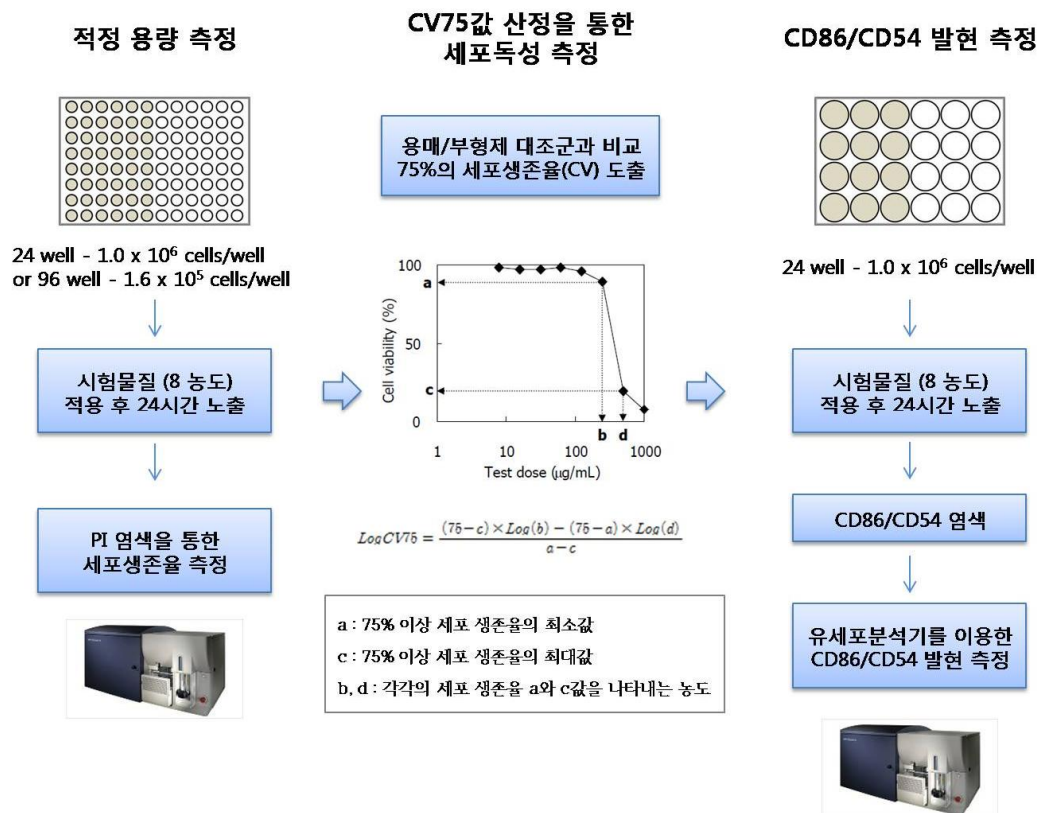


그림 1. h-CLAT 시험방법

V. 인정요건

배지 및 용매/부형제 대조군의 세포생존율이 90% 이상이어야 하고 용매/부형제 대조군에서 CD86 및 CD54의 상대적 형광 강도(RFI) 값은 양성기준(CD86 RFI $\geq 150\%$ 및 CD54 RFI $\geq 200\%$)을 초과하지 않아야 한다. 반면 배지 및 용매/부형제 대조군 모두 동형(isotype) 대조군에 대한 CD86 및 CD54의 각 기하평균 형광 강도(mean fluorescence intensity, MFI) 비율은 105%를 초과해야 한다. 양성대조군인 DNCB에서는 CD86 및 CD54의 RFI 값이 양성기준(CD86 RFI $\geq 150\%$ 및 CD54 RFI $\geq 200\%$)을 충족하고 세포생존율이 50% 이상이어야 한다.

VI. 시험결과 및 보고

MFI를 기반으로 양성대조군과 시험물질 처리 세포에 대한 CD86과 CD54의 RFI는 다음 등식에 따라 계산할 수 있다.

$$RFI = \frac{\text{시험물질 처리 세포 } MFI - \text{시험물질 처리 동형 대조군 세포 } MFI}{\text{용매/부형제 처리 대조군 세포 } MFI - \text{용매/부형제 처리 동형 대조군 세포 } MFI} \times 100$$

CD86/CD54 발현 측정을 위해 각 시험물질은 최소한 두 번의 반복실험을 통해 단일 예측(양성 또는 음성)을 도출한다. 2번 또는 3번의 반복실험 중 최소한 2번의 경우에서 다음 조건 중 최소 하나가 충족되면 결과는 양성으로 판정하고 그렇지 않으면 음성으로 판정한다.

하나 이상의 농도에서 CD86의 RFI는 150% 이상(세포생존율 $\geq$ 50%)
하나 이상의 농도에서 CD54의 RFI는 200% 이상(세포생존율 $\geq$ 50%)

처음 두 번의 반복실험에서 CD86 또는 CD54에서 모두 양성(또는 음성)인 경우 양성(또는 음성)으로 간주하고 세 번째 실험은 수행할 필요가 없다. 그러나 처음 두 번의 반복실험에서 두 표지자 모두 결과가 일치하지 않으면 세 번째 실험이 필요하며 최종 결과 예측은 세 번의 반복실험 중 다수결과를 기반으로 한다. 이와 관련하여, 초기 두 번의 반복실험에서 한 실험에서는 CD86에만 양성이고 다른 실험에서는 CD54에서만 양성인 경우도 세 번째 실험이 필요하다는 점에 유의해야 한다. 만약 세 번째 실험에서 두 표지자에 대해 음성이면 결과 판정은 음성으로 간주한다. 반면 세 번째 실험에서 두 표지자 중 하나 또는 두 표지자 모두에 대해 양성이면 양성으로 간주한다(그림 2 참고).

※ 참고문헌

DB-ALM protocol No. 158에 제시된 엑셀 템플릿을 사용하여 결과계산이 가능하다.
[DB-ALM(INVITTOX) (2014), Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. 웹주소 <http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/>]

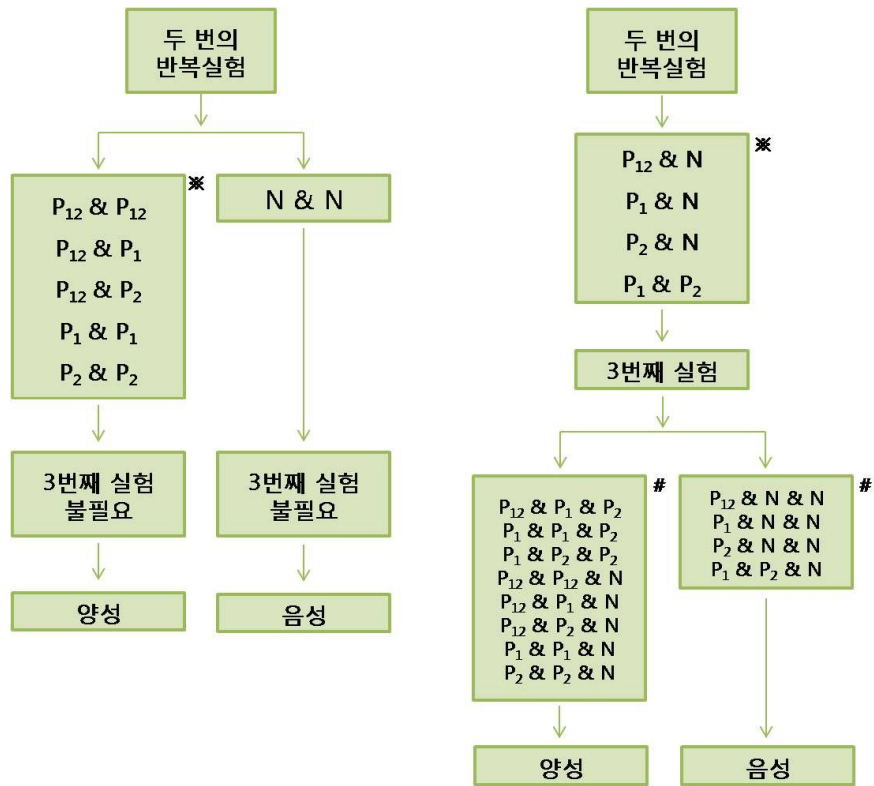


그림 2. h-CLAT 시험법에 사용된 예측 모델

P_1 : CD86에만 양성인 실험, P_2 : CD54에만 양성인 실험, P_{12} : CD86 및 CD54에 모두 양성인 실험,

N : CD86 또는 CD54에 모두 양성인 실험

※ 위 그림은 두 번의 실험에서 얻은 결과의 관련 조합을 얻은 결과의 순서와 상관없이 나타낸 것이다.

위 그림은 그림에서 나타난 두 번의 실험에서 얻은 결과를 기반으로 세 번의 실험에서 얻은 결과의 관련 조합을 나타낸다. 하지만 얻은 결과의 순서는 반영하지 않는다.

별첨 1. 번역본(OECD TG 442E)

체외 피부감작성 : 인체 세포주 활성화 시험(h-CLAT) In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test

I. 서론

1. UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(UN GHS)의 정의에 따르면 피부감작 물질은 피부에 접촉하여 알레르기 반응을 일으키는 물질을 말한다⁽¹⁾. 본 가이드라인은 UN GHS 기준에 따라 피부감작물질과 비감작물질을 구별하는데 사용되는 체외 시험법(인간 세포주 활성화를 이용한 피부감작 시험법, human Cell Line Activation Test, h-CLAT)을 설명한다⁽¹⁾.

2. 피부감작에 관여하는 주요 생물학적 현상들이 알려져 있다. 피부감작과 관련된 화학적/생물학적 기전들에 대한 기존 지식들은 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 형식으로 요약하여 설명될 수 있다⁽²⁾. 독성발현경로는 분자 수준의 초기 단계에서 중간 단계를 거쳐 유해효과, 즉 접촉성 피부염을 일으키는 과정으로 이루어진다. 이러한 경우, 분자 수준의 초기 단계(첫 번째 핵심 단계)는 피부 단백질의 친핵성 중심에 전자 친화성 물질이 공유결합 하는 것이다. 독성발현경로에서 두 번째 핵심 단계는 각질세포에서 일어나며 염증반응과 항산화/친전자 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⁽³⁾.

3. 피부감작성의 평가는 일반적으로 실험동물을 이용한다. 기니피그를 이용한 전통적인 방식인 Magnusson 및 Kligman의 Guinea Pig Maximization Test (GPMT)와 Buehler Test (TG 406)⁽⁴⁾는 피부감작의 유도단계와 유발단계를 모두 평가한다. 설치류를 이용한 시험법인 국소림프절 시험법(LLNA, TG 429)⁽³⁾ 및 LLNA의 비방사선 변형법인 LLNA: DA (TG 442A)⁽⁵⁾와 LLNA: BrdU-ELISA (TG 442B)⁽⁶⁾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* (OECD TG 442C, 피부감작 독성발현경로의 첫 번째 핵심 단계를 다루는 펩타이드 반응성 시험법, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA))⁽⁷⁾와 체외 시험법(OECD TG 442D, 피부감작 독성발현경로의 두 번째 핵심 단계를 다루는 ARE-Nrf2 Luciferase 시험법)⁽⁸⁾이 화학물질의 피부감작 위험성 평가에 대한 기여를 인정받아 채택되었다. 그러나 현재 사용 가능한 각각의 비동물 시험법들이 독성발현경로 기전을 제한적으로 충족시키기 때문에 현재 사용되고 있는 동물을 이용한 시험법을 완전히 대체하기 위해 비동물 시험법들(*in silico*, *in chemico*, *in vitro*)을 조합하는 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and

Assessment, IATA)가 필요하다⁽²⁾⁽⁹⁾.

5. h-CLAT 시험법은 피부감작 독성발현경로에서 세 번째 핵심 단계를 평가하는 것으로, 피부감작물질에 노출된 후 인간 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1에서 단핵구와 수지상세포 (CD86과 CD54)의 활성화 과정과 관련된 세포 표면 표지자(Cell surface marker)의 발현을 정량화한다⁽¹⁰⁾. 측정된 CD86과 CD54 세포 표면 표지자의 발현 수준은 피부감작물질과 비감작물질을 구별하기 위해 이용된다.

6. h-CLAT 시험법은 화학물질의 위험성 분류와 표시의 목적으로 피부감작물질과 비감작물질을 구별하기 위한 화학물질 유해성 시험과 평가에 대한 통합독성평가(IATA)의 일부로 사용하도록 권장한다⁽¹¹⁾. 다른 정보와 조합하여 h-CLAT 데이터를 사용한 사례는 참고문헌에 기록되어 있다⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾.

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

II. 초기 고려사항과 제한점

8. 피부감작성은 수지상세포 활성화와 관련된 세포막 표지자의 발현을 유도한다고 알려져 있다⁽²⁾. 그러므로 단핵구 활성 표지자를 측정하고 수지상세포 활성화와 관련이 있는 h-CLAT와 같은 시험법은⁽²⁰⁾ 화학물질의 피부감작능에 대한 평가에 적절하다고 간주된다. 그러나 수지상세포 활성화는 피부감작 독성발현경로 중 하나의 핵심 단계에 불과하기 때문에 수지상세포 활성화의 표지자를 측정하는 시험법에서 얻은 정보만으로는 어떤 화학물질이 피부감작능이 없다고 결론을 내리기 어렵다. 따라서 h-CLAT 시험법에서 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 다뤄져야 한다.

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

10. h-CLAT 시험법은 세포 배양 기술과 유세포 분석(flow cytometry analysis)에 경험이 풍부한 실험실에서 시행할 수 있다. 본 시험법으로 예측할 수 있는 실험실 내 재현성과 실험실 간의 재현성은 모두 대략 80% 수준이다⁽¹¹⁾⁽²¹⁾. 검증연구⁽²²⁾와 보고된 다른 연구⁽²³⁾ 결과를 종합해보면 LLNA 결과와 비교하였을 때 본 시험법은 피부감작성(UN GHS Category 1)과 비감작성을 구분하는 정확도가 85%이며(N=142), 93%의 민감도(94/101)와 66%의 특이도(27/41)를 나타낸다(이 계산은 EURL ECVAM의 재분석에 기반하여 모든 기존 데이터는 고려하되 단락 12에서 기술

한 대로 로그 옥탄올-물 분배계수(Log Kow)가 3.5보다 큰 화학물질에 대한 음성 결과는 고려하지 않고 산출되었다). 높은 수준의 피부감작능을 보이는 화학물질(UN GHS subcategory 1A)보다 피부감작능이 낮거나 중간 수준을 나타내는 화학물질의 경우(UN GHS Category 1B), h-CLAT 시험법에서 위음성 예측이 나오기 쉽다⁽¹²⁾⁽²²⁾⁽²⁴⁾. 종합하면 이러한 정보는 h-CLAT이 피부감작 위험성을 식별하는데 유용하다는 점을 나타낸다. 그러나 여기에서 제시된 독립적 시험법(Stand-alone)으로서 h-CLAT의 정확도 값은 단순한 지표일 뿐이다. 왜냐하면 이 시험법은 통합독성평가의 맥락에서 다른 정보와의 조합을 고려해야 하며, 위 단락 9에서 제시된 항목과도 일치되어야 하기 때문이다. 또한, 피부감작성을 평가하기 위해 비동물 시험법을 활용할 때, LLNA 시험법뿐만 아니라 다른 동물 시험법도 인체의 상황을 완벽하게 반영하지 못한다는 사실을 염두에 두어야 한다.

11. 본 가이드라인에서 “시험물질(test chemical)” 용어는 시험대상을 나타내며¹⁾, 단일성분물질, 다성분물질 및 혼합물에 대한 h-CLAT의 적용 가능성(applicability)과는 무관하다. 현재 이용 가능한 데이터에 따르면 h-CLAT 시험법은 다양한 유기 작용기, 반응기전, 피부감작능(체내 시험에서 확인한 바와 같이), 물리화학적 성질을 가지는 시험물질들에 적용할 수 있다⁽¹¹⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾. 다성분물질과 혼합물에 대한 h-CLAT의 적용 가능성에 대해서는 현재 제한적인 정보만 있다⁽²⁴⁾. 그럼에도 불구하고, 본 시험법은 기술적으로는 다성분물질과 혼합물을 시험하는데 적용할 수 있다. 그러나 규제의 목적으로 데이터를 생산하기 위해 이 가이드라인을 혼합물에 적용할 때, 이 시험법이 그러한 목적에 적합한 결과를 제공할 수 있을지, 적합하다면 그 이유는 무엇인지를 고려해야 한다.²⁾ 이러한 고려사항은 이미 혼합물을 시험하는 규제요건이 있을 경우에는 필요하지 않다. 더구나 다성분물질이나 혼합물을 시험할 때는 세포독성 성분이 관찰된 반응에 간섭할 가능성을 고려해야 한다.

12. h-CLAT 시험법은 적절한 용매/부형제에서 가용성이거나 또는 안정적인 분산(시험물질이 침전하거나 용매/부형제로부터 다른 단계로 분리되지 않는 콜로이드 또는 현탁액)을 이루는 시험물질에 적용할 수 있다(단락 21 참조). Log Kow가 3.5보다 큰 시험물질은 위음성 결과를 도출하는 경향이 있다⁽²³⁾. 그러므로 Log Kow가 3.5보다 큰 시험물질의 음성결과는 고려하지 않도록 한다. 그러나 Log Kow가 3.5보다 큰 시험물질에서 나온 양성결과는 시험물질이 피부감작성인지를 파악하는데 사용될 수 있다. 더욱이 사용된 세포주의 제한적인 대사능력과⁽²⁵⁾ 실험 조건 때문에 특히 산화율이 더딘 프로하펜텐(pro-hapten, P450 효소를 통해 효소 활성화가 필요한 물질)과 프리하펜텐(pre-hapten, 산화에 의해 활성화되는 물질)의 경우도 h-CLAT 시험법에서 음성결과를 생성할 수 있다⁽²⁴⁾. 형광 시험물질은 h-CLAT 시험법으로 평가될 수 있다⁽²⁶⁾. 그럼에도 불구하고 플루오르세인 이소치오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC)나 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI)처럼 과장을 방출하는 강한 형광 시험물질은 유세포 분석을 통한 감지를 방해하기 때문에 FITC 연결 항체나 PI를 사용하여 정확히 평가하기 어렵다. 그러한 경우, 부록 II에 제시된 숙련도 확인을 위한 물질로(Proficiency substances) 실험하여 형광색소 항체나 세포독성 표지자가 FITC 표지 항체(단락 31 참조)나 PI(단락 25 참조)와 유사

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

2) 이 문장이 2014년 4월에 열린 OECD의 시험지침 프로그램 국가조정작업반 회의에서 제안, 합의되었다.

한 결과를 제공할 수 있다면 형광색소 항체나 세포독성 표지자를 각각 사용할 수 있다. 위에서 언급한 바와 같이, 음성결과는 앞서 설명한 시험법의 한계와 통합독성평가의 맥락에서 다른 시험법의 정보와 연관하여 해석해야 한다. 기타 특정한 범주의 시험물질에 h-CLAT 시험법을 적용할 수 없다는 것을 입증하는 증거가 있을 경우 그러한 특정 범주에는 본 시험법을 사용해서는 안 된다.

13. 위에서 설명한 바와 같이, h-CLAT 시험법은 피부감작성과 비감작성을 구별하는데 사용될 수 있다. 그러나 본 시험법은 IATA와 같은 통합적 접근 방식으로 사용할 경우 감작성을 평가하는데도 유용하다⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁷⁾. 그럼에도 불구하고 h-CLAT 결과가 어떻게 피부감작성을 평가하는데 관련되는 지를 파악하기 위해서는 더 많은 연구가(특히, 인체 데이터에 바탕을 둔 연구) 요구된다.

III. 시험원리

14. h-CLAT 시험법은 시험물질에 24시간 동안 노출한 후 인체 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1 세포에서 세포 표면 표지자(CD86과 CD54)의 발현 수준을 정량화하는 체외 분석법이다. 이러한 표면 분자는 단핵구 THP-1 활성화의 전형적인 표지자이며 T 세포 초기반응에 중요한 역할을 하는 수지상세포 활성을 모방할 수 있다. 표면표지자의 발현 정도는 형광색소 항체에 세포를 염색한 후 유세포 분석을 통해 측정한다. 표면 표지자 발현의 상향조절이 세포에 독성을 유발하지 않는 저농도에서 발생하는지를 평가하기 위해 세포독성시험도 병행하여 측정한다. 용매/부형제 대조군과 비교하여 표면표지자의 상대적인 형광 강도는 피부감작물질과 비감작물질을 구별하기 위한 예측모델(단락 33 참조)에서 산출되고 이용된다.

IV. 숙련도 확인

15. 본 가이드라인에서 설명한 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 부록 II에 수록한 10개의 숙련도 물질을 이용하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 더욱이 시험법 사용자는 반응성 확인(단락 18 참조)과 양성대조군 및 용매/부형제 대조군(단락 27-29 참조)을 통해 생성된 데이터의 과거 데이터베이스를 관리해야 하며, 이러한 데이터를 활용하여 실험실에서 시험법의 재현성이 지속적으로 유지된다는 점을 확인해야 한다.

V. 시험방법

16. 본 가이드라인은 EURL ECVAM이 주관한 검증연구에서 사용된 프로토콜을 나타내는 h-CLAT (DataBase service on Alternative Methods to animal experimentation, DB-ALM) 프로토콜 no. 158⁽²⁷⁾에 바탕을 두고 있다. 이 프로토콜은 실험실에서 h-CLAT 시험법이 운용되는 경우 사용하도록 권장된다. 다음은 h-CLAT 방법의 주요 구성과 절차에 대한 설명이다. h-CLAT 방법은 용량설정시험과 CD86/CD54의 발현 측정이라는 두 단계로 이루어진다.

가. 세포 준비

17. h-CLAT 시험법을 수행하기 위해서는 인간 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1을 이용해야 한다. 세포는(TIB-202TM) ATCC(American Type Culture Collection)와 같이 충분히 검증된 세포은행을 통해 확보하도록 권장된다.

18. THP-1 세포는 10%의 소 태아 혈청(FBS), 0.05 mM의 2-mercaptoethanol, 100 units/mL의 페니실린, 100 μ g/mL의 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI-1640 세포배양배지에서 37°C, 5% CO₂를 함유하는 가습조건에서 배양된다. 세포배양배지에 페니실린과 스트렙토마이신을 사용하지 않을 수도 있다. 그러나 이러한 경우 배양 세포배양배지에 항생제를 사용하지 않는 것이 결과에 아무 영향을 주지 않는다는 것을 사용자가 부록 2에 기술된 숙련도 확인을 위한 물질을 시험하여 입증해야 한다. 어떤 경우에도, 오염 위험을 최소화하기 위해 세포배양배지의 항생제 유무 여부에 관계없이 우수 세포 배양기준(good cell culture practice)을 따라야 한다. THP-1 세포는 일상적으로 0.1~0.2 $\times 10^6$ cells/mL의 밀도로 2-3일마다 계대한다. 이 세포들은 0.1~1.0 $\times 10^6$ cells/mL의 밀도로 유지되어야 한다. 시험하기 전에, 이 세포들에 대한 반응성 여부를 확인하여 정량화해야 한다. THP-1 세포에 대한 반응성 확인은 세포를 녹인 후 2주간 양성대조군, 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)(CASN. 97-00-7, $\geq 99\%$ 순도), 황산니켈과(NiSO₄)(CASN. 10101-97-0, $\geq 99\%$ 순도)과 음성대조군, 젖산(LA)(CASN. 50-21-5, $\geq 85\%$ 순도)을 이용하여 수행한다. DNCB와 NiSO₄는 CD86과 CD54 세포 표면 표지자 모두에 대한 양성반응 결과를 도출해야 하며, LA는 CD86과 CD54 세포 표면 표지자 모두에 대한 음성반응 결과를 도출해야 한다. 반응성 확인을 통과한 세포만 분석에 이용될 수 있다. 세포는 해동 후 최대 2개월까지 계대배양이 가능하다. 계대 수(passage number)는 30을 초과할 수 없다. 반응성 시험은 단락 27-31에 기술된 절차에 따라 수행되어야 한다.

19. 시험을 위해 THP-1세포는 0.1 $\times 10^6$ cells/mL 또는 0.2 $\times 10^6$ cells/mL의 밀도로 배양해야 하며, 각각 72시간 또는 48시간 동안 배양 플라스크에서 전배양 한다(위에서 기술한 두 가지의 전배양 조건 중 한 가지 방법을 이용하여). 각 실험마다 전배양 직후 배양 플라스크 안의 세포 밀도가 최대한 균일하게 유지하는 것이 중요하다. 전배양 직후 배양 플라스크 안의 세포 밀도가 알레르기 유발 항원에 의해 유도된 CD86/CD54 발현에 영향을 줄 수 있기 때문이다⁽²⁸⁾. 시험 당일, 배양 플라스크에서 수확한 세포는 2 $\times 10^6$ cells/mL의 농도로 새로운 세포배양배지에 재현탁 한다. 그런 다음, 24 well 플레이트에 500 μ L (1 $\times 10^6$ cells/well)의 세포 용액을 분주하거나 96 well 플레이트에 80 μ L (1.6 $\times 10^5$ cells/well)의 세포 용액을 분주한다.

나. 용량설정시험

20. 용량설정시험은 용매/부형제 대조군과 비교하여 75%의 세포 생존율(CV)을 계산하기 위해 수행된다. CV75 값은 CD86/CD54발현 측정을 위한 시험물질의 농도를 측정하기 위해 사용된다(단락 27-31 참조).

다. 시험물질과 대조물질 조제

21. 시험물질과 대조물질은 시험 당일에 조제한다. h-CLAT 시험법에서 시험물질은 최종 농도 100 mg/mL (생리식염수나 세포배양배지의 경우) 또는 500 mg/mL (DMSO일 경우)가 되도록 용해하거나 분산시켜야 하는데(단락 12 참조), 첫 번째 용매/부형제로 생리식염수나 세포배양배지를 선택하거나, 만약 시험물질이 이 두 용매/부형제에 녹지 않거나 안정적으로 분산되지 않을 경우 두 번째 용매/부형제로 (DMSO, 99%순도)를 선택한다. 위에서 설명한 것 이외의 다른 용매/부형제를 사용하는 경우 충분히 과학적이고 합리적인 근거를 제공해야 한다. 최종 용매/부형제에서의 시험물질의 안정성이 고려되어야 한다.

22. 시험물질에 대한 100 mg/mL(생리식염수나 세포배양배지) 또는 500 mg/mL(DMSO)의 표준원액(stock solution)에서 시작하며, 다음과 같은 희석절차를 따라야 한다.

- 생리식염수나 세포배양배지가 용매/부형제인 경우 : 해당 용매/부형제를 이용하여 2배 연속 희석하여 8개의 표준원액 (8가지 농도)을 조제한다. 그 다음, 이 표준원액을 세포배양배지 (시험용액, working solution)에 50배 희석한다. 플레이트의 최고 최종농도인 1000 $\mu\text{g/mL}$ 이 무독성일 경우, 새로운 세포독성시험을 실시하여 최대농도를 재결정해야 한다. 생리식염수나 세포배양배지에 용해되거나 안정적으로 분산된 시험물질의 플레이트에서의 최종 농도는 5000 $\mu\text{g/mL}$ 을 초과해서는 안 된다.
- DMSO가 용매/부형제인 경우 : 해당 용매/부형제를 이용하여 2배 연속 희석하여 8개의 표준원액 (8가지 농도)을 조제한다. 그 다음, 이 원액을 세포배양배지 (시험용액)에 250배 희석한다. 무독성이어도 플레이트에서의 최종농도는 1000 $\mu\text{g/mL}$ 를 초과해서는 안 된다.

시험용액은 최종적으로 플레이트에 있는 THP-1 세포 현탁액에 동일한 용량의 시험용액을 부어 2배로 희석되어 노출하도록 사용한다(단락 24 참조) (일반적으로 플레이트의 최종 농도범위는 7.81 ~ 1000 $\mu\text{g/mL}$ 이다).

23. h-CLAT 시험법에서 사용된 용매/부형제 대조군은 세포배양배지(세포배양배지나 생리식염수에 용해되거나 안정적으로 분산된 시험물질의 경우 (단락 12 참조)) 또는 플레이트에서 시험된 단일 최종 농도, 즉 0.2 %의 DMSO(DMSO에 용해되거나 안정적으로 분산된 시험물질의 경우)을 사용한다. 이 용매/부형제 대조군은 위 단락 22에서 시험용액에 대해 설명한 것과 마찬가지로 동일한 희석과정을 거친다.

라. 시험물질과 대조물질의 적용

24. 단락 22-23에서 기술한 세포배양배지 또는 시험용액은 24 well 또는 96 well 플레이트에 준비된 세포 현탁액을 이용하여 1:1(v/v)로 혼합한다(단락 19 참조). 처리된 플레이트는 37°C, 5% CO₂환경에서 24±0.5시간 동안 배양한다. 시험물질을 배양하기 전 플레이트를 밀봉 처리(예 : 마이크로 플레이트 밀봉 테이프)하여 휘발성 시험물질의 증발로 인해 well간에 시험물질에 의한 교차오염이 발생하지 않도록 주의해야 한다⁽²⁹⁾.

마. *Propidium iodide*(PI) 염색

25. 24±0.5시간 동안 세포를 시험물질에 노출한 뒤 샘플 튜브로 옮기고 원심분리하여 세포를 모은다. 상층액은 버리고 나머지 세포는 0.1 %의 소혈청알부민(염색 완충액)이 함유된 200 μ L (96 well의 경우) 나 600 μ L (24 well의 경우)의 인산 완충 생리식염수(PBS)로 재현탁한다. 200 μ L의 세포 현탁액을 96 well 둥근 바닥 플레이트(96 well의 경우) 또는 마이크로 튜브(24 well의 경우)로 옮겨 200 μ L (96well의 경우) 또는 600 μ L (24 well의 경우)의 염색 완충액으로 두 번 세척한다. 마지막으로, 세포는 염색 완충액 (400 μ L)으로 재현탁하고 PI 용액(20 μ L)을 첨가한다 (예를 들어, 최종 PI 농도는 0.625 μ g/mL 이다). 부록 2에 기술된 숙련도 확인용 시험물질 시험 등을 통하여 다른 염색제로도 PI와 유사한 결과를 얻을 수 있음을 입증할 수 있을 경우 7-AminoactinomycinD(7-AAD), 트리판 블루 등의 다른 세포독성 표지자를 사용할 수 있다.

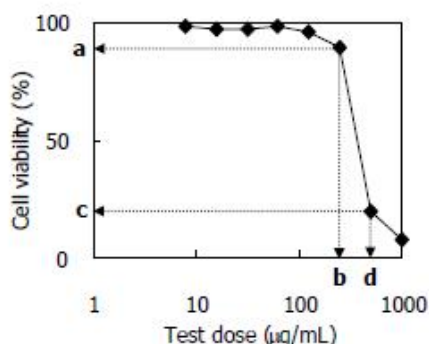
바. 유세포 분석과 CV75값 산정을 통한 세포독성 측정

26. PI 흡수는 유세포 분석기의 획득 채널(acquisition channel) FL-3을 활용하여 분석된다. 총 10,000개의 살아있는 세포를(PI 음성) 획득한다. 유세포 분석 프로그램을 이용하여 아래의 등식으로 세포 생존율을 계산할 수 있다. 세포 생존율이 낮은 경우, 죽은 세포를 포함하여 최대 30,000개의 세포를 획득해야 한다. 또는, 유세포 분석을 시작한 후 1분 동안 데이터를 얻을 수 있다.

$$\text{세포생존율} = \frac{\text{살아있는세포수}}{\text{총 획득한세포수}} \times 100$$

75%의 THP-1세포 생존율을 나타내는 농도인 CV75 값(25%의 세포독성)은 (단락 20 참조) 아래의 등식을 이용하여 로그-선형 보간법(Log-linear interpolation)으로 계산된다.

$$\text{LogCV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$



a : 75% 이상 세포 생존율의 최소값
c : 75% 이상 세포 생존율의 최대값
b, d : 각각의 세포 생존율 a와 c값을 나타내는 농도

CV75를 도출하기 위한 숙련도 물질을 시험하여 결과에 영향을 주지 않는다는 것이 입증된다면 다른 접근법도 이용할 수 있다.

사. CD86/CD54 발현 측정

1) 시험물질과 대조물질의 조제

27. 시험물질을 용해하거나 안정적으로 분산시키기 위해 적절한 용매/부형제를(생리식염수, 세포배양배지 또는 DMSO, 단락 21 참조) 사용한다. 시험물질은 먼저 용량설정시험에서 확인한 $1.2 \times CV75$ 의 100배(생리식염수나 세포배양배지의 경우) 또는 500배(DMSO의 경우)에 상응하는 농도로 희석한다(단락 26 참조). CV75를 확인할 수 없을 경우(용량설정시험에서 충분한 독성이 관찰되지 않을 경우), 각 용매/부형제로 조제한 시험물질을 최대한 용해할 수 있거나 안정적으로 분산시킬 수 있는 농도를 시작 농도로 사용해야 한다. 주목할 점은 플레이트에서의 최종 농도가 $5000 \mu\text{g/mL}$ (생리식염수나 세포배양배지의 경우) 또는 $1000 \mu\text{g/mL}$ (DMSO의 경우)를 초과해서는 안 된다는 것이다. 그 다음, h-CLAT 시험법에서 사용되는 해당 용매/부형제로 1.2배 연속 희석을 하여 표준원액($100 \times 1.2 \times CV75 \sim 100 \times 0.335 \times CV75$ (생리식염수나 세포배양배지의 경우) 또는 $500 \times 1.2 \times CV75 \sim 500 \times 0.335 \times CV75$ (DMSO의 경우)의 8가지 농도)을 확보한다(투여방법의 예에 대해서는 DB-ALM 프로토콜 NO. 158을 참조). 그런 다음, 이 표준원액은 세포배양배지(시험용액)에 50배(생리식염수나 세포배양배지) 또는 250배(DMSO)로 더 희석한다. 이 시험용액은 플레이트에서 최종적으로 2배 희석배율로 더 희석되어 노출을 위해 최종 사용된다. 결과가 세포 생존율에 대해 단락 35-36에서 기술된 시험인정요건을 충족하지 못하는 경우, 보다 정확한 CV75를 결정하기 위해 용량설정시험을 반복한다. CD86/CD54 발현을 측정하기 위해서는 24 well 플레이트만 이용해야 한다는 점을 유의해야 한다.

28. 단락 23에 기술된 대로 용매/부형제 대조군을 조제한다. h-CLAT 시험법에 사용되는 양성 대조군은 DNCB이다(단락 18 참조). DNCB를 위해 DMSO로 표준원액을 조제하여 단락 27에서 기술된 대로 이 원액을 희석한다. DNCB는 플레이트의 최종 농도(일반적으로 $4.0 \mu\text{g/mL}$)에서 CD86/CD54의 발현 정도를 측정하기 위한 양성대조군으로 이용한다. 플레이트에서 DNCB의 $4.0 \mu\text{g/mL}$ 농도를 얻으려면, 2 mg/mL 의 DNCB 표준원액을 DMSO에서 조제하여 세포배양배지로 250배 희석하여 $8 \mu\text{g/mL}$ 의 시험용액으로 만들어야 한다. 또는, 각 실험실(test facility)에서 결정된 DNCB의 CV75가 양성대조군 농도로 이용될 수 있다. 만일 시험인정요건을 충족하는 과거 데이터가 있다면 다른 적당한 양성대조군을 이용할 수 있다. 양성대조군의 경우, 플레이트의 최종 농도가 $5000 \mu\text{g/mL}$ (생리식염수나 세포배양배지의 경우) 또는 $1000 \mu\text{g/mL}$ (DMSO의 경우)를 초과해서는 안 된다. 시험인정요건은 시험물질에 대해 기술된 바와 동일하다(단락 35 참조). 그러나 양성대조군이 단일 농도에서 시험되기 때문에 마지막 시험인정요건은 예외이다.

2) 시험물질과 대조물질의 적용

29. 각각의 시험물질과 대조물질에 대해 예측하기 위해 한 번의 실험이 필요하다. CD86/CD54

의 발현정도를 측정하기 위해 각 실험은 최소한 두 번의 독립적인 반복실험(run)이 필요하다 (단락 33-34 참조). 반복실험은 각각 다른 날 또는 같은 날이라도 다음조건을 만족하면 실시할 수 있다: a) 시험물질과 항체용액에 대해 새로 신선한 표준원액과 시험용액이 당일 별도로 준비된 경우, b) 동일 계대 세포라 하더라도 다른 배양 플라스크에서 채취된 세포주 사용할 경우. 시험용액(500 μ L)으로 준비된 시험물질과 대조물질은 500 μ L의 부유세포(1×10^6 세포)에 1:1의 비율로 혼합하고 세포는 단락 27-28에서 기술한 것처럼 24 ± 0.5 시간 동안 배양한다. 최소한 두 번의 독립적인 반복실험을 통해 예측이 확보되기 때문에 각 반복실험에서 시험물질과 대조물질의 각 농도는 단일시료 측정으로 충분하다.

3) 세포 염색과 분석

30. 24 ± 0.5 시간 동안 노출한 후, 세포는 24 well 플레이트에서 샘플 튜브로 옮겨져 원심분리로 수집된 후 1 mL의 염색 완충액으로(필요 시 세척과정이 추가될 수 있다) 두 번 세척한다. 세척 후에 세포는 600 μ L의 비특이적 항체결합 차단용액(blocking solution)[0.01% (w/v)의 글로불린 (Cohn fraction II, III, 휴먼: SIGMA, #G2388-10G)을 함유한 염색 완충액]으로 처리되어 4°C 에서 15분 동안 배양된다. Blocking 처리 후, 세포는 180 μ L의 3개의 시료 분취액으로 나누어 96 well 둥근 바닥 플레이트나 마이크로 튜브로 분주한다.

31. 원심분리 후 세포는 50 μ L의 FITC-labelled anti-CD86, anti-CD54 또는 마우스 IgG1 (isotype) 항체로 4°C 에서 30분 동안 염색한다. h-CLAT DB-ALM 프로토콜 no. 158⁽²⁷⁾에서 기술된 항체는 염색 완충액으로 3:25 (v/v, CD86의 경우 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1))나 3:50 (v/v, CD54의 경우 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) 그리고 IgG1 (DAKO, #X0927))를 희석하여 사용한다. 이러한 항체 희석 배율은 최대 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio)를 제공하는 배율로 시험법 개발자들에 의해 정의되었다. 시험법 개발자의 경험을 근거로 할 때, 항체의 형광 강도는 보통 3개의 서로 다른 lot 간 일치한다. 그러나 사용자는 가장 적합한 사용농도를 규정하기 위해 자신의 실험실 조건에서 항체를 적정하는 것을 고려할 수 있다. 부록 2에 기술된 숙련도 물질로 실험하여 FITC 연결 항체와 유사한 결과를 제공할 수 있음을 입증할 수 있다면 다른 형광색소가 표지된 anti-CD86 및 anti-CD54 항체를 사용할 수 있다. 주목할 점은 h-CLAT DB - ALM protocol no. 158⁽²⁷⁾에서 기술한 것처럼 클론이나 항체의 공급자를 바꾸면 결과에 영향을 줄 수 있다는 것이다. 150 μ L 또는 그 이상의 염색 완충액으로 2번씩 3차례 세척한 후 세포는 염색 완충액(400 μ L)에 다시 부유시키고, PI용액(0.625 μ g/mL의 최종농도를 확보하기 위해 20 μ L) 또는 다른 세포독성 표지자의 용액(단락 25 참조)이 첨가된다. CD86 and CD54의 발현 정도와 세포 생존율은 유세포 분석기를 이용해 분석한다.

VI. 시험결과 및 보고

가. 데이터 평가

32. CD86와 CD54의 발현은 유세포 분석기의 FL-1 채널에서 분석된다. 기하평균 형광 강도

(MFI)를 기반으로 양성대조군(ctrl)과 시험물질 처리 세포에 대한 CD86과 CD54의 상대적 형광 강도(RFI)는 다음 등식에 따라 계산된다.

$$RFI = \frac{\text{시험물질 처리 세포 } MFI - \text{시험물질 처리 동형 대조군 세포 } MFI}{\text{용매/부형제 처리 대조군 세포 } MFI - \text{용매/부형제 처리 동형 대조군 세포 } MFI} \times 100$$

동형대조군(Isotype control) 세포 [mouse IgG1 (isotype) 항체로 염색된]에서 얻은 세포생존율 역시 단락 26에서 설명한 등식으로 계산한다.

나. 예측 모델

33. CD86/CD54 발현 측정을 위해 각 시험물질은 최소한 두 번의 독립적인 반복실험을 통해 단일 예측(양성 또는 음성)을 도출한다. 2번의 반복실험에서 2번 또는 3번의 반복실험 중 최소한 2번의 경우에서 다음 조건 중 최소 하나가 충족되면 h-CLAT 예측은 **양성**으로 간주한다. 그렇지 않으면 h-CLAT 예측을 **음성**으로 간주한다(그림 1).

- 하나 이상의 농도에서 CD86의 RFI는 150% 이상 (세포생존율 $\geq$ 50%)
- 하나 이상의 농도에서 CD54의 RFI는 200% 이상 (세포생존율 $\geq$ 50%)

위의 내용을 토대로, 처음 두 번의 반복실험에서 CD86 또는 CD54에 모두 양성인 경우 h-CLAT 예측은 **양성**으로 간주하고 세 번째 실험은 수행할 필요가 없다. 이와 마찬가지로, 두 번의 반복실험에서 두 표지자 모두에 대해 음성이면 h-CLAT 예측은 **음성**으로 간주하고(단락 36에 따라) 세 번째 실험은 수행할 필요가 없다. 그러나 처음 두 번의 반복실험에서 두 표지자 중 최소한 하나(CD54 또는 CD86)에 대해 일치하지 않으면 세 번째 실험이 필요하며 최종 예측은 세 번의 반복실험 중 다수결과를 기반으로 한다(즉 3번 중 2번). 이와 관련하여, 두 번의 반복실험을 실시하여 한 실험에서는 CD86(이하 P₁)에만 양성이고 다른 실험에서는 CD54(이하 P₂)에만 양성인 경우 세 번째 실험이 필요하다는 점에 유의해야 한다. 만약 세 번째 실험에서 두 표지자(이하 N)에 대해 음성이면 h-CLAT 예측은 음성으로 간주한다. 반면 세 번째 실험에서 두 표지자 중 하나 (P₁또는 P₂)또는 두 표지자 모두(이하 P₁₂)에 대해 양성이면 h-CLAT 예측은 **양성**으로 간주한다.

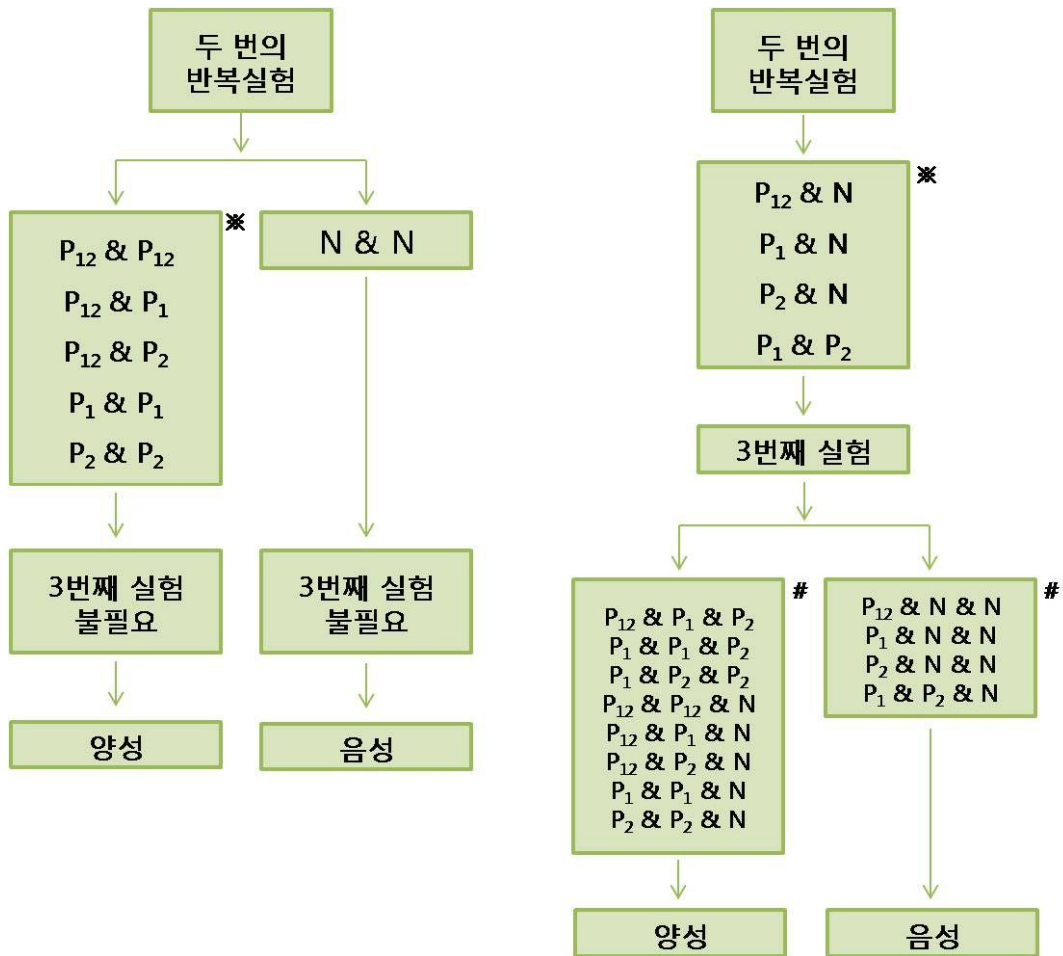


그림 1: h-CLAT 시험법에 사용된 예측 모델

h-CLAT 예측은 단락 9, 11 및 12의 내용에 따라 통합독성평가의 맥락에서 고려되어야 한다.

P₁ : CD86에만 양성인 실험

P₂ : CD54에만 양성인 실험

P₁₂ : CD86및 CD54에 모두 양성인 실험

N : CD86 또는 CD54에 모두 양성이 아닌 실험

※ 위 그림은 처음 두 번의 실험에서 얻은 결과의 관련 조합을 얻은 결과의 순서와는 상관없이 나타낸 것이다.

위 그림은 위 그림에서 나타난 처음 두 번의 실험에서 얻은 결과를 기반으로 세 번의 실험에서 얻은 결과의 관련 조합을 나타낸다. 하지만 얻은 결과의 순서는 반영하지 않는다.

34. h-CLAT 시험법에서 양성으로 예측되는 시험물질의 경우, CD86의 경우는 EC150, CD54의 경우에는 EC200의 두 가지로 유효농도(EC) 값을 결정할 수 있다. 이 유효농도란 시험물질이 150 또는 200의 RFI 값을 유도하는 농도를 말한다. 이 유효농도 값은 통합독성평가와 같은 방식으로 사용할 경우 감작능⁽³⁾을 평가하는데도 유용하다⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾. 이는 다음 등식으로 계산된다.

$$EC150(\text{for CD86}) = B_{\text{concentration}} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{concentration}} - B_{\text{concentration}})]$$

$$EC200(\text{for CD54}) = B_{\text{concentration}} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{concentration}} - B_{\text{concentration}})]$$

$A_{\text{concentration}}$ 은 RFI > 150 (CD86) 또는 200 (CD54)의 가장 낮은 농도($\mu\text{g/mL}$)

$B_{\text{concentration}}$ 은 RFI < 150 (CD86) 또는 200 (CD54)의 가장 높은 농도($\mu\text{g/mL}$)

A_{RFI} 는 RFI > 150 (CD86) 또는 200 (CD54)의 가장 낮은 농도에서 측정된 RFI

B_{RFI} 는 RFI < 150 (CD86) 또는 200 (CD54)의 가장 높은 농도에서 측정된 RFI

EC150 및 EC200 값을 보다 정확하게 유도하기 위해 CD86/CD54 발현 측정을 위한 세 번의 독립적인 반복실험이 필요하다. 최종 EC150 및 EC200 값은 세 번의 반복실험으로 계산된 EC의 중앙값으로 결정된다. 세 번의 반복실험 중 두 번만 양성 기준을 충족할 경우 (단락 33 참조) 두 가지 계산 값의 EC150 또는 EC200 중 높은 값을 채택한다.

다. 인정요건

35. h-CLAT 시험법을 사용할 때 다음 시험인정요건을 충족해야 한다⁽²²⁾⁽²⁷⁾.

- 배지 및 용매/부형제 대조군의 세포생존율은 90% 이상이어야 한다.
- 용매/부형제 대조군에서 CD86 및 CD54의 RFI 값은 양성 기준(CD86 RFI $\geq 150\%$ 및 CD54 RFI $\geq 200\%$)을 초과하지 않아야 한다. 용매/부형제 대조군의 RFI 값은 단락 32에 기술된 공식을 사용하여 계산한다 (“시험물질의 MFI”는 “용매/부형제의 MFI”로 대체되어야 하며, “용매/부형제의 MFI”는 “(배지)대조군의 MFI”로 대체되어야 한다).
- 배지 및 용매/부형제 대조군 모두에서 동형(isotype) 대조군에 대한 CD86 및 CD54의 MFI 비율은 > 105%이어야 한다.
- 양성대조군(DNCB)에서 CD86 및 CD54의 RFI 값은 양성 기준(CD86 RFI ≥ 150 및 CD54 RFI ≥ 200)을 충족해야 하고 세포생존율은 50% 이상이어야 한다.
- 시험물질의 경우 매 실험마다 최소 4가지 시험 농도에서 세포생존율은 50% 이상이어야 한다.

36. 시험 농도가 가장 높을 때 90% 미만의 세포생존율을 나타내는 시험물질에 대해서만 음성 결과가 허용된다(즉 단락 27에서 설명한 연속 희석법에 따라 $1.2 \times CV75$). $1.2 \times CV75$ 에서 세포생존율이 90% 이상인 경우 음성 결과는 폐기해야 한다. 그러한 경우 CV75 결정을 반복하여 용량 선택을 조정하도록 권장한다. 생리식염수 농도 $5000 \mu\text{g/mL}$ (세포배양배지 또는 기타 용매/부형제), DMSO 농도 $1000 \mu\text{g/mL}$, 또는 최대 가용 농도를 시험물질의 최대 시험 농도로 사용할 경우 세포생존율이 90% 이상이라도 음성 결과가 허용 가능하다는 점을 주목해야 한다.

라. 시험보고서

37. 시험보고서는 다음의 정보를 포함하여야 한다.

◦ 시험물질

• 단일성분물질

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 또는 다른 식별 요인 등과 같은 화학적 특징
- 물리적 성상, Log Kow, 용해도, DMSO 용해도, 분자량 및 기타 물리화학적 성질
- 순도, 불순물의 종류
- 시험 전 처리방법(예: 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 보관 조건과 안정성
- 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 근거

• 다성분물질, UVCB 및 혼합물

- 화학물질 정보(위 참조), 순도, 양적 비율 및 해당 성분의 관련 물리화학적 성질 (위 참조) 등에 따른 특성
- 물리적 성상, 용해도, DMSO 용해도 및 기타 관련 물리화학적 특성
- 분자량 또는 조성이 알려진 혼합물/중합체의 경우 겉보기 분자량 또는 시험 수행 관련 기타 정보
- 시험 전 처리방법(예: 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 보관 조건과 안정성
- 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 근거

◦ 대조군

• 양성대조군

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 또는 다른 식별요 인 등과 같은 화학적 특징
- 물리적 성상, Log Kow, 용해도, DMSO 용해도, 분자량 및 기타 물리화학적 성질
- 순도, 불순물의 종류

- 시험 전 처리방법(예: 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 보관 조건과 안정성
- 해당하는 경우 적합한 시험인정요건을 입증할 수 있는 기존 양성대조군 결과에 대한 참고자료
- 음성대조군 및 용매/부형제 대조군
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 또는 다른 식별요인 등과 같은 화학적 특징
 - 순도, 불순물의 종류
 - 본 가이드라인에 언급된 것 이외의 다른 용매/부형제 대조군이 사용되는 경우 물리적 성상, 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)
 - 사용하는 유세포 분석(예: 모델) (장치 설정, 글로벌린, 항체 및 사용한 세포독성 표지자 포함)
 - 시험법 수행에서 실험실의 숙련도 물질을 통한 숙련도 입증 과정 및 지속적인 시험법의 재현성 입증 과정 (예: 기존 대조군 데이터 또는 기존 반응성 체크 데이터)
- 시험 인정요건
 - 허용 범위 대비 용매/부형제 대조군에서 얻은 세포생존율, MFI 및 RFI 값
 - 허용 범위 대비 양성대조군에서 얻은 세포생존율 및 RFI 값
 - 시험물질의 모든 시험 농도에서 얻은 세포생존율
- 시험 절차

- 사용한 실험 횟수
 - 사용한 시험 물질 농도, 적용 및 노출 시간 (권장된 것과 다를 경우)
 - 노출 지속 시간 (권장된 것과 다를 경우)
 - 사용한 평가 및 결정 기준 설명
 - 시험 절차 변경에 대한 설명
- 결과
- CV75 포함한(해당하는 경우) 표 형식의 데이터, 개별 기하 MFI, RFI, 세포생존율 값, 매 실험마다 시험물질 및 양성대조군 물질에 대해 얻은 EC150/EC200 값 (해당하는 경우) 및 예측모델에 따른 시험물질 등급 표시
 - 해당하는 경우 관련된 다른 영향에 대한 설명
- 결과 토의
- h-CLAT 시험법으로 얻은 결과에 대한 토의
 - 다른 관련 정보가 있는 경우 IATA의 맥락에서 시험법 결과 고려
- 결론

VII. 참고문헌

1. United Nations UN (2013), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals(GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations publications. ISBN: 978-92-1-117006-1.
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. Series on Testing and Assessment No. 168.
Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
3. OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
4. OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
5. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
6. OECD (2010), Skin sensitisation: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
7. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
8. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.
Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

9. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, 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 SB, 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 JM. (2011), Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Archives of Toxicology* 85, 367-485.
10. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006), Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767 - 773.
11. EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing.
Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvamrecommendations>
12. Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
13. Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Evaluation of combinations of in vitro sensitization test descriptors for the artificial neural network based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
14. Bauch C, Kolle SN, Ramirez 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.
15. Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014), Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.

16. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015), Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.
17. Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
18. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016), Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
19. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012), Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
20. Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007), Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
21. EC EURL ECVAM (2015), Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurlecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clatfor-skin-sensitisation-testing>
22. EC EURL ECVAM (2012), human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
23. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013), Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
24. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.

25. 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.
26. Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81-88.
27. DB-ALM (INVITTOX) (2014), Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
28. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008), Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese interlaboratory study. *AATEX* 13, 70-82.
29. Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. *AATEX* 15, 89-96.
30. OECD (2005), Guidance Document No.34 on “the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment”. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.
31. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
32. Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008), Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Interlaboratory Study. *AATEX* 13, 27-35.

부록 1. 용어정의

정확도(Accuracy) : 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확하게 맞춘 시험결과와 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”과 “정확도(Accuracy)”는 같은 의미로 쓰임⁽³⁰⁾

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

CV75 : 75 %의 세포생존율을 나타내는 예상 농도

EC150 : CD86 발현에서 150의 RFI 값을 나타내는 농도

EC200 : CD54 발현에서 200의 RFI 값을 나타내는 농도

유세포 분석(Flow cytometry) : 세포 및 그 성분에 특징적인 패턴으로 산란되는 여기광(exciting light)의 초점을 통해 한 번에 하나씩 세포를 유체에 부유시키는 세포 분석법. 세포는 흔히 형광 표지자로 표지되어 빛이 먼저 흡수된 다음 변경된 주파수에서 발산함

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. 위험성 잠재력 또는 위해성(risk) 또는 심화 추적 필요성에 관한 규제 결정을 위하여 모든 관련 데이터를 전략적으로 통합하고 경중을 가림으로써 최소한의 시험만 수행하도록 함

배지대조군(Medium control) : 시험물질을 제외한 시험계의 모든 구성 요소가 포함된 군. 이 샘플은 용매/부형제가 시험계와 상호 작용하는지 여부를 판별하기 위해 시험물질이 처리된 샘플 및 다른 대조군 샘플과 함께 실험

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

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. 다성분 물질은 생산과정의 산물이다. 혼합물과 다성분 물질의 차이

는 혼합물은 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 섞어서 얻고, 다성분 물질은 화학반응의 산물임

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

프리합텐(Pre-haptens) : 비생물학적 변환을 통해 감작물질이 되는 화학물질

프로합텐(Pro-haptens) : 피부 감작능을 일으키기 위해 효소 활성을 필요로 하는 화학물질

상대적 형광 강도(RFI, Relative fluorescence intensity) : 용매/부형제 처리 세포의 MFI와 비교하여 시험물질로 처리된 세포의 기하 평균 형광 강도 (MFI)의 상대적인 값

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⁽³⁰⁾

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⁽³⁰⁾

반복실험(Run) : 반복실험은 용매/부형제 대조군과 양성대조군과 같이 시험 되는 하나 이상의 시험물질로 구성

민감도(Sensitivity) : 시험법으로 모든 양성/활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항⁽³⁰⁾

염색 완충액(Staining buffer) : 0.1 % 소혈청알부민을 함유한 인산 완충 생리식염수.

용매/부형제 대조군 (Solvent/vehicle control) : 시험물질을 제외한 시험계의 모든 구성요소와 사용된 용매/부형제를 포함하는 군. 동일한 용매/부형제에 용해되거나 안정적으로 분산된 시험물질로 처리한 샘플의 기본적인 반응을 평가하기 위해 사용. 이 샘플은 배지 대조군과 함께 시험될 경우 용매/부형제가 시험계와 상호작용하는지 여부도 확인가능

특이도(Specificity) : 시험법으로 모든 음성/비활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 특이도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항⁽³⁰⁾

물질(Substance) : 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연상태로 얻어진 화학원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함하지만, 해당물질의 안정성이나 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외함

시험물질(Test chemical) : "시험물질"은 시험할 때 무엇을 사용하였는지 언급할 때 사용 됨

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 분류체계에, pictogram, 표시방법, 위험 사항, 사전 주의사항, 안전정보지 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 화합물, 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⁽³⁰⁾

부록 2. 숙련도 물질

본 가이드라인에 따른 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 표 1에서 권고하는 10개의 물질에 대하여 h-CLAT 예측을 정확하게 판별하여 숙련도를 입증하여야 한다. 그리고 10가지 숙련도 물질 중 적어도 8가지 이상에 대해 각각의 기준 범위에 포함되는 CV75, EC150 및 EC200 값을 얻음으로써 숙련도를 입증하여야 한다. 숙련도 물질들은 피부 감각 위험성에 대한 반응 범위를 나타내기 위해 선정되었다. 다른 선정 기준으로는 상업적으로 구매 가능하며, 고 품질의 체내 참고 데이터와 h-CLAT 시험법으로 얻은 체외 데이터가 있어야 한다. 또한, h-CLAT 시험법에 대한 공개된 참고 데이터를 사용할 수 있다⁽¹¹⁾⁽²³⁾.

표 1. h-CLAT 시험법 숙련도 확인용 권장 물질

숙련도 물질	CASRN	성상	체내 예측력 ¹	CV75 기준 범위 $\mu\text{g/mL}$ ²	CD86 대한 h-CLAT 결과 (EC150 기준 범위 in $\mu\text{g/mL}$) ²	CD54 대한 h-CLAT 결과 (EC200 기준 범위 $\mu\text{g/mL}$) ²
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	고체	감작성 (매우강함)	2-12	양성 (0.5-10)	양성 (0.5-15)
4-Phenylenediamine	106-50-3	고체	감작성 (강함)	5-95	양성 (<40)	음성 (>1.5) ³
Nickel sulfate	10101-97-0	고체	감작성 (보통)	30-500	양성 (<100)	양성 (10-100)
2-Mercaptbenzothiazole	149-30-4	고체	감작성 (보통)	30-400	음성 (>10) ³	양성 (10-140)
R(+)-Limonene	5989-27-5	액체	감작성 (약함)	>20	음성 (>5) ³	양성 (<250)
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	고체	감작성 (약함)	25-100	양성 (20-90)	양성 (20-75)
Isopropanol	67-63-0	액체	비감작성	>5000	음성 (>5000)	음성 (>5000)
Glycerol	56-81-5	액체	비감작성	>5000	음성 (>5000)	음성 (>5000)
Lactic acid	50-21-5	액체	비감작성	1500-5000	음성 (>5000)	음성 (>5000)
4-Aminobenzoic acid	150-13-0	고체	비감작성	>1000	음성 (>1000)	음성 (>1000)

약어 : CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

- 1 체내 위험성과 예측력(Potency)은 LLNA 데이터를 기반으로 한다⁽¹¹⁾⁽²³⁾. 체내 예측력은 ECETOC가 제안한 기준을 이용해 도출한다⁽³¹⁾.
- 2 기존 관찰된 값 기반⁽²²⁾⁽³²⁾.
- 3 기존에 본 표지자에 대한 다수의 음성 결과를 확보했기 때문에 대체로 음성 결과가 예측된다. 제공된 범위는 기존에 관찰된 소수의 양성 결과를 기반으로 정의되었다. 양성 결과를 확보한 경우 EC 값은 보고된 참조 범위 내에 포함되어야 한다.

OECD/OCDE

442E

Adopted:
29 July 2016

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

INTRODUCTION

1. A skin sensitizer 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) describes the *in vitro* procedure called human Cell Line Activation test (h-CLAT), to be used for supporting the discrimination between skin sensitizers and non-sensitizers in accordance with the UN GHS (1).
2. There is general agreement regarding the key biological events underlying skin sensitization. The current knowledge of the chemical and biological mechanisms associated with skin sensitization has been summarised in the form of an Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), starting with the molecular initiating event through intermediate events to the adverse effect, namely allergic contact dermatitis. In this instance, the molecular initiating event (i.e. the first key event) is the covalent binding of electrophilic substances to nucleophilic centres in skin proteins. The second key event in this AOP takes place in the keratinocytes and includes inflammatory responses as well as changes in gene expression associated with specific cell signalling pathways such as the antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways. The third key event is the activation of dendritic cells (DC), 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 (LLNA) (3).
3. The assessment of skin sensitization has typically involved the use of laboratory animals. The classical methods that use guinea-pigs, the Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) of Magnusson and Kligman, and the Buehler Test (TG 406) (4), assess both the induction and elicitation phases of skin sensitization. The murine tests, the LLNA (TG 429) (3) and its two non-radioactive modifications, LLNA: DA (TG 442 A) (5) and LLNA: BrdU-ELISA (TG 442 B) (6), all assess exclusively the induction response, and have also gained acceptance, since they provide an advantage over the guinea pig tests in terms of animal welfare together with an objective measurement of the induction phase of skin sensitization.
4. More recently mechanistically-based *in chemico* (OECD TG 442C; Direct Peptide Reactivity Assay addressing the first key event of the skin sensitization AOP) (7) and *in vitro* (OECD TG 442D; ARE-Nrf2 Luciferase Test Method addressing the second key event of the skin sensitization AOP) (8) test methods have been adopted for contributing to the evaluation of the skin sensitization hazard potential of chemicals. However, a combination 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)(9).

5. The h-CLAT method is proposed to address the third key event of the skin sensitisation AOP by quantifying changes in the expression of cell surface markers associated with the process of activation of monocytes and DC (i.e. CD86 and CD54), in the human monocytic leukaemia cell line THP-1, following exposure to sensitisers (10). The measured expression levels of CD86 and CD54 cell surface markers are then used for supporting the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers.

6. The h-CLAT method has been evaluated in a European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM)-coordinated validation study and subsequent independent peer review by the EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC). Considering all available evidence and input from regulators and stakeholders, the h-CLAT was recommended by EURL ECVAM (11) to be used as part of an IATA to support the discrimination between sensitisers and non-sensitisers for the purpose of hazard classification and labelling. Examples of the use of h-CLAT data in combination with other information are reported in the literature (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19).

7. Definitions are provided in Annex I.

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

8. Skin sensitisers have been reported to induce the expression of cell membrane markers associated with DC activation (2). Test methods such as the h-CLAT which measure markers of monocyte activation and may be related to DC activation (20) are therefore considered relevant for the assessment of the skin sensitisation potential of chemicals. However, since DC activation represents only one key event of the skin sensitisation AOP, information generated with test methods measuring markers of DC activation may not be sufficient on its own to conclude on the absence of skin sensitisation potential of chemicals. Therefore, data generated with the h-CLAT method should be considered in the context of integrated approaches, such as IATA, and combined 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.

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 Test Guideline cannot be used on its own, neither to sub-categorise skin sensitisers into subcategories 1A and 1B as defined by UN GHS (1), for authorities implementing these two optional subcategories, nor to predict potency for safety assessment decisions. However, depending on the regulatory framework, a positive result with the h-CLAT may be used on its own to classify a chemical into UN GHS category 1.

10. The h-CLAT method proved to be transferable to laboratories experienced in cell culture techniques and flow cytometry analysis. The level of reproducibility in predictions that can be expected from the test method is in the order of 80% within and between laboratories (11) (21). Results generated in the validation study (22) and other published studies (23) overall indicate that, compared with LLNA results, the accuracy in distinguishing skin sensitisers (i.e. UN GHS Cat.1) from non-sensitisers is 85% (N=142) with a sensitivity of 93% (94/101) and a specificity of 66% (27/41) (based on a re-analysis by EURL ECVAM (21) considering all existing data and not considering negative results for chemicals with a Log Kow greater than 3.5 as described in paragraph 12). False negative predictions with the h-CLAT are more likely to concern 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) (12) (22) (24). Taken together, this information indicates the usefulness of the h-CLAT method to contribute to the identification of skin sensitisation hazards. However, the accuracy values given here for the h-CLAT 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 test as well as other animal tests may not fully reflect the situation in 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 h-CLAT to the testing of mono-constituent substances, multi-constituent substances and/or mixtures. On the basis of the data currently available, the h-CLAT method was shown to be applicable to test chemicals covering a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potency (as determined in *in vivo* studies) and physicochemical properties (11) (23) (24). Limited information is currently available on the applicability of the h-CLAT method to multi-constituent substances/mixtures (24). 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 purpose². Such considerations are not needed when there is a regulatory requirement for the 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.

12. The h-CLAT 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/vehicle into different phases) in an appropriate solvent/vehicle (see paragraph 21). Test chemicals with a Log Kow greater than 3.5 tend to produce false negative results (23). Therefore negative results with test chemicals with a Log Kow greater than 3.5 should not be considered. However, positive results obtained with test chemicals with a Log Kow greater than 3.5 could still be used to support the identification of the test chemical as a skin sensitiser. Furthermore, because of the limited metabolic capability of the cell line used (25) and because of the experimental conditions, pro-haptens (i.e. substances requiring enzymatic activation for example via P450 enzymes) and pre-haptens (i.e. substances activated by oxidation) in particular with a slow oxidation rate may also provide negative results in the h-CLAT (24). Fluorescent test chemicals can be assessed with the h-CLAT (26), nevertheless, strong fluorescent test chemicals emitting at the same wavelength as fluorescein isothiocyanate (FITC) or as propidium iodide (PI), will interfere with the flow cytometric detection and thus cannot be correctly evaluated using FITC-conjugated antibodies or PI. In such a case, other fluorochrome-tagged antibodies or other cytotoxicity markers, respectively, can be used as long as it can be shown they provide similar results as the FITC-tagged antibodies (see paragraph 31) or PI (see paragraph 25) e.g. by testing the proficiency substances in Annex II. In the light of the above, negative results should be interpreted in the context of the stated limitations and together with other information sources within the framework of IATA. In cases where there is evidence demonstrating the non-applicability of the h-CLAT method to other specific categories of test chemicals, it should not be used for those specific categories.

13. As described above, the h-CLAT method supports the discrimination between skin sensitisers from non-sensitisers. However, it may also potentially contribute to the assessment of sensitising potency (12) (13) (17) when used in integrated approaches such as IATA. Nevertheless, further work, preferably based

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

² This sentence was proposed and agreed at the April 2014 WNT meeting.

on human data, is required to determine how h-CLAT results may possibly inform potency assessment.

PRINCIPLE OF THE TEST

14. The h-CLAT method is an *in vitro* assay that quantifies changes of cell surface marker expression (i.e. CD86 and CD54) on a human monocytic leukemia cell line, THP-1 cells, following 24 hours exposure to the test chemical. These surface molecules are typical markers of monocytic THP-1 activation and may mimic DC activation, which plays a critical role in T-cell priming. The changes of surface marker expression are measured by flow cytometry following cell staining with fluorochrome-tagged antibodies. Cytotoxicity measurement is also conducted concurrently to assess whether upregulation of surface marker expression occurs at sub-cytotoxic concentrations. The relative fluorescence intensity of surface markers compared to solvent/vehicle control are calculated and used in the prediction model (see paragraph 33), to support the discrimination between sensitisers and non-sensitisers

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

15. Prior to routine use of the test method described in this Test Guideline, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the 10 Proficiency Substances listed in Annex II. Moreover, test method users should maintain an historical database of data generated with the reactivity checks (see paragraph 18) and with the positive and solvent/vehicle controls (see paragraphs 27-29), and use these data to confirm the reproducibility of the test method in their laboratory is maintained over time.

PROCEDURE

16. This Test Guideline is based on the h-CLAT DataBase service on ALternative Methods to animal experimentation (DB-ALM) protocol no. 158 (27) which represents the protocol used for the EURL ECVAM-coordinated validation study. It is recommended that this protocol is used when implementing and using the h-CLAT method in the laboratory. The following is a description of the main components and procedures for the h-CLAT method, which comprises two steps: *dose finding assay* and *CD86/CD54 expression measurement*.

Preparation of cells

17. The human monocytic leukaemia cell line, THP-1, should be used for performing the h-CLAT method. It is recommended that cells (TIB-202™) are obtained from a well-qualified cell bank, such as the American Type Culture Collection.

18. THP-1 cells are cultured, at 37°C under 5% CO₂ and humidified atmosphere, in RPMI-1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The use of penicillin and streptomycin in the culture medium can be avoided. However, in such a case users should verify that the absence of antibiotics in the culture medium has no impact on the results, for example by testing the proficiency substances listed in Annex II. In any case, in order to minimise the risk of contamination, good cell culture practices should be followed independently of the presence or not of antibiotics in the cell culture medium. THP-1 cells are routinely seeded every 2-3 days at the density of 0.1 to 0.2 × 10⁶ cells/mL. They should be maintained at densities from 0.1 to 1.0 × 10⁶ cells/mL. Prior to using them for testing, the cells should be qualified by conducting a

reactivity check. The reactivity check of the cells should be performed using the positive controls, 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) (CAS n. 97-00-7, $\geq 99\%$ purity) and nickel sulfate (NiSO_4) (CAS n. 10101-97-0, $\geq 99\%$ purity) and the negative control, lactic acid (LA) (CAS n. 50-21-5, $\geq 85\%$ purity), two weeks after thawing. Both DNCB and NiSO_4 should produce a positive response of both CD86 and CD54 cell surface markers, and LA should produce a negative response of both CD86 and CD54 cell surface markers. Only the cells which passed the reactivity check are to be used for the assay. Cells can be propagated up to two months after thawing. Passage number should not exceed 30. The reactivity check should be performed according to the procedures described in paragraphs 27-31.

19. For testing, THP-1 cells are seeded at a density of either 0.1×10^6 cells/mL or 0.2×10^6 cells/mL, and pre-cultured in culture flasks for 72 hours or for 48 hours, respectively. It is important that the cell density in the culture flask just after the pre-culture period be as consistent as possible in each experiment (by using one of the two pre-culture conditions described above), because the cell density in the culture flask just after pre-culture could affect the CD86/CD54 expression induced by allergens (28). On the day of testing, cells harvested from culture flask are resuspended with fresh culture medium at 2×10^6 cells/mL. Then, cells are distributed into a 24 well flat-bottom plate with 500 μL (1×10^6 cells/well) or a 96-well flat-bottom plate with 80 μL (1.6×10^5 cells/well).

Dose finding assay

20. A *dose finding assay* is performed to determine the CV75, being the test chemical concentration that results in 75% cell viability (CV) compared to the solvent/vehicle control. The CV75 value is used to determine the concentration of test chemicals for the *CD86/CD54 expression measurement* (see paragraphs 27-31).

Preparation of test chemicals and control substances

21. The test chemicals and control substances are prepared on the day of testing. For the h-CLAT method, test chemicals are dissolved or stably dispersed (see also paragraph 12) in saline or medium as first solvent/vehicle options or dimethyl sulfoxide (DMSO, $\geq 99\%$ purity) as a second solvent/vehicle option if the test chemical is not soluble or does not form a stable dispersion in the previous two solvents/vehicles, to final concentrations of 100 mg/mL (in saline or medium) or 500 mg/mL (in DMSO). Other solvents/vehicles than those described above may be used if sufficient scientific rationale is provided. Stability of the test chemical in the final solvent/vehicle should be taken into account.

22. Starting from the 100 mg/mL (in saline or medium) or 500 mg/mL (in DMSO) stock solutions of the test chemicals, the following dilution steps should be taken:

- For saline or medium as solvent/vehicle: Eight stock solutions (eight concentrations) are prepared, by two-fold serial dilutions using the corresponding solvent/vehicle. These stock solutions are then further diluted 50-fold into culture medium (working solutions). If the top final concentration in the plate of 1000 $\mu\text{g/mL}$ is non-toxic, the maximum concentration should be re-determined by performing a new cytotoxicity test. The final concentration in the plate should not exceed 5000 $\mu\text{g/mL}$ for test chemicals dissolved or stably dispersed in saline or medium.
- For DMSO as solvent/vehicle: Eight stock solutions (eight concentrations) are prepared, by two-fold serial dilutions using the corresponding solvent/vehicle. These stock solutions are then further diluted 250-fold into culture medium (working solutions). The final concentration in plate should not exceed 1000 $\mu\text{g/mL}$ even if this concentration is non-toxic.

The working solutions are finally used for exposure by adding an equal volume of working solution to the volume of THP-1 cell suspension in the plate (see also paragraph 24) to achieve a further two-fold dilution (usually, the final range of concentrations in the plate is 7.81–1000 $\mu\text{g/mL}$).

23. The solvent/vehicle control used in the h-CLAT method is culture medium (for test chemicals solubilised or stably dispersed (see paragraph 12) either with medium or saline) or DMSO (for test chemicals solubilised or stably dispersed in DMSO) tested at a single final concentration in the plate of 0.2%. It undergoes the same dilution as described for the working solutions in paragraph 22.

Application of test chemicals and control substances

24. The culture medium or working solutions described in paragraphs 22 and 23 are mixed 1:1 (v/v) with the cell suspensions prepared in the 24-well or 96-well flat-bottom plate (see paragraph 19). The treated plates are then incubated for 24±0.5 hours at 37°C under 5% CO₂. Care should be taken to avoid evaporation of volatile test chemicals and cross-contamination between wells by test chemicals, e.g. by sealing the plate prior to the incubation with the test chemicals (29).

Propidium iodide (PI) staining

25. After 24±0.5 hours of exposure, cells are transferred into sample tubes and collected by centrifugation. The supernatants are discarded and the remaining cells are resuspended with 600 µL (in case of 96-well) or 1mL (in case of 24-well) of a phosphate buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin (staining buffer). 200 µL of cell suspension is transferred into 96-well round-bottom plate (in case of 96-well) or micro tube (in case of 24-well) and washed twice with 200 µL (in case of 96-well) or 1mL (in case of 24-well) of staining buffer. Finally, cells are resuspended in staining buffer (e.g. 400 µL) and PI solution (e.g. 20 µL) is added (for example, final concentration of PI is 0.625 µg/mL). Other cytotoxicity markers, such as 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), Trypan blue or others may be used if the alternative stains can be shown to provide similar results as PI, for example by testing the proficiency substances in Annex II.

Cytotoxicity measurement by flow cytometry and estimation of CV75 value

26. The PI uptake is analysed using flow cytometry with the acquisition channel FL-3. A total of 10,000 living cells (PI negative) are acquired. The cell viability can be calculated using the following equation by the cytometer analysis program. When the cell viability is low, up to 30,000 cells including dead cells should be acquired. Alternatively, data can be acquired for one minute after the initiation of the analysis.

$$\text{Cell Viability} = \frac{\text{Number of living cells}}{\text{Total Number of acquired cells}} \times 100$$

The CV75 value (see paragraph 20), i.e. a concentration showing 75% of THP-1 cell survival (25% cytotoxicity), is calculated by log-linear interpolation using the following equation:

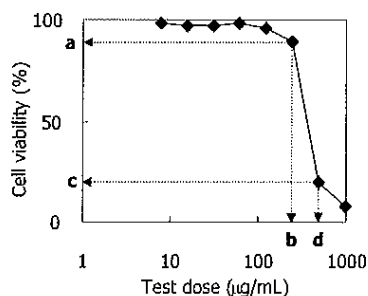
$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log (b)} - (75 - a) \times \text{Log (d)}}{a - c}$$

Where:

a is the minimum value of cell viability over 75%

c is the maximum value of cell viability below 75%

b and d are the concentrations showing the value of cell viability a and c respectively



Other approaches to derive the CV75 can be used as long as it is demonstrated that this has no impact on the results (e.g. by testing the proficiency substances).

CD86/CD54 expression measurement

Preparation of the test chemicals and control substances

27. The appropriate solvent/vehicle (saline, medium or DMSO; see paragraph 21) is used to dissolve or stably disperse the test chemicals. The test chemicals are first diluted to the concentration corresponding to 100-fold (for saline or medium) or 500-fold (for DMSO) of the $1.2 \times \text{CV75}$ determined in the *dose finding assay* (see paragraph 26). If the CV75 cannot be determined (i.e. if sufficient cytotoxicity is not observed in the *dose finding assay*), the highest soluble or stably dispersed concentration of test chemical prepared with each solvent/vehicle should be used as starting concentration. Please note that the final concentration in the plate should not exceed 5000 µg/mL (in case of saline or medium) or 1000 µg/mL (in case of DMSO). Then, 1.2-fold serial dilutions are made using the corresponding solvent/vehicle to obtain the stock solutions (eight concentrations ranging from $100 \times 1.2 \times \text{CV75}$ to $100 \times 0.335 \times \text{CV75}$ (for saline or medium) or from $500 \times 1.2 \times \text{CV75}$ to $500 \times 0.335 \times \text{CV75}$ (for DMSO)) to be tested in the h-CLAT method (see DB-ALM protocol No. 158 for an example of dosing scheme). The stock solutions are then further diluted 50-fold (for saline or medium) or 250-fold (for DMSO) into the culture medium (working solutions). These working solutions are finally used for exposure with a further final two-fold dilution factor in the plate. If the results do not meet the acceptance criteria described in the paragraphs 35 and 36 regarding cell viability, the *dose finding assay* may be repeated to determine a more precise CV75. Please note that only 24-well plates can be used for CD86/CD54 expression measurement.

28. The solvent/vehicle control is prepared as described in paragraph 23. The positive control used in the h-CLAT method is DNCB (see paragraph 18), for which stock solutions are prepared in DMSO and diluted as described for the stock solutions in paragraph 27. DNCB should be used as the positive control for CD86/CD54 expression measurement at a final single concentration in the plate (typically 4.0 µg/mL). To obtain a 4.0 µg/mL concentration of DNCB in the plate, a 2 mg/mL stock solution of DNCB in DMSO is prepared and further diluted 250-fold with culture medium to a 8 µg/mL working solution. Alternatively, the CV75 of DNCB, which is determined in each test facility, could be also used as the positive control concentration. Other suitable positive controls may be used if historical data are available to derive comparable run acceptance criteria. For positive controls, the final single concentration in the plate should not exceed 5000 µg/mL (in case of saline or medium) or 1000 µg/mL (in case of DMSO). The run acceptance criteria are the same as those described for the test chemical (see paragraph 35), except for the last acceptance criterion since the positive control is tested at a single concentration.

Application of test chemicals and control substances

29. For each test chemical and control substance, one experiment is needed to obtain a prediction. Each experiment consists of at least two independent runs for *CD86/CD54 expression measurement* (see paragraphs 33 and 34). Each independent run is performed on a different day or on the same day provided that for each run: a) independent fresh stock solutions and working solutions of the test chemical and antibody solutions are prepared and b) independently harvested cells are used (i.e. cells are collected from different culture flasks); however, cells may come from the same passage. Test chemicals and control substances prepared as working solutions (500 µL) are mixed with 500 µL of suspended cells (1×10^6 cells) at 1:1 ratio, and cells are incubated for 24 ± 0.5 hours as described in paragraphs 27 and 28. In each run, a single replicate for each concentration of the test chemical and control substance is sufficient because a prediction is obtained from at least two independent runs.

Cell staining and analysis

30. After 24 ± 0.5 hours of exposure, cells are transferred from 24 well plate into sample tubes, collected by centrifugation and then washed twice with 1 mL of staining buffer (if necessary, additional washing steps may be done). After washing, cells are blocked with 600 µL of blocking solution (staining buffer containing 0.01% (w/v) globulin (Cohn fraction II, III, Human: SIGMA, #G2388-10G)) and incubated at 4°C for 15 min. After blocking, cells are split in three aliquots of 180 µL into a 96-well round-bottom plate or micro tube.

31. After centrifugation, cells are stained with 50 µL of FITC-labelled anti-CD86, anti-CD54 or mouse IgG1 (isotype) antibodies at 4°C for 30 min. The antibodies described in the h-CLAT DB-ALM protocol no. 158 (27) should be used by diluting 3:25 (v/v, for CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)) or 3:50 (v/v, for CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) and IgG1 (DAKO, #X0927)) with staining buffer. These antibody dilution factors were defined by the test method developers as those providing the best signal-to-noise ratio. Based on the experience of the test method developers, the fluorescence intensity of the antibodies is usually consistent between different lots. However, users may consider titrating the antibodies in their own laboratory's conditions to define the best concentrations for use. Other fluorochrome-tagged anti-CD86 and/or anti-CD54 antibodies may be used if they can be shown to provide similar results as FITC-conjugated antibodies, for example by testing the proficiency substances in Annex II. It should be noted that changing the clone or supplier of the antibodies as described in the h-CLAT DB-ALM protocol no. 158 (27) may affect the results. After washing with 200 µL of staining buffer three times, cells are resuspended in staining buffer (e.g. 400 µL), and the PI solution (e.g. 20 µL to obtain a final concentration of 0.625 µg/mL) or another cytotoxicity marker's solution (see paragraph 25) is added. The expression levels of CD86 and CD54, and cell viability are analysed using flow cytometry.

DATA AND REPORTING*Data evaluation*

32. The expression of CD86 and CD54 is analysed with flow cytometry with the acquisition channel FL-1. Based on the geometric mean fluorescence intensity (MFI), the relative fluorescence intensity (RFI) of CD86 and CD54 for positive control (ctrl) cells and chemical-treated cells are calculated according to the following equation:

$$\text{RFI} = \frac{\text{MFI of chemical-treated cells} - \text{MFI of chemical-treated isotype control cells}}{\text{MFI of solvent/vehicle-treated ctrl cells} - \text{MFI of solvent/vehicle-treated isotype ctrl cells}} \times 100$$

The cell viability from the isotype control (ctrl) cells (which are stained with mouse IgG1 (isotype) antibodies) is also calculated according to the equation described in paragraph 26.

Prediction model

33. For *CD86/CD54 expression measurement*, each test chemical is tested in at least two independent runs to derive a single prediction (POSITIVE or NEGATIVE). An h-CLAT prediction is considered POSITIVE if at least one of the following conditions is met in 2 of 2 or in at least 2 of 3 independent runs, otherwise the h-CLAT prediction is considered NEGATIVE (Figure 1):

- The RFI of CD86 is equal to or greater than 150% at any tested concentration (with cell viability $\geq$ 50%);
- The RFI of CD54 is equal to or greater than 200% at any tested concentration (with cell viability $\geq$ 50%).

Based on the above, if the first two runs are both positive for CD86 and/or are both positive for CD54, the h-CLAT prediction is considered POSITIVE and a third run does not need to be conducted. Similarly, if the first two runs are negative for both markers, the h-CLAT prediction is considered NEGATIVE (with due consideration of the provisions of paragraph 36) without the need for a third run. If however, the first two runs are not concordant for at least one of the markers (CD54 or CD86), a third run is needed and the final prediction will be based on the majority result of the three individual runs (i.e. 2 out of 3). In this respect, it should be noted that if two independent runs are conducted and one is only positive for CD86 (hereinafter referred to as P_1) and the other is only positive for CD54 (hereinafter referred to as P_2), a third run is required. If this third run is negative for both markers (hereinafter referred to as N), the h-CLAT prediction is considered NEGATIVE. On the other hand, if the third run is positive for either marker (P_1 or P_2) or for both markers (hereinafter referred to as P_{12}), the h-CLAT prediction is considered POSITIVE.

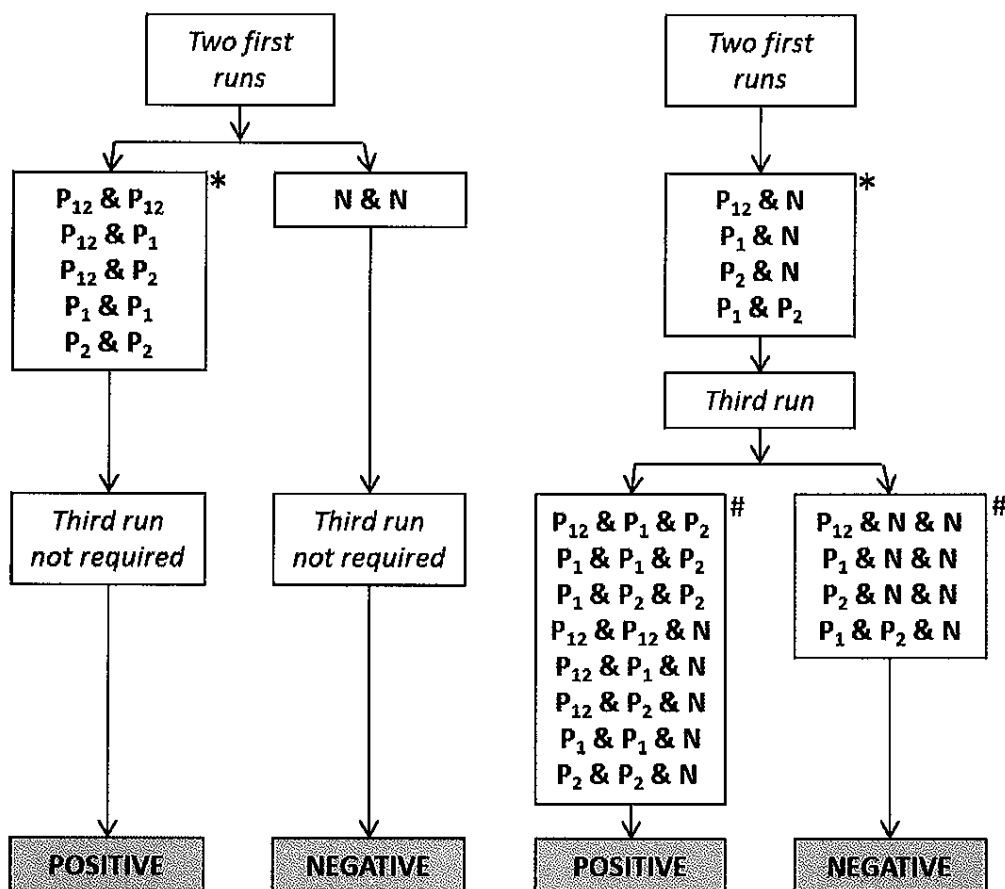


Figure 1: Prediction model used in the h-CLAT test method. An h-CLAT prediction should be considered in the framework of an IATA and in accordance with the provision of paragraphs 9, 11 and 12. P₁: run with only CD86 positive; P₂: run with only CD54 positive; P₁₂: run with both CD86 and CD54 positive; N: run with neither CD86 nor CD54 positive. *The boxes show the relevant combinations of results from the first two runs, independently of the order in which they may be obtained. #The boxes show the relevant combinations of results from the three runs on the basis of the results obtained in the first two runs shown in the box above, but do not reflect the order in which they may be obtained.

34. For the test chemicals predicted as POSITIVE with the h-CLAT, optionally, two Effective Concentrations (EC) values, the EC150 for CD86 and EC200 for CD54, i.e. the concentration at which the test chemicals induced a RFI of 150 or 200, may be determined. These EC values potentially could contribute to the assessment of sensitising potency (3) when used in integrated approaches such as IATA (12) (13) (14) (15) (16). They can be calculated by the following equations:

$$EC150 \text{ (for CD86)} = B_{\text{concentration}} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{concentration}} - B_{\text{concentration}})]$$

$$EC200 \text{ (for CD54)} = B_{\text{concentration}} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{concentration}} - B_{\text{concentration}})]$$

where

A_{concentration} is the lowest concentration in µg/mL with RFI > 150 (CD86) or 200 (CD54)

B_{concentration} is the highest concentration in µg/mL with RFI < 150 (CD86) or 200 (CD54)

A_{RFI} is the RFI at the lowest concentration with RFI > 150 (CD86) or 200 (CD54)

B_{RFI} is the RFI at the highest concentration with $RFI < 150$ (CD86) or 200 (CD54)

For the purpose of more precisely deriving the EC150 and EC200 values, three independent runs for *CD86/CD54 expression measurement* may be required. The final EC150 and EC200 values are then determined as the median value of the ECs calculated from the three independent runs. When only two of three independent runs meet the criteria for positivity (see paragraph 33), the higher EC150 or EC200 of the two calculated values is adopted.

Acceptance criteria

35. The following acceptance criteria should be met when using the h-CLAT method (22) (27).

- The cell viabilities of medium and solvent/vehicle controls should be higher than 90%.
- In the solvent/vehicle control, RFI values of both CD86 and CD54 should not exceed the positive criteria (CD86 $RFI \geq 150\%$ and CD54 $RFI \geq 200\%$). RFI values of the solvent/vehicle control are calculated by using the formula described in paragraph 32 ("MFI of chemical" should be replaced with "MFI of solvent/vehicle", and "MFI of solvent/vehicle" should be replaced with "MFI of (medium) control").
- For both medium and solvent/vehicle controls, the MFI ratio of both CD86 and CD54 to isotype control should be $> 105\%$.
- In the positive control (DNCB), RFI values of both CD86 and CD54 should meet the positive criteria (CD86 $RFI \geq 150$ and CD54 $RFI \geq 200$) and cell viability should be more than 50%.
- For the test chemical, the cell viability should be more than 50% in at least four tested concentrations in each run.

36. Negative results are acceptable only for test chemicals exhibiting a cell viability of less than 90% at the highest concentration tested (i.e. $1.2 \times CV75$ according to the serial dilution scheme described in paragraph 27). If the cell viability at $1.2 \times CV75$ is equal or above 90% the negative result should be discarded. In such a case it is recommended to try to refine the dose selection by repeating the CV75 determination. It should be noted that when 5000 $\mu\text{g/mL}$ in saline (or medium or other solvents/vehicles), 1000 $\mu\text{g/mL}$ in DMSO or the highest soluble concentration is used as the maximal test concentration of a test chemical, a negative result is acceptable even if the cell viability is above 90%.

Test report

37. 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, Log Kow, 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.;

442E

OECD/OCDE

- Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available;
 - Justification for choice of solvent/vehicle for each test chemical.
- 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;
 - Justification for choice of solvent/vehicle for each test chemical.

Controls

- Positive control
- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
 - Physical appearance, Log K_{ow}, 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 and solvent/vehicle control
- Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, 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 control solvent/vehicle 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/vehicle 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);
- Flow cytometry used (e.g. model), including instrument settings, globulin, antibodies and cytotoxicity marker used;
- The procedure used to demonstrate proficiency of the laboratory in performing the test method by testing of proficiency substances, and the procedure used to demonstrate reproducible performance of the test method over time, e.g. historical control data and/or historical reactivity checks' data.

Test acceptance criteria

- Cell viability, MFI and RFI values obtained with the solvent/vehicle control in comparison to the acceptance ranges;
- Cell viability and RFI values obtained with the positive control in comparison to the acceptance ranges;
- Cell viability of all tested concentrations of the tested chemical.

Test procedure

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

Results

- Tabulation of the data, including CV75 (if applicable), individual geometric MFI, RFI, cell viability values, EC150/EC200 values (if applicable) obtained for the test chemical and for the positive control in each run, and an indication of the rating of the test chemical according to the prediction model;
- Description of any other relevant observations, if applicable.

Discussion of the results

- Discussion of the results obtained with the h-CLAT method;

442E

OECD/OCDE

- Consideration of the test method results within the context of an IATA, if other relevant information is available.

Conclusions

LITERATURE

1. United Nations UN (2013), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. 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. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
3. OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
4. OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 406, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
5. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay: DA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442A, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
6. OECD (2010), Skin sensitisation: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442B, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
7. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
8. OECD (2015), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
9. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, 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 SB, 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 JM. (2011), Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.
10. Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006), Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. In Vitro 20, 767-773.
11. EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>

12. Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
13. Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Evaluation of combinations of in vitro sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
14. Bauch C, Kolle SN, Ramirez 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.
15. Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014), Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
16. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015), Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.
17. Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015), Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
18. Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016), Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
19. Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012), Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
20. Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007), Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
21. EC EURL ECVAM (2015), Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
22. EC EURL ECVAM (2012), human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
23. Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013), Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
24. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y,

- Nishiyama N, Itagaki H. (2010), A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
25. 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.
26. Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6th report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. *AATEX* 15, 81-88.
27. DB-ALM (INVITTOX) (2014), Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Accessible at: <http://ecvam-dbal.m.jrc.ec.europa.eu/>
28. Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008), Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. *AATEX* 13, 70-82.
29. Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, , Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010), The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. *AATEX* 15, 89-96.
30. OECD (2005), Guidance Document No.34 on “the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment”. OECD Series on Testing and Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2005, 96 pp.
31. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
32. Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008), Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. *AATEX* 13, 27-35.

ANNEX IDEFINITIONS

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 (30).

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).

CV75: The estimated concentration showing 75% cell viability.

EC150: the concentrations showing the RFI values of 150 in CD86 expression

EC200: the concentrations showing the RFI values of 200 in CD54 expression

Flow cytometry: a cytometric technique in which cells suspended in a fluid flow one at a time through a focus of exciting light, which is scattered in patterns characteristic to the cells and their components; cells are frequently labeled with fluorescent markers so that light is first absorbed and then emitted at altered frequencies.

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.

Medium control: An untreated replicate containing all components of a test system. This sample is processed with test chemical-treated samples and other control samples to determine whether the solvent/vehicle interacts with the test system.

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

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.

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.

Pre-haptens: chemicals which become sensitisers through abiotic transformation

Pro-haptens: chemicals requiring enzymatic activation to exert skin sensitisation potential

Relative fluorescence intensity (RFI): Relative values of geometric mean fluorescence intensity (MFI) in chemical-treated cells compared to MFI in solvent/vehicle-treated cells.

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 (30).

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 (30).

Run: A run consists of one or more test chemicals tested concurrently with a solvent/vehicle control and with a positive control.

Sensitivity: The proportion of all positive/active chemicals that are correctly classified by the test. 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 (30).

Staining buffer: A phosphate buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin.

Solvent/vehicle control: An untreated sample containing all components of a test system except of the test chemical, but including the solvent/vehicle that is used. It is used to establish the baseline response for the samples treated with the test chemical dissolved or stably dispersed in the same solvent/vehicle. When tested with a concurrent medium control, this sample also demonstrates whether the solvent/vehicle interacts with the test system.

Specificity: The proportion of all negative/inactive chemicals that are correctly classified by the test. 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 (30).

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.

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 (30).

ANNEX IIPROFICIENCY SUBSTANCES

Prior to routine use of a test method that adheres to this Test Guideline, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly obtaining the expected h-CLAT prediction for the 10 substances recommended in Table 1 and by obtaining CV75, EC150 and EC200 values that fall within the respective reference range for at least 8 out of the 10 proficiency substances. Proficiency substances were selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazards. Other selection criteria were that the substances are commercially available, and that high-quality *in vivo* reference data as well as high quality *in vitro* data generated with the h-CLAT method are available. Also, published reference data are available for the h-CLAT method (11) (23).

Table 1: Recommended substances for demonstrating technical proficiency with the h-CLAT method

Proficiency substances	CASRN	Physical state	<i>In vivo</i> prediction ¹	CV75 Reference Range in µg/mL ²	h-CLAT results for CD86 (EC150 Reference Range in µg/mL) ²	h-CLAT results for CD54 (EC200 Reference Range in µg/mL) ²
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Sensitiser (extreme)	2-12	Positive (0.5-10)	Positive (0.5-15)
4-Phenylenediamine	106-50-3	Solid	Sensitiser (strong)	5-95	Positive (<40)	Negative (>1.5) ³
Nickel sulfate	10101-97-0	Solid	Sensitiser (moderate)	30-500	Positive (<100)	Positive (10-100)
2-Mercaptbenzothiazole	149-30-4	Solid	Sensitiser (moderate)	30-400	Negative (>10) ³	Positive (10-140)
R(+)-Limonene	5989-27-5	Liquid	Sensitiser (weak)	>20	Negative (>5) ³	Positive (<250)
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Solid	Sensitiser (weak)	25-100	Positive (20-90)	Positive (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Liquid	Non-sensitiser	>5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
Glycerol	56-81-5	Liquid	Non-sensitiser	>5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
Lactic acid	50-21-5	Liquid	Non-sensitiser	1500-5000	Negative (>5000)	Negative (>5000)
4-Aminobenzoic acid	150-13-0	Solid	Non-sensitiser	>1000	Negative (>1000)	Negative (>1000)

Abbreviations: CAS RN = Chemical Abstracts Service Registry Number

¹ The *in vivo* hazard and (potency) prediction is based on LLNA data (11) (23). The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (31).

² Based on historical observed values (22) (32).

³ Historically, a majority of negative results have been obtained for this marker and therefore a negative result is mostly expected. The range provided was defined on the basis of the few historical positive results observed. In case a positive result is obtained, the EC value should be within the reported reference range.

“화장품 피부감작성 동물대체시험법 (인체 세포주 활성화 방법,
h-CLAT) 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, 선은미, 안수선, 전태원, 조정희, 허용

문 의 처 식품의약품안전평가원, 특수독성과

Tel : 043-719-5152, 5162 Fax : 043-719-5150

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