

등록번호

안내서-0968-01

화장품 피부부식성 동물대체시험법
(인체피부모델을 이용한 피부부식 시험법)
가이드라인
(민원인 안내서)

2019. 9.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

**화장품 피부부식성 동물대체시험법(인체피부모델을 이용한 피부부식 시험법)
가이드라인(민원인 안내서)**

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 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 :)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 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	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음.		
2019년 9월 30일		
담당자 확 인(부서장)		방 서 영 윤 혜 성

이 안내서는 화장품 피부부식성 동물대체시험법(인체피부모델을 이용한 피부부식 시험법) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 ('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2019년 월 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

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1			화장품 피부부식성 동물대체시험법 가이드라인(민원인 안내서) 제정

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 피부부식성 동물대체시험법 (인체피부모델을 이용한 피부부식 시험법) 가이드라인

I. 개요

본 시험법은 인체피부의 상부인 표피의 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성과 매우 유사하게 3차원으로 재구성한 인체피부모델(Reconstructed human Epidermis, RhE)을 사용하여 비가역적인 피부손상인 피부부식을 평가하는 생체외(*in vitro*) 피부부식 시험법이다.

본 시험법은 인체피부모델에 시험물질을 국소적으로 적용하여 일정 시간 노출시킨 뒤 세포생존율을 측정하여 피부부식성을 평가하는 시험법으로, 세포생존율을 측정하는 MTT를 이용하여 부식성 및 비부식성과 혼합물의 하위 범주를 분류할 수 있다.

본 가이드라인에는 5개의 RhE 모델(EpiSkin[™], EpiDerm[™], SkinEthic[™] RHE, epiCS[®], LabCyte EPI-MODEL24)을 사용하여 검증된 시험법을 포함하고 있다.

본 시험법을 사용하고자 하는 실험실은 가이드라인에서 제시된 12개의 숙련도 물질(별첨 1의 표 1)을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하며, 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건 모두를 만족시키는 결과 값만이 유효한 것으로 인정된다.

II. 시험원리

시험물질은 비형질전환 인체유래표피 각질세포로 구성된 3차원 인체피부모델에 국소적으로 적용된다. RhE 모델은 조직화된 기저층(basal layers), 가시층(spinous layers), 과립층(granular layers) 및 체내에 분포하는 지방 중 주요 지질층(lipid class)인 세포간 판상형 지질층(lamellar lipid layer)을 포함하는 다층의 각질층으로 구성된다. RhE 시험법은 부식성 물질에 의해 각질층을 투과하여 세포독성을 나타낸다는 원리를 기반으로 한다. 세포생존율은 MTT [3-(4,5-dimethyl-1,2,4-triazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]가 효소반응에 의해

변환된 청색 포르마잔 염(formazan salt)을 조직으로부터 추출하여 정량적으로 측정한다.

III. 제한점 및 고려사항

본 가이드라인은 UN GHS에 따라 부식성 및 비부식성 물질과 혼합물의 분류를 가능하게 한다. 더 나아가 UN GHS에 따라 부식성 물질 및 혼합물의 범주를 선택적 하위분류 1A와 1B/1C로 하위분류하는 것을 가능하게 한다.

본 시험법은 액체, 반고체, 고체 및 왁스가 포함된 광범위한 화학물질 분류 및 물리적 성상에 적용할 수 있다. 특정 시험물질에 적용할 수 없는 경우, 본 시험 가이드라인은 특정 시험물질에 대해 사용할 수 없다. 또한 본 가이드라인은 혼합물에도 적용 가능한 것으로 추정한다. 그러나 혼합물은 광범위한 범주와 조성을 아우르고, 혼합물에 대한 정보가 매우 제한적이기 때문에 이 가이드라인이 특정 용도에 대해 적용할 수 없는 경우, 특정 혼합물에는 본 가이드라인을 사용해서는 안 된다. 가스와 에어로졸은 검증연구에서 아직 평가가 이루어지지 않았기 때문에 본 가이드라인에서는 허용되지 않는다.

MTT 포르마잔과 같은 과장 영역의 빛을 흡수하거나 MTT를 MTT 포르마잔으로 직접 환원시킬 수 있는 시험물질들은 조직생존을 측정을 간접할 수 있으므로 이를 보정하기 적절한 대조군을 사용해야 한다.

본 가이드라인에서는 피부 자극성과 관련하여 충분한 정보를 제공하지는 않지만, 단회 피부 노출 후 국소적 피부자극을 충분히 평가(full evaluation)하기 위해서는 IATA 지침서 203번을 참고한다.

IV. 시험방법

4.1. RHE 시험법 구성요소

4.1.1. 일반적인 조건

인체피부모델은 상피조직을 재구성하기 위해 비형질전환 인체 각질세포를 사용한다. 각질층은 세포독성 기준물질(cytotoxic benchmark chemicals)(예, Sodium Dodecyl Sulfate, TritonX-100)의 빠른 투과를 견딜 수 있는 견고한 장벽을 포함한 다층구조(기저층, 가시층, 과립층)이어야 한다. 이 장벽은 정해진 노출시간 후 기준물

질이 조직생존율을 50% 감소시키는 농도(IC₅₀) 또는 세포독성 기준물질을 정해진 농도로 투여했을 때 세포생존율을 50%까지 감소시키는 노출시간(ET₅₀)을 측정하여 해당 장벽의 품질을 확인해야 한다. 또한 RhE 모델은 박테리아, 바이러스, 마이코플라스마 또는 곰팡이에 오염되지 않아야 한다.

4.1.2. 기능적인 조건

가. 생존율

조직생존율을 정량화하기 위해 MTT 시험법을 이용한다. RhE 조직 모델의 살아있는 세포는 MTT를 청색 MTT 포르마잔 침전물로 환원시키며, 이 침전물은 조직으로부터 이소프로판올(또는 유사한 용매)을 사용해 추출한다. 추출된 MTT 포르마잔은 표준흡광도(OD) 측정 또는 HPLC/UPLC-분광광도계를 이용하여 정량화할 수 있다. RhE 모델 사용자는 사용하는 RhE 모델의 음성대조군에 대해 정해진 기준을 충족하는지 확인해야 한다. 음성대조군의 OD 값에 대한 허용범위(상한 및 하한선)는 RhE 모델 개발자/공급자가 설정해야 한다. 본 가이드라인에 포함된 5개의 검증된 RhE 시험법에 대한 음성대조군의 OD 값 허용범위는 별첨 1의 표 2를 참조하도록 한다.

나. 장벽 기능

각질층과 지질 조성은 세포독성 기준물질(예, SDS나 Triton X-100)의 빠른 투과를 충분히 견딜 수 있어야 한다.

4.1.3. 형태학

기저층, 가시층, 과립층, 각질층과 인체 표피세포와 유사한 지질 성분을 포함하여 인체 표피와 유사한 다층 구조임을 증명하기 위해 RhE 모델의 조직학적 검사를 수행한다.

4.1.4. 재현성

시험법 사용자는 양성 및 음성대조군을 통해 시험법의 재현성을 증명해야 한다. 또한 부식성 및 비부식성 화학물질에 대해 오랜 시간의 경과에 있어서도 재현성을 보여주는 데이터를 제공한 경우에 한해서 시험법을 사용해야 한다. 하위분류를 위해 시험법을 사용하는 경우, 하위분류에 대한 재현성 또한 입증해야 한다.

4.1.5. 품질관리

개발자/공급자가 각 RhE 모델이 정해진 생산 출하 기준에 적합하다는 것을 증명했을 때만 RhE 조직 모델을 사용할 수 있다. 부식성 분류에 대한 신뢰성 있는 예측을 위해, 품질관리(QC)된 조직에서 생성된 결과만이 인정된다. 본 가이드라인에 포함된 5개의 검증된 RhE 시험법의 품질관리(QC) 기준은 별첨 1의 표 3을 참조하도록 한다.

4.2. 시험물질 및 대조물질 적용

매 노출시간마다 각 시험물질과 대조물질에 대해 최소 2개의 조직 반복시료를 사용해야 한다. 충분한 양의 시험물질로 표피 표면을 균일하게 덮을 수 있도록 처리하는 반면 무제한 용량(infinite dose)으로 처리하는 것은 피한다. 고체 시험물질의 경우 시험물질과 조직 표면사이의 접촉이 용이하도록 조직 표면을 탈이온수 또는 증류수로 축축하게 적시고, 고운 가루 형태로 만들어 실험해야 한다. 노출시간이 끝나면 시험물질을 수용성 완충용액 또는 0.9% 염화나트륨(NaCl) 용액으로 표면을 조심스럽게 세척한다. 수행되는 RhE 시험법과 노출시간에 따라서 노출 배양온도는 상온과 37°C 사이에서 달라질 수 있다(별첨 1의 부록 2 참조).

4.3. 세포생존율 측정

세포생존율을 측정하기 위해 MTT 정량분석법을 사용한다. 조직에 MTT 용액을 넣고 3시간 동안 배양한 뒤 침전된 청색 포르마잔 생성물을 용매를 통해 추출한 다음, 정해진 표준흡광도(OD)나 HPLC/UPLC-분광광도계 절차에 따라 측정된다. 시험물질이 MTT를 직접 환원시키거나 색 간섭에 의해 MTT 시험을 방해하는 경우, 이를 보정하기 위해 비특이적 MTT 환원(non specific MTT, NSMTT) 대조군과 비특이적 색상(non specific color, NSC)대조군과 같은 추가적인 대조군이 사용되어야 한다.

4.4. 결과 해석 및 예측모델

각 시험물질에서 얻은 흡광도(OD) 값은 생존율 100%를 기준으로 하는 음성대조군과 비교하여 생존율을 계산하는데 사용된다. HPLC/UPLC-분광광도계를 사용하는 경우, 조직생존율은 음성대조군에서 동시에 얻은 MTT 포르마잔 피크와 비교하여 시험물질에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 MTT 포르마잔 피크영역(%)으로 계산된다.

시험 결과에 따라 분류가 명확한 경우, 해당 시험물질에 대해 최소 2개의 조직 반복시험으로 구성된 한 번의 시험만으로 충분하다. 하지만 반복된 시험결과가 일치하지 않거나 기준 값의 경계에 해당되는 경우 두 번째 시험을 수행해야 하며, 두 번째 시험 결과가 불일치할 경우 세 번째 시험을 수행해야 한다.

EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE 및 epiCS, LabCyte EPI-MODEL24을 포함한 5개의 피부부식 시험법에 대한 결과해석 및 예측모델은 다음과 같다.

표 1. EpiSkin™ 예측모델

생존율	판정기준
3분 노출 후 < 35%	부식성: ·선택적 하위분류 1A
3분 노출 후 ≥ 35% 그리고 60분 노출 후 < 35% 또는 60분 노출 후 ≥ 35% 그리고 240분 노출 후 < 35%	부식성: ·선택적 하위분류 1B/1C의 조합
240분 노출 후 ≥ 35%	비부식성

표 2. EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS®, LabCyte EPI-MODEL24 SCT 예측모델

생존율				판정기준	
STEP 1	STEP 2				
3분 노출 후 < 50% 또는 3분 노출 후 ≥ 50% 그리고 60분 노출 후 < 15%	EpiDerm™ SCT	3분 노출 후 < 25%		부식성	1A
		3분 노출 후 ≥ 25%			1B/C
	SkinEthic™ RHE	3분 노출 후 < 18%			1A
		3분 노출 후 ≥ 18%			1B/C
	epiCS®, LabCyte EPI-MODEL24	3분 노출 후 < 15%			1A
		3분 노출 후 ≥ 15%			1B/C
3분 노출 후 ≥ 50% 그리고 60분 노출 후 ≥ 15%					비부식성

V. 인정요건

RhE 시험은 다음의 인정요건을 충족해야 한다.

- 1) RhE 모델을 사용하는 각 시험에서 음성대조군을 처리한 조직은 조직의 품질을 반영하는 OD 값(별첨 1의 표 2)을 나타내야 한다.
- 2) 양성대조군으로 처리한 조직은 각 시험법의 조건에 따라 부식성 화학물질에 해당하는 조직생존율을 나타내야 한다.
- 3) 시험물질 및 또는 대조물질에 대한 반복시험에서 조직들 간의 생존율 편차는 유효한 RhE 모델의 필요조건(예; 두 조직 시험간의 생존율 편차가 30%를 넘지 않아야 함)에 맞는 허용범위 안에 있어야 한다.
- 4) 반복시험에서 음성대조군 또는 양성대조군이 허용범위를 벗어난 경우 그 시험은 부적합으로 간주되어 재시험을 해야 한다. 시험물질의 편차가 규정된 범위를 벗어나면 재시험을 수행해야 한다.

VI. 시험결과 및 보고

시험보고서는 다음의 사항을 포함해야 한다.

시험물질과 대조물질

- 단일성분물질: IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드와 같은 화학물질 식별정보, 구조식, 순도, 불순물에 대한 적절하고 실행 가능한 화학물질 정보 등
- 다성분물질, 정확한 화학구조와 분자구조를 알 수 없는 물질(UVCB) 및 혼합물: 화학적 식별에 의한 특성, 구성 성분의 비율과 성분의 물리화학적 특성
- 물리적 성상, 용해도, 부가적으로 관련 물리화학적 특성
- 출처, 시판된 경우 제품번호

- 해당되는 경우, 시험 전 시험물질/대조군 물질의 처리 여부(예, 가열, 분쇄)
- 시험물질의 안정성, 사용기한, 또는 알 수 있다면 재분석 날짜
- 보관조건

사용된 RhE 모델 및 프로토콜(해당되는 경우)

시험조건

- 사용된 RhE 모델(배치 번호 포함)
- 측정 기기의 보정 정보(예; 분광광도계), 파장 및 주파수
- MTT 포르마잔 정량에 사용한 파장 영역(pass)(해당되는 경우), 측정 기기의 직선 범위
- MTT 포르마잔 정량에 사용된 방법에 대한 설명
- HPLC/UPLC-분광광도계의 기능에 대한 설명(해당되는 경우)
- 사용된 특정 RhE 모델(기능 포함)의 상세 배경 정보. 최소한 다음 사항을 포함해야 함
 - i) 생존율
 - ii) 장벽 기능
 - iii) 형태적 특징
 - iv) RhE 모델의 품질관리(QC)
- RhE 모델의 이력 참고 자료. 배치 모델 이력에 근거한 품질관리 데이터 허용기준을 최소한 포함해야 함
- 일반적으로 시험법 사용 전에 숙련도 확인 물질에 대한 평가로 시험법 수행의 숙련도 입증

시험 절차

- 수행한 시험절차의 세부사항(노출 후 세척 과정 포함)
- 수행한 시험물질 및 대조군 물질의 용량
- 노출시간 및 노출 온도
- 직접적인 MTT 환원제 및 또는 유색 시험물질에 사용된 대조군에 대한 설명(해당되는 경우)
- 노출시간마다 시험물질이나 대조군 물질에 사용된 조직시료 수(양성대조군, 음성대조군, NSMTT, NSC_{living}, NSC_{killed})
- 사용된 RhE 모델에 근거하여 모델에 적용한 예측모델 및 판정기준에 대한 설명
- 시험 절차의 변경 사항에 대한 설명(세척 과정 포함)

- 반복실험 및 시험 인정요건
- 양성대조군과 음성대조군의 평균값 및 기존 데이터를 기반으로 허용 가능한 범위
- 양성대조군과 음성대조군에서 조직 반복시험 간의 허용 가능한 편차
- 시험물질의 조직 반복시험 간의 허용 가능한 편차

결과

- 각 시험물질 및 대조군, 각 노출기간, 각 반복실험, 각 시험의 측정값(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, 조직생존율, 평균 조직생존율, 조직 반복시험간의 표준 편차 또는 CV)에 관한 데이터의 도표화(해당되는 경우)
- 해당되는 경우, 직접적인 MTT 환원제 및 또는 유색 시험물질에 사용된 대조군들의 결과(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, 조직 반복시험 간의 편차 또는 표준편차 포함)와 최종적으로 보정된 조직생존율(%)
- 정해진 시험 회차 및 시험물질과 대조군 물질로부터 얻어진 허용기준에 대한 결과
- 관찰된 기타 결과에 대한 설명
- 사용된 예측모델과 판정기준에 근거한 분류

결과에 대한 고찰

결론

별첨 1. 번역본(OECD TG 431)

생체외 피부부식성 : 인체피부모델을 이용한 피부부식 시험법

In vitro Skin Corrosion : Reconstructed Human Epidermis(RhE) Test Method

개요

1. UN의 화학물질 분류 및 표시에 관한 국제조화 시스템(Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals, GHS)⁽¹⁾에서 정의된 바에 따르면 피부부식이란 시험물질을 적용한 후 육안으로 관찰 가능한 피부괴사가 표피층과 진피층에 걸쳐 나타나는 비가역적 피부손상을 말한다. 이번에 개정된 시험 가이드라인(Test Guideline, TG) 431은 UN GHS⁽¹⁾에 따라 비부식성·부식성 물질 및 혼합물을 분류하는 생체외(*in vitro*) 시험법에 대해 설명한다. 이 시험법은 또한 부분적으로 부식성 하위분류를 가능하게 한다.

2. 일반적으로 화학물질의 피부부식성 평가에는 실험동물을 사용해왔다(OECD TG 404는 1981년 채택, 1992년, 2002년 그리고 2015년에 개정됨)⁽²⁾. 본 시험법 외에 화학물질의 부식 가능성의 평가는 2개의 검증된 생체외(*in vitro*) 시험법이 OECD TG 430⁽³⁾, TG 435⁽⁴⁾로 채택되었고 또한 피부자극 평가를 위해서는 생체외(*in vitro*) OECD TG 439⁽⁵⁾가 채택되었다. 피부부식 및 자극에 관한 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)문서는 정보출처와 분석기법을 분류하는 여러 가지 모듈에 대해 기술하며, i) 화학물질의 피부자극 및 피부부식성 평가를 위한 기존의 시험과 비시험 데이터를 통합 활용하는 방안과 ii) 시험이 추가로 필요시 접근법에 대한 지침을 제공한다⁽⁶⁾.

3. 본 시험 가이드라인은 인체건강 평가항목인 피부부식에 대해 설명하며, 인체 피부의 상부인 표피의 조직학적, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성과 매우 유사하게 재현하여 제작된 인체피부모델(Reconstructed human Epidermis, RhE)(인체 유래 비형질전환 표피 각질세포로부터 얻음)을 사용한다. 이 가이드라인은 2004년에 처음 채택되었으며, RhE 모델을 사용하는 추가 시험법을 포함하여 2013년, 2016년, 2019년에 개정되었다. 또한 부식성 화학물질의 하위분류를 가능하게 하는 시험법의 활용 가능성과 생존율의 측정을 위한 대체방법의 활용을 도입하고, IATA 가이드스 문서를 참조하여 2015년에 개정되었다.

4. 본 시험 가이드라인에는 시판되는 RhE 모델들을 사용하는 5개의 검증된 시험법을 포함하고 있다. 2개의 시험법인 EpiSkinTM 표준모델(Standard Model, SM)과 EpiDermTM 피부부식 시험법(Skin Corrosivity Test, SCT)(EPI -200)은 사전 검증연구 후⁽⁷⁾ 피부부식성 평가를 위한 검증연구⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾가 수행되었다⁽¹¹⁾⁽¹²⁾(검증된 참고 시험법(Validated Reference Methods, VRM), EpiSkinTM=VRM1, EpiDermTM=VRM2로 지칭). 이 연구 결과는 위에서 언급한 2개의 검증된 참고 시험법(VRM)을 부식성(Corrosive, C)과 비부식성(Non-Corrosive, NC)으로 분류하는 규제 목적으로 사용할 수 있으며, 더욱이 EpiSkinTM은 부식성 물질의 하위분류에 사용할 수 있음을 보여준다⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾. 유사시험법평가기준(Performance Standards, PS) 기반 검증연구에 따르면⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾, 시판되는 다른 2개의 생체외(*in vitro*) 피부부식 RhE 시험법(SkinEthicTM RHE, epiCS[®])은 EpiDermTM VRM2와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 SkinEthicTM RHE와 epiCS[®](이전의 EST-1000)도 부식성 물질과 비부식성 물질을 분류하기 위한 규제 목적으로 사용될 수 있다⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾. 모델 제조사들이 수행한 사후 검증연구(2012~2014년)에서는 비특이적 MTT 환원의 간섭을 보정한 프로토콜을 사용하여 부식성/비부식성 분류뿐만 아니라, 부식성 물질의 하위분류에 대한 판별 수준을 개선하였다⁽²¹⁾⁽²²⁾. 하위분류에 대한 예측력을 높일 수 있는 대체 예측모델(alternative predictions models)을 찾기 위하여 EpiDermTMSCT, SkinEthicTM RHE 및 epiCS[®]로 수행한 사후 검증 데이터의 추가적인 통계 분석을 수행하였다⁽²³⁾. 마지막으로 LabCyte EPI-MODEL24는 시중에서 구매가 가능한 또 하나의 생체외(*in vitro*) 피부부식 RhE 시험법으로, VRM과 과학적으로 유사하다. 따라서 부식성 물질과 비부식성 물질을 분류할 수 있으며, 부식성의 하위분류를 가능하게 하는 규제 목적으로 사용할 수 있다⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾.

5. 규제 목적으로 피부부식성을 평가하기 위해 검증된 참고 시험법(VRM) 외에 유사 또는 변경된 생체외(*in vitro*) RhE 시험법을 사용하려면 우선 OECD 가이드라인 문서 34번⁽²⁵⁾의 원칙에 의해 유사시험법평가기준(Performance Standards, PS)⁽²⁴⁾에서 제시된 요건에 따라 시험을 수행하여 제안된 시험법들의 신뢰성, 상관성(정확성) 및 제한점을 파악해야 한다. 새롭게 제안되거나 개정된 시험법은 유사시험법평가기준(PS)에 따라 검토된 후, 이 가이드라인에 포함된 경우에만 데이터 상호인정(Mutual Acceptance of Data, MAD)이 보장된다. 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법은 피부 부식에 대한 생체외(*in vitro*) 시험법의 시험결과를 각 국가의 요구사항에 맞게 설명하기 위해 사용할 수 있으며, 이는 데이터 상호인정의 장점이 있다.

6. 본 가이드라인에 사용된 용어의 정의는 부록 1에서 제공된다.

초기 고려사항

7. 본 시험 가이드라인은 UN GHS⁽¹⁾에 따라 부식성과 비부식성 물질 및 혼합물의 분류를 가능하게 한다. 더 나아가 본 시험 가이드라인은 UN GHS⁽¹⁾에 따라 부식성 물질 및 혼합물의 범주를 선택적 하위분류(optional sub-category) 1A와 1B/1C로 하위분류하는 것을 가능하게 한다⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾. 이 시험 가이드라인의 제한점은 UN GHS⁽¹⁾에 따라 피부부식성 하위분류 1B와 1C를 구별할 수 없다는 것이고, 이는 생체내(*in vivo*) 부식성 하위분류 1C의 화학물질들이 잘 알려져 있지 않기 때문이다. 본 시험 가이드라인에 따른 5개의 시험법을 통해 하위분류 1A, 1B/1C, NC로 구별할 수 있다.

8. 주요한 각 물질들을 대표하는 광범위한 물질들이 본 시험 가이드라인의 시험법에 검증연구에서 테스트되었다. 부식성과 비부식성을 확인하기 위해 수행된 검증연구에서 원래 데이터베이스는 다양한 화학물질을 아우르는 60개의 화학물질이 포함된다⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾. 또한 하위분류를 위한 시험의 민감도, 특이도, 정확도 및 실험실 내 재현성을 입증하는 시험은 시험법 개발자에 의해 광범위한 화학물질을 포함한 79개 내지 80개의 화학물질로 수행되었으며, 그 결과들은 OECD에 의해 검토되었다⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾. 알려진 전체 데이터로 볼 때 본 시험 가이드라인은 액체, 반고체, 고체 및 왁스가 포함된 광범위한 화학물질 분류 및 물리적 성상에 적용할 수 있다. 액체는 수용성이거나 비수용성일 수 있고, 고체는 물에 용해 또는 비용해성일 수 있다. 가능한 경우, 고체는 시험 전에 갈아서 고운 가루로 만들어 사용하고 샘플에 다른 전처리는 필요하지 않다.

특정 시험물질이 본 시험법 가이드라인에서 적용할 수 없음이 입증되는 경우, 이 시험 가이드라인은 특정시험물질에 대해 사용해서는 안 된다. 또한 본 시험 가이드라인은 물질에 대한 적용성을 확장하여 혼합물에도 적용 가능한 것으로 추정한다. 그러나 혼합물은 광범위한 범주와 조성을 아우르고, 혼합물의 시험에 대한 정보가 제한적이기 때문에 가이드라인의 특정 용도에 대해 적용할 수 없음이 입증된 경우(참고문헌(26)에서 제안된 전략에 따른), 그 시험물질 분류의 혼합물에는 본 시험 가이드라인을 사용해서는 안 된다. 혼합물, 시험이 어려운 화학물질(예; 불안정) 또는 본 가이드라인에 기술된 적용 범위 내에 확실히 해당되지 않는 화학물질의 시험을 고려할 때, 그러한 시험물질의 결과가 과학적으로 의미 있는 결과를 줄 수 있을지를 미리 고려해야 한다. 혼합물 시험에 대한 규제 요구사항이 있을 때는 그러한 고려는 필요하지 않다. 가스와 에어로졸은 검증연구에서 아직 평가되지 않았다⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾. RhE 시험법을 사용하여 가스와 에어로졸을 시험해볼 수는 있지만 본 시험 가이드라인에서는 허용하지 않는다.

9. MTT 포르마잔과 같은 파장 영역의 빛을 흡수하는 시험물질이나 MTT를 MTT 포르마잔으로 직접 환원시킬 수 있는 시험물질들은 조직생존율 측정을 간접할 수 있어, 보정을 위해 적절한 대조군을 사용해야 한다. 이때 적절한 대조군 시험물질에 의한 간섭의 종류와 MTT 포르마잔(제 25~31항 참조)을 정량하는 방법에 따라 달라질 수 있다.

10. 본 시험 가이드라인은 피부자극에 대해 충분한 정보를 제공하고 있지는 않지만, OECD TG 439에서 건강영향(health effect)에 미치는 생체외(*in vitro*) 피부자극을 구체적으로 다루며, 동일한 RhE 시험 시스템을 기반으로 한다(단, 프로토콜은 상이함)⁽⁵⁾. 단회 피부 노출 후 국소적 피부자극을 충분히 평가하기 위해서는 IATA(Integrated Approach to Testing and Assessment) 가이드선스 문서 203번을 참고한다⁽⁶⁾. 이러한 IATA 접근법은 동물시험을 고려하기 전에 피부부식과 피부자극에 대한 생체외(*in vitro*) 시험 수행을 포함하고 있다. 인체 피부의 사용은 국가 및 국제적인 윤리 고려사항과 여건에 따라야 한다.

시험원리

11. 시험물질은 비형질전환 인체유래표피 각질세포로 구성된 3차원 인체피부모델

에 국소적으로 적용된다. RhE 모델은 조직화된 기저층(basal layers), 가시층(spinous layers), 과립층(granular layers) 및 체내에 분포하는 지방 중 주요 지질층(lipid class)인 세포간 판상형 지질층(lamellar lipid layer)을 포함하는 다층의 각질층으로 구성된다.

12. RhE 시험법은 부식성 화학물질이 확산이나 침식에 의해 각질층을 투과할 수 있으며, 그 하부층 세포에 세포독성을 나타낸다는 전제를 기반으로 한다. 세포생존율은 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 - diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS number 298-93-1]가 효소반응에 의해 변환된 청색 포르마잔 염을 조직으로부터 추출하여 정량적으로 측정한다⁽²⁷⁾. 부식성 물질은 규정한 기준치 이하로 세포생존율을 감소시키는 것을 통해 확인한다(제 35항, 36항 참조). RhE 기반 피부부식 시험법은 OECD 가이드라인 404에 따라 토끼를 이용한 생체내(*in vivo*) 피부부식성을 예측하는 것으로 나타났다⁽²⁾.

숙련도 입증

13. 본 시험 가이드라인을 준수하는 5개의 검증된 RhE 시험법을 일반적으로 사용하기 전에 실험실은 표 1에 제시된 12개의 숙련도 물질을 정확하게 분류하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 하위분류를 위한 시험법으로 사용하는 경우에도 정확한 하위분류가 입증되어야 한다. 목록에 제시된 물질을 이용할 수 없거나 정당한 사유가 있는 경우 적절한 생체내(*in vivo*)와 생체외(*in vitro*) 참고 데이터를 가지고 있는 다른 물질을 이용할 수 있다(예, 참고 화학물질의 목록⁽²⁴⁾). 단 표 1에 기술된 것과 동일한 선정기준을 적용해야 한다.

14. 숙련도 시험의 일부 과정으로서, 사용자는 조직 수령 후 RhE 모델 제조사로부터 제공된 정보대로 조직의 장벽 특성을 확인해야 한다. 조직이 장거리/장시간에 걸쳐 배송되는 경우, 이 절차는 더욱 중요하다. 시험법이 성공적으로 확립되고 숙련도가 입증된 경우, 이러한 검증 절차를 일상적으로 실시할 필요는 없다. 그러나 시험을 일반적으로 하는 경우, 장벽 특성에 대한 평가를 주기적으로 지속할 것을 권장한다.

시험절차

15. 다음은 본 시험 가이드라인에서 적용되는 피부부식성 평가를 위한 RhE 시험법의 구성요소와 절차에 대한 일반적인 설명이다. 본 시험 가이드라인에서 과학적으로 검증된 RhE 모델(EpiSkin™(SM), EpiDerm™(EPI-200), SkinEthic™ RHE 및 epiCS®, LabCyte EPI-MODEL24)은 시중에서 구입 가능하다⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾⁽³²⁾⁽³³⁾⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾. 이 5개의 RhE 모델에 대한 표준작업지침서(SOPs)는 공개되어 있으며⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽⁴²⁾, 시험법의 주요 구성요소는 부록 2에 요약되어 있다. 이 시험법을 사용 시, 해당 SOP를 참조할 것을 권장하고 다음의 사항을 준수해야 한다.

표 1. 숙련도 물질 목록¹

물질	CASRN	화학물질 분류 ²	<i>In vivo</i> 결과에 근거한 UN GHS Cat. ³	<i>In vitro</i> 결과에 근거로 Cat. ⁴	VRM의 평균 세포생존율				물리적 성상
					VRM1		VRM2		
					3분	60분	3분	60분	
하위분류 1A <i>In Vivo</i> 부식성									
Bromoacetic acid	79-08-3	유기산	1A	(3) 1A	3	2.8	3.2	2.8	고체
Boron trifluoride dihydrate	13319-75-0	무기산	1A	(3) 1A	2.4	4.2	4.4	10.1	액체
Phenol	108-95-2	페놀	1A	(3) 1A	29.8	21.8	22.6	13.5	고체
Dichloroacetyl chloride	79-36-7	친전자체	1A	(3) 1A	5.6	6.3	1.3	1.4	액체
하위분류 1B/1C의 조합 <i>In Vivo</i> 부식성									
Glyoxylic acid monohydrate	563-96-2	유기산	1B와 1C	(3) 1B와 1C	110.4	22.5	90.4	3.1	고체
Lactic acid	598-82-3	유기산	1B와 1C	(3) 1B와 1C	80.2	9.4	90	3.5	액체
Ethanolamine	141-43-5	유기염기	1B	(3) 1B와 1C	66.2	40.3	69.7	9.3	점성
Hydrochloric acid (14.4%)	7647-01-0	무기산	1B와 1C	(3) 1B와 1C	69.3	5.7	80.8	9	액체
<i>In Vivo</i> 부식성									
Phenethyl bromide	103-63-9	친전자체	NC	(3) NC	141	117.2	112.5	71.2	액체
4-Amino-1,2,4-triazole	584-13-4	유기염기	NC	(3) NC	116.8	120.6	105.7	88.2	고체
4-(methylthio)-benzaldehyde	3446-89-7	친전자체	NC	(3) NC	136.7	150.4	85.4	81.6	액체
Lauric acid	143-07-7	유기산	NC	(3) NC	102	117.4	90.7	64.6	고체

약어 : CASRN(Chemical Abstracts Service Registry Number) : 화학초록서비스등록번호; UN

GHS(United Nations Globally Harmonized System⁽¹⁾) : 화학물질 분류·표시 국제조화시스템;
VRM(Validated Reference Method) : 검증된 참고 시험법; NC(Not Corrosive) : 비부식성

¹ 숙련도 물질은 부식성과 비부식성 물질로 구분하고, 그 다음 부식성 물질의 하위분류로 분류한 뒤, 화학적 분류에 의해 분류된 숙련도 물질은 EpiSkinTM과 EpiDerm^{TM(8)(9)(10)}의 ECVAM 검증 연구 및 EpiSkin^{TM(22)}, EpiDermTM, SkinEthicTM 및 epiCS[®] 개발자가 제공한 데이터를 기반으로 한 사후 검증연구에서 이용된 물질들 가운데 선정되었다⁽²³⁾. 별도의 표시가 없는 경우, 판매되는 물질의 순도에서 평가되었다⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾. 가능한 범위에서 선정된 물질들은 (i) VRM(Validated Reference Method)으로 측정이나 예측이 가능한 부식성 반응의 범위를 나타내며 (예, 비부식성; 강한 부식성 물질); (ii) 검증 연구에서 사용된 화학 물질의 그룹을 나타내고; (iii) 화학 구조가 명확하며; (iv) 검증된 참고 시험법(VRM)의 수행 특성을 반영하며; (v) *in vivo* 참고 시험법에서 명확한 결과를 가지고 있으며; (vi) 시중에서 구매가능하고; (vii) 처리비용이 많이 들지 않는다.

² Barratt 등이 지정한 화학물질 분류⁽⁸⁾.

³ UN GHS 1A, 1B, 1C에 각각 상응하는 UN 포장분류 등급은 I, II, III이다.

⁴ 이 표에 보고된 VRM *in vitro* 예측 결과는 시험법 개발자가 수행한 사후 검증 시험 중에 EpiSkinTM 및 EpiDermTM 시험법(VRMs)에서 도출되었다.

⁵ ECVAM 피부부식 검증연구에서 얻은 생존율은 직접적인 MTT 환원에 대해서는 보정되지 않았다(죽은 대조군에 대한 검증연구는 수행하지 않았음). 그러나 이 표에 제시된 시험법 개발자가 산출한 사후 검증 데이터는 적절한 대조군⁽²³⁾에서 얻었다.

RHE 시험법 구성 요소

일반적인 조건

16. 인체피부모델은 상피조직을 재구성하기 위해 비형질전환 인체 각질세포를 사용한다. 살아있는 상피 세포의 여러 층(기저층, 가시층, 과립층)이 기능을 유지하고 있는 각질층 아래 있어야 한다. 각질층은 황산 도데실 나트륨(SDS) 또는 Triton X-100을 비롯한 세포독성 기준물질의 빠른 투과를 견딜 수 있는 견고한 기능적 장벽을 생성하기 위해 필요한 필수 지질성분이 포함된 다층구조이어야 한다. 이 장벽 기능은 정해진 노출시간 후 기준 화학물질이 조직생존율을 50%로 감소시키는 농도(IC₅₀) 또는 세포독성 기준물질을 정해진 농도로 투여했을 때 세포생존율을 50%까지 감소시키는 노출시간(ET₅₀)을 측정하여 해당 장벽의 품질을 확인해야 한다(제 18항 참조). RhE 모델의 차단(containment) 특성은 각질층 주위 물질이 살아있는 조직으로 투과되는 것을 막아주며 그렇지 않은 경우, 피부 노출 모델로 적합하지 않을 수 있다. RhE 모델은 박테리아, 바이러스, 마이코플라스마 또는 곰팡이에 오염되지 않아야 한다.

기능적인 조건

생존율(Viability)

17. 조직생존율은 정량화하기 위해 MTT 시험법을 이용한다⁽²⁷⁾. RhE 조직 모델

의 살아있는 세포들은 MTT를 청색 MTT 포르마잔 침전물로 환원시키며, 이 침전물은 조직으로부터 이소프로판올(또는 유사한 용매)을 이용하여 추출한다. 추출 용매의 흡광도 값은 충분히 작아야 한다(예, OD < 0.1). 추출된 MTT 포르마잔은 표준흡광도(OD) 측정 또는 HPLC/UPLC-분광광도계를 이용하여 정량화 할 수 있다⁽³⁸⁾. RhE 모델 사용자는 사용하는 RhE 모델의 배치가 음성대조군의 정해진 기준을 충족하는지 확인해야 한다. 음성대조군 OD 값에 대한 허용범위(상한 및 하한)는 RhE 모델 개발자/공급자가 설정해야 한다. 표 2에 본 시험 가이드라인에 포함된 5개의 검증된 RhE 시험법에 대한 음성대조군의 OD 값 허용범위를 제시하고 있다. HPLC/UPLC-분광광도계 사용자는 표 2에서 제시된 음성대조군 OD 범위를 음성 대조군의 허용 기준으로 사용해야 한다. 음성대조군 처리 조직은 유사한 측정값을 측정하여 노출시간 동안 안정적으로 배양된 것을 확인해야 한다.

표 2. 배치 품질을 대조하기 위한 음성대조군 OD 값의 허용범위

	허용 하한선	허용 상한선
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
epiCS	≥ 0.8	≤ 2.8
LabCyte EPI-MODEL24 SCT	≥ 0.7	≤ 2.5

장벽 기능(Barrier function)

18. 각질층과 지질 조성은 세포독성 기준물질(예 : SDS 또는 Triton X-100)의 빠른 투과를 충분히 견딜 수 있어야 한다. 사용된 RhE 모델의 배치별 장벽 기능은 RhE 조직 모델 개발자/판매자가 최종 사용자에게 조직 공급 시 확인해야 한다(제 21항 참조).

형태학(Morphology)

19. 기저층, 가시층, 과립층, 각질층과 인체 표피세포와 유사한 지질 성분을 포함하는 다층 구조임을 증명하기 위해 RhE 모델의 조직학적 검사를 수행한다. 최종 사용자에게 조직 공급 시 조직형태의 적합성을 확인하는데 사용된 RhE 모델의 결과(histological examination)는 RhE 모델의 개발자/판매자에게 같이 제공되어야 한다(제

21항 참조).

재현성(Reproducibility)

20. 시험법 사용자는 시간 경과에 따른 시험법의 재현성을 양성 및 음성대조군을 통해 증명해야 한다. 또한 RhE 모델 개발자/판매자가 숙련도 물질 목록(표 1)의 부식성 및 비부식성 화학물질에 대해 오랜 시간의 경과에 있어서도 재현성을 보여주는 데이터를 제공한 경우에 한해서 시험법을 사용해야 한다. 하위분류를 위해 시험법을 사용하는 경우, 하위분류에 대한 재현성도 입증되어야 한다.

품질관리(Quality Control, QC)

21. 개발자/판매자가 각 RhE 모델이 정해진 생산 출하 기준에 적합하다는 것을 증명했을 때만 RhE 모델을 사용할 수 있다. 이 기준은 생존율(제 17항), 장벽 기능(제 18항), 재현성(제 19항)과 가장 관련된다. 이러한 데이터들은 시험법 사용자에게 제공되어야 하며, 이 데이터를 시험 보고서에 포함시킬 수 있다. 부식성 분류에 대한 신뢰성 있는 예측을 위해, 품질관리(QC)된 조직에서 생성된 결과만이 인정된다. IC₅₀ 또는 ET₅₀의 허용범위(상한 및 하한선)는 RhE 모델 개발자/판매자에 의해 설정된다. 검증된 5개의 시험법에 대한 허용범위는 표 3에서 제시하고 있다.

표 3. 품질관리(QC) 기준

	허용 하한선	허용 상한선
EpiSkin™ (SM) (18시간 동안 SDS 처리) ⁽³³⁾	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (1% Triton X-100) ⁽³⁴⁾	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 8.7 hours
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) ⁽³⁵⁾	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 10.0 hours
epiCS (1% Triton X-100) ⁽³⁶⁾	ET ₅₀ = 2.0 hours	ET ₅₀ = 7.0 hours
LabCyte EPI-MODEL24 SCT (18시간 동안 SDS 처리) ⁽⁴²⁾	IC ₅₀ = 1.4 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL

시험물질 및 대조물질의 적용

22. 매 노출시간마다 각 시험물질과 대조물질에 대해 최소 2개의 조직 반복시료를 사용해야 한다. 액체 및 고체 시험물질의 경우, 충분한 양의 시험물질로 표피 표면을 균일하게 덮을 수 있도록 처리해야 하는 반면 무제한 용량(infinite dose)으로 처리하는 것을 피한다(최소 $70 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 또는 $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$). 시험법에 따라 고체 시험물질을 도포하기 전에 시험물질과 조직 표면사이의 접촉이 용이하도록 조직 표면을 탈이온수 또는 증류수로 축축하게 적신다⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽⁴²⁾. 가능한 경우, 고체 시험물질은 갈아서 고운 가루로 만들어 실험해야 한다. 적용 방법은 시험물질에 적합해야 한다(제 34~37항 참조). 노출시간이 끝나면 시험물질을 수용성 완충용액 또는 0.9% 염화나트륨(NaCl) 용액으로 조직 표면을 조심스럽게 세척한다. 검증된 5개의 RhE 시험법 중 어떤 시험법을 사용하는지에 따라 시험물질 당 두 번 또는 세 번의 노출시간이 적용된다(유효한 RhE 모델 5개 모두: 3분에서 1시간; EpiSkin™의 경우 4시간 추가 노출시간). 사용되는 RhE 시험법과 노출시간에 따라서 노출 배양온도는 상온과 37°C 사이에서 달라질 수 있다.

23. 매 실험마다 조직의 생존율(음성대조군), 장벽 기능, 조직 민감도(양성대조군)가 기존에 정해진 허용 범위 내에 있는 것을 입증하기 위해 음성대조군과 양성대조군을 동시에 사용해야 한다. 제안하는 양성대조군 물질은 RhE 모델에 따라 빙초산 또는 8N 수산화칼륨(KOH)이다. 8N 수산화칼륨(KOH)은 직접적인 MTT 환원제로서 제 25항과 26항에 기술된 바와 같이 적합한 대조군을 필요로 할 수 있다는 것에 유의해야 한다. 제안된 음성대조군은 0.9%(w/v) 염화나트륨(NaCl) 또는 물이다.

세포생존율 측정

24. 본 시험 가이드라인에서 세포생존율을 위해 MTT 시험법(정량분석)을 이용해야 한다⁽²⁷⁾. 모델 조직을 적절한 농도(0.3 0.5 또는 1 mg/mL, 상세내용은 부록 2와 관련 SOP 참조)의 MTT 용액에 3시간 동안 처리한다. 그리고 나서 침전된 청색 포르마잔 생성물은 적절한 용매(예; 이소프로판올, 산성 이소프로판올)를 이용하여 조직으로부터 추출되며, 이 포르마잔의 농도는 최대 570 nm \pm 30 nm의 밴드 패스(band pass)를 가지는 필터 파장에서 표준흡광도(OD)나 HPLC/UPLC-분광광도계 절차에 따라 측정된다(제 30항, 31항 참조)⁽³⁸⁾.

25. 시험물질이 MTT를 청색 포르마잔으로 직접 환원시키거나, 자연적 또는 물질 처리 과정에 의해 MTT 포르마잔과 동일한 OD 범위(570 \pm 30 nm 주로 청색과 자색

시험물질)에서 빛을 흡수할 경우 색 간섭을 일으켜 MTT 측정을 간섭할 수 있다. 시험물질로부터 잠재적 간섭을 감지하고 보정하기 위해 비특이적 MTT 환원(non-specific MTT reduction, NSMTT)대조군과 비특이적 색상(non-specific colour, NSC)대조군(제 26~30항 참조)과 같은 추가적인 대조군이 사용되어야 한다. 이는 시험물질이 세척 과정에서 완전히 제거되지 않거나, 표피를 투과한 경우 MTT 생존을 시험 수행 시 조직 내에 남아있을 때 특히 중요하다. 착색제에 의한 직접적인 MTT 환원 및 색 간섭을 보정하는 방법에 대한 자세한 설명은 해당 시험법⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽⁴²⁾의 표준작업지침서(SOP)에 기술되어 있다.

26. 시험물질이 직접적인 MTT 환원제인지 확인하기 위해 새로 준비한 MTT 용액에 각 시험물질을 넣어야 한다⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽⁴²⁾. 시험물질을 넣은 MTT 혼합물이 청색/자색으로 변하는 경우 시험물질이 직접적으로 MTT를 환원시키는 것으로 추정하고, 더 나아가 표준 흡광도(OD) 측정 또는 HPLC/UPLC-분광광도계를 이용하여 비생존 표피(non-viable epidermis)에 대한 기능적 확인이 이루어져야 한다. 이 추가 기능적 확인은 죽은 조직을 사용하며, 이 조직은 매우 낮은 대사 활성도를 가지고 있지만 살아있는 조직과 비슷한 양의 시험물질을 흡수한다. 각 MTT 환원 시험물질은 죽은 조직으로 매 노출시간마다 최소 2개의 반복시료에 적용하고 전체 피부부식 시험 과정을 거친다. 순수 조직생존율(true tissue viability)은 MTT 환원제에 노출된 살아있는 조직으로부터 얻은 조직생존율에서, 죽은 조직에 동일한 MTT 환원제에 노출시킨 후 얻은 비특이적 MTT 환원율을 뺀 값으로 계산되며 동시에 음성대조군과 비교하여 계산하였다.

(즉, 순수 조직생존율 = %Viability - %NSMTT)

27. 물 또는 이소프로판올과 접촉했을 때 착색되는 시험물질 또는 유색 시험물질에 의한 잠재적 간섭을 확인하고 추가적인 대조군의 필요성을 결정하기 위해, 물(노출 환경) 및/또는 이소프로판올(추출 용매)에서 시험물질의 스펙트럼 분석을 실시해야 한다. 물 및/또는 이소프로판올에서 시험물질이 570±30 nm 범위의 빛을 흡수하면 착색제 대조군(colorant control)을 추가적으로 사용해야 하고, 이러한 대조군을 필요로 하지 않는 경우 HPLC/UPLC-분광광도계 측정법을 사용해야 한다(제 30항과 31항 참조). 표준 흡광도(OD)를 측정하는데 있어서 간섭을 일으키는 시험물질은 매 노출시간마다 최소 2개의 살아있는 반복시료에 적용하고, 비특이적 색상 대조군(NSC_{living})을 만들기 위해 MTT 배양 단계에서 조직에 MTT 용액 대신 배지로 처리하고 전체 피부부식 시험 과정을 거친다. 살아있는 조직의 내재적 생물학적 변이성 때문에 유색 시험물질에서 매번 노출시간(각 실험)마다 NSC_{living} 대조군을 사용하여 동시에 실험하는 것이

필요하다. 순수 조직생존율은 간섭을 일으키는 시험물질에 노출시킨 조직을 MTT 용액으로 배양하여 얻은 조직생존율에서, 동일한 시험물질을 조직에 노출시킨 후 MTT 용액 대신 배지로 배양하여 얻은 비특이적 색상 대조군의 조직생존율(%NSC_{living})을 빼서 계산한다.

(즉, 순수 조직생존율 = %Viability - %NSC_{living})

28. 직접적인 MTT 환원과 색 간섭(제 27항 참조)을 동시에 유발하는 것으로 확인된 시험물질은 이전에 서술된 NSMTT 및 NSC_{living} 대조군과 별도로 표준흡광도(OD) 측정 시 세 번째 대조군을 필요로 한다. 이는 MTT 시험을 간섭하는 어두운 색(예, 청색, 자색, 흑색)의 시험물질을 사용한 경우로, 26항에서 기술한 바와 같이 시험물질의 본연의 색이 MTT를 직접적으로 환원시키는 능력에 대한 평가를 방해하기 때문이다. 이 시험물질은 살아있는 조직과 죽은 조직 모두에 결합할 수 있으므로 NSMTT 대조군은 시험물질에 의한 직접적인 MTT 환원성 뿐만 아니라 죽은 조직에 남아있는 시험물질에서 발생하는 색 간섭도 보정해준다. 이로 인해 NSC_{living} 대조군이 시험물질이 살아있는 조직과 결합하여 발생하는 색 간섭을 이미 보정하기 때문에 색 간섭에 대한 이중 보정이 발생할 수 있다. 색 간섭에 대한 이중 보정을 피하기 위해 죽은 조직의 비특이적 색상(NSC_{killed})에 대한 세 번째 대조군이 필요하다. 이 추가 대조군에는 시험물질을 노출마다 최소한 2개의 죽은 조직에 적용하고 MTT 배양 단계에서 MTT 용액 대신 배지로 배양되는 것 외에 동일한 시험절차를 거친다. 수행되는 각 시험 횟수와는 상관없이 시험물질 당 하나로 NSC_{killed} 대조군은 충분하지만 가능하면 동일한 조직(the same batch)을 사용하여 NSMTT 대조군과 동시에 수행하여야 한다. 그리고 나서, 순수 조직생존율은 시험물질에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 조직생존율(%Viability)에서 %NSMTT와 %NSC_{living} 값을 빼주고, 죽은 조직에 간섭을 일으키는 시험물질을 노출시킨 후 배지로 배양하여 얻은 %NSC_{killed} 값을 더하여 계산한다.

(즉, 순수 조직생존율 = %Viability - %NSMTT - %NSC_{living} + %NSC_{killed})

29. 비특이적 MTT 환원과 비특이적 색 간섭은 조직 추출물의 관독 값을 분광광도계의 직선 범위 이상으로 증가시킬 수 있다는 점에 유의해야 한다. 따라서 규제 목적으로 시험물질에 대한 시험을 수행하기 전, 실험실에서는 시중에서 구입 가능한 MTT 포르마잔(CAS #57360-69-7)을 사용하여 분광광도계의 직선 범위를 정해야 한다. 특히 분광광도계를 사용하는 표준 흡광도(OD) 측정은 직접적인 MTT 환원제 및 또는 색 간섭물질에 대한 보정 없이 시험물질로부터 얻은 조직 추출물의 OD 값이 분광광도계의 직선 범위 내에 있거나, 시험물질로 얻은 보정되지 않은 생존율(%)이 이미 부식성으로 정의된 경우에는 직접적인 MTT 환원제 및 색 간섭 시험물질을 평가하는데 적

합하다(제 35항과 36항 참조). 그럼에도 불구하고 NSMTT 및 또는 NSC_{living}을 생성하는 시험물질에 대한 결과는 신중하게 검토해야 한다.

30. MTT 시험에서 매우 강한 색 간섭으로 인해 표준 흡광도(OD) 측정에 적합하지 않는 유색(coloured) 시험물질의 경우, MTT 포르마잔을 측정하는 HPLC/UPLC-분광광도계를 대신 사용할 수 있다(제 31항 참조)⁽³⁷⁾. HPLC/UPLC-분광광도계 시스템은 정량적 측정 전에 MTT 포르마잔을 시험물질로부터 분리해준다⁽³⁸⁾. 이러한 이유로 시험물질과 상관없이 HPLC/UPLC-분광광도계 사용 시에는 NSC_{living} 또는 NSC_{killed}의 대조군이 전혀 필요하지 않다. 그러나 시험물질이 MTT를 직접 환원시키는 것으로 판단되거나 MTT를 직접 환원시키는 능력의 평가를 방해하는 색상을 띠는 경우(제 26항 참조), NSMTT 대조군을 사용해야 한다. MTT 포르마잔을 측정하는 HPLC/UPLC-분광광도계를 사용하는 경우, 조직생존율은 음성대조군의 MTT 포르마잔 피크와 비교하여 시험물질에 노출된 살아있는 조직 MTT 포르마잔 피크영역(%)으로 계산된다. MTT를 직접 환원시킬 수 있는 시험물질의 경우, 순수 조직생존율은 시험물질에 노출된 살아있는 조직생존율에서 % NSMTT를 뺀 값으로 계산된다. 마지막으로 색 간섭을 일으킬 수 있는 직접적인 MTT 환원제는 처리 후 조직에 남아있는 MTT를 너무 강하게 환원시켜 OD(표준 OD 측정법 사용시) 또는 피크영역(HPLC/UPLC-분광광도계 사용 시)이 직선 범위를 벗어나게 하므로 이러한 조직 추출물은 평가할 수 없으며, 이 경우는 매우 드물게 발생한다.

31. HPLC/UPLC-분광광도계는 모든 종류의 시험물질(유색, 무색, MTT 환원제, MTT 비환원제)에 대한 MTT 포르마잔 측정에 사용될 수 있다⁽³⁸⁾. HPLC/UPLC-분광광도계 시스템이 다양하기 때문에 HPLC/UPLC-분광광도계 시스템은 사용하기 전에 조직 추출물에서 MTT 포르마잔을 정량화하기 위한 검증이 이루어져야 하며, 생체분석방법 검증을 위한 미국 식약처(FDA) 가이드언스에 기술된 내용을 근거로 한 표준 규격 파라미터의 허용기준에 부합하고 있음을 입증해야 한다⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾. 주요 파라미터와 허용기준은 부록 4에 제시되어 있다. 부록 4에 제시된 허용기준을 충족한다면, HPLC/UPLC-분광광도계 시스템은 사용하기에 적합하다고 간주하며, 본 시험지침서에 기술된 시험 조건으로 MTT 포르마잔을 측정할 수 있다.

인정요건

32. 검증된 RhE 모델을 사용한 시험법에 대해 음성대조군을 처리한 조직은 표 2에서 설명한 바와 같이 조직의 품질을 반영하는 OD를 나타내야 하며, 기존의 확립된 시험결과의 범위 아래로 내려가서는 안된다. 양성대조군(빙초산 또는 8N 수산화칼륨(KOH))으로 처리된 조직은 시험조건 하에 부식성 화학물질에 반응하는 조직생존율을 나타내야 한다(부록 2 참조). 시험물질 및 또는 대조물질에 대한 반복시험에서 조직들 간의 생존율 편차는 유효한 RhE 모델의 필요조건(부록 2 참조)(예; 두 조직 반복시험 간의 생존율 차이가 30%를 넘지 않아야 함)에 맞게 허용범위 안에 있어야 한다. 반복 실험에서 음성대조군 또는 양성대조군이 허용 범위를 벗어난 경우 그 시험은 부적합으로 간주되어 재시험을 해야 한다. 시험물질의 편차가 규정된 범위를 벗어나면 재시험을 수행해야 한다.

결과 해석 및 예측모델

33. 각 시험물질에서 얻은 흡광도(OD) 값은 생존율 100%로 하는 음성대조군과 비교하여 생존율을 계산하는데 사용된다. HPLC/UPLC-분광광도계를 사용하는 경우, 조직생존율은 음성대조군에서 얻은 MTT 포르마잔 피크와 비교하여 시험물질에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 MTT 포르마잔 피크영역(%)으로 계산된다. 부식성 물질과 비부식성 물질을 구분하는(또는 부식성 하위분류를 분류하는) 기준이 되는 세포생존율은 본 시험 가이드라인 제 35항과 36항에 정의되어 있으며, 결과해석에 이용되어야 한다.

34. 시험 결과에 따라 분류가 명확한 경우, 해당 시험물질에 대해 최소 2개의 조직 반복시험들로 구성된 한 번의 시험만으로 충분하다. 하지만 반복된 시험결과가 일치하지 않거나 기준 값의 경계에 해당되는 경우 두 번째 시험을 수행해야 하며, 두 번째 시험 결과가 불일치할 경우 세 번째 시험을 수행해야 한다.

35. UN GHS⁽¹⁾분류 체계와 관련된 EpiSkinTM 피부부식 시험법⁽⁹⁾⁽²²⁾⁽³⁴⁾에 대한 예측모델은 표 4에서 제시하고 있다.

표 4. EpiSkin™ 예측 모델

노출시간 이후 측정된 생존율 (t=3, 60분과 240분)	판정기준
3분 노출 후 < 35%	부식성: ·선택적 하위분류 1A*
3분 노출 후 ≥ 35% 그리고 60분 노출 후 < 35% 또는 60분 노출 후 ≥ 35% 그리고 240분 노출 후 < 35%	부식성: ·선택적 하위분류 1B/1C의 조합
240분 노출 후 ≥ 35%	비부식성

* 하위분류를 용이하게 하기 위한 RhE 시험법의 유효성을 평가하기 위해 생성된 데이터에 따르면, EpiSkin™ 시험법의 하위분류 1A의 결과 중 약 22%는 하위분류 1B/1C에 해당하는 것으로 나타났다(과분류) (부록 3 참조).

36. UN GHS⁽¹⁾ 분류 체계와 관련된 EpiDerm™ SCT⁽¹⁰⁾⁽²³⁾⁽³⁵⁾, SkinEthic™ RHE⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽²³⁾⁽³⁶⁾ 및 epiCS®⁽¹⁶⁾⁽²³⁾⁽³⁷⁾, LabCyte EPI-MODEL24⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾ 피부부식 시험법에 대한 예측모델은 표 5에서 제시하고 있다.

표 5. EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS®, LabCyte EPI-MODEL24 SCT 예측 모델

노출 시간 이후 측정된 생존율 (t=3, 60분)	판정기준
STEP 1 EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS®, LabCyte EPI-MODEL24 SCT	
3분 노출 후 < 50%	부식성
3분 노출 후 ≥ 50% 그리고 60분 노출 후 < 15%	부식성
3분 노출 후 ≥ 50% 그리고 60분 노출 후 ≥ 15%	비부식성
STEP 2 EpiDerm™ SCT- step 1에서 부식성으로 식별된 물질/혼합물	
3분 노출 후 < 25%	선택적 하위분류 1A *
3분 노출 후 ≥ 25%	선택적 하위분류 1B/1C의 조합
STEP 2 SkinEthic™ RHE- step 1에서 부식성으로 식별된 물질/혼합물	
3분 노출 후 < 18%	선택적 하위분류 1A *
3분 노출 후 ≥ 18%	선택적 하위분류 1B/1C의 조합
STEP 2 epiCS®- step 1에서 부식성으로 식별된 물질/혼합물	

3분 노출 후 < 15%	선택적 하위분류 1A *
3분 노출 후 ≥15%	선택적 하위분류 1B/1C의 조합
STEP 2 LabCyte EPI-MODEL24 SCT- step 1에서 부식성으로 식별된 물질/혼합물	
3분 노출 후 < 15%	선택적 하위분류 1A *
3분 노출 후 ≥15%	선택적 하위분류 1B/1C의 조합

* 하위분류를 용이하게 하기 위한 시험법의 유효성을 평가하기 위해 생성된 데이터에 따르면, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS®, LabCyte EPI-MODEL24 SCT의 하위분류 1A 결과 약 29%, 31%, 33%, 30%는 실제로 각각 하위분류 1B 또는 1C 물질/혼합물에 해당하는 것으로 나타났다(과분류)(부록 3 참조).

시험결과 및 보고

시험결과

37. 매 시험마다 조직 반복시험에서 얻은 데이터를 포함하여 각 반복시험에서 얻은 데이터(예; 분류 결과를 포함하는 각 시험물질과 흡광도 값과 세포생존율)는 표 형식으로 보고해야 한다. 또한 각각의 수행 시험에 대한 조직 반복시험 사이의 생존율, CV 평균과 범위가 보고되어야 한다. 각 시험물질에 있어서 직접적인 MTT 환원제 또는 유색 시험물질에 의한 MTT 시약과의 상호작용(interaction)에 대해 보고되어야 한다.

시험보고서

38. 시험보고서는 다음 사항을 포함해야 한다.

시험물질과 대조물질

- 단일성분물질: IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드와 같은 화학물질 식별정보, 구조식, 순도, 불순물에 대한 적절하고 실행 가능한 화학물질 정보 등
- 다성분물질, 정확한 화학구조와 분자구조를 알 수 없는 물질(UVCB) 및 혼합물: 화학적 식별에 의한 특성, 구성 성분의 비율과 성분의 물리화학적 특성
- 물리적 성상, 용해도, 부가적으로 관련 물리화학적 특성
- 출처, 시판된 경우 제품번호

- 해당될 경우, 시험 전 시험물질/대조군 물질의 처리 여부(예, 가열, 분쇄)
- 시험물질의 안정성, 사용기한, 또는 알 수 있다면 재분석 날짜
- 보관조건

사용된 RhE 모델 및 프로토콜(해당되는 경우)

시험조건

- 사용된 RhE 모델(배치 번호 포함)
- 측정 기기의 보정 정보(예; 분광광도계), 파장 및 주파수
- MTT 포르마잔 정량에 사용한 파장 영역(pass)(해당되는 경우), 측정 기기의 직선 범위
- MTT 포르마잔 정량에 사용된 방법에 대한 설명
- HPLC/UPLC-분광광도계의 기능에 대한 설명(해당되는 경우)
- 사용된 특정 RhE 모델(기능 포함)의 상세 배경 정보. 최소한 다음 사항을 포함해야 함
 - i) 생존율
 - ii) 장벽 기능
 - iii) 형태적 특징
 - iv) RhE 모델의 품질관리(QC)
- RhE 모델의 이력 참고 자료. 배치 모델 이력에 근거한 품질관리 데이터 허용기준을 최소한 포함해야 함
- 일반적으로 시험법 사용 전에 숙련도 확인 물질에 대한 평가로 시험법 수행의 숙련도 입증

시험 절차

- 수행한 시험절차의 세부사항(노출 후 세척 과정 포함)
- 수행한 시험물질 및 대조군 물질의 용량
- 노출시간 및 노출 온도
- 직접적인 MTT 환원제 및 또는 유색 시험물질에 사용된 대조군에 대한 설명(해당되는 경우)
- 노출시간마다 시험물질이나 대조군 물질에 사용된 조직 반복시료 수(양성대조군, 음성대조군, NSMTT, NSC_{living}, NSC_{killed})
- 사용된 RhE 모델에 근거하여 모델에 적용한 예측모델 및 판정기준에 대한 설명
- 시험 절차의 변경 사항에 대한 설명(세척 과정 포함)

- 반복실험 및 시험 인정요건
- 양성대조군과 음성대조군의 평균값 및 기존 데이터를 기반으로 허용 가능한 범위
- 양성대조군과 음성대조군에서 조직 반복시험 간의 허용 가능한 편차
- 시험물질의 조직 반복시험 간의 허용 가능한 편차

결과

- 각 시험물질 및 대조군, 각 노출기간, 각 반복실험, 각 시험의 측정값(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, 조직생존율, 평균 조직생존율, 조직 반복시험간의 표준 편차 또는 CV)에 관한 데이터의 도표화(해당되는 경우)
- 해당되는 경우, 직접적인 MTT 환원제 및 또는 유색 시험물질에 사용된 대조군들의 결과(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, %NSMTT, %NSC_{living}, %NSC_{killed}, 반복 조직 반복시험 간의 편차 또는 표준편차 포함)와 최종적으로 보정된 조직 생존율(%)
- 정해진 시험 회차 및 시험물질과 대조군 물질로부터 얻어진 허용기준에 대한 결과
- 관찰된 기타 결과에 대한 설명
- 사용된 예측모델과 판정기준에 근거한 분류

결과에 대한 고찰

결론

부록 1. 용어정의

정확도(Accuracy) : 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도로, 시험법 성과를 측정하는 기준이자 상관성(relevance)의 요소에 해당됨. 시험결과의 정확도를 의미하는 “일치성(concordance)”과 같은 의미로 혼용되어 사용된다⁽²⁵⁾.

세포생존율(Cell viability) : 세포에서 세포군집(cell population)의 총 활성도를 측정하는 지표(예, 생염료인 MTT를 환원시키는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소 능력)로서 살아있는 세포의 활성도 및 총 숫자와 관련 있으며, 측정된 평가 항목과 사용된 시험방법에 따라 다를 수 있음

화학물질(Chemical) : 물질 또는 혼합물을 의미함

일치도(Concordance) : 상관성의 한 측면을 보여주고 시험법이 시험물질을 자극성, 비자극성 등의 카테고리로 나누는 수행에 대한 평가 척도. 이 용어는 정확성과 같은 의미로 사용되며 시험에 사용한 모든 시험물질이 양성 또는 음성으로 정확하게 분류되는 비율로 정의된다. 시험법의 특이성 또는 민감도를 우선시하는 척도에 따라 시험에 사용 될 양성물질 비율이 조절되는데, 일치성 또한 이에 따라 달라짐⁽²⁵⁾.

ET₅₀ : 기준물질을 정해진 특정 농도로 적용했을 때 조직생존율을 50%까지 감소시키는 데 필요한 시험물질 노출시간(IC₅₀ 참조)

UN의 화학물질 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템 (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS) : 물리적, 보건적, 환경적 위험성의 수준 및 표준화된 유형에 따른 화학물질(물질 또는 혼합물)의 분류체계로, 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⁾

HPLC(High Performance Liquid Chromatography) : 고성능 액체크로마토그래피

통합독성평가(IATA, Integrated Approach to Testing and Assessment) : 통합적인 독성 평가 접근법

IC₅₀: 고정된 노출시간 후에 기준물질이 조직생존율을 50%(IC₅₀) 감소시키는 농도를 측정하여 평가할 수 있다(ET₅₀ 참조).

무제한 용량(Infinite dose) : 상피 표면을 완전히 균일하게 덮는데 필요한 양을 초과하는 시험물질의 용량을 말함

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

단일성분물질(Mono-constituent substance) : 정량적 구성 정의에 의하면, 하나의 주요성분이 적어도 80%(w/w) 이상인 물질

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue tetrazolium bromide

다성분물질(Multi-constituent substance) : 두 가지 이상의 주요성분의 양이 $\geq 10\%$

(w/w) 및 < 80% (w/w)인 물질. 다성분 물질은 생산과정의 산물이며, 혼합물과 다성분 물질의 차이는 혼합물은 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 섞어서 얻고, 다성분 물질은 화학반응의 산물임

NC(Non corrosive) : 비부식성

NSC_{killed} : 죽은 조직에서의 비특이적 색상 (Non-Specific Colour in killed tissues)

NSC_{living} : 살아있는 조직에서의 비특이적 색상 (Non-Specific Colour in living tissues)

NSMTT : 비특이적 MTT 환원 (Non-Specific MTT reduction)

OD(Optical density) : 흡광도

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

유사시험법평가기준(Performance standards) : 검증된 시험법을 기반으로 기전적, 기능적으로 유사한 시험방법의 비교 가능성을 평가하는 기준으로 다음 사항을 포함함.

- (1) 필수적 시험 방법 구성요소;
- (2) 검증된 시험방법의 허용 가능한 수행 검증을 위해 사용된 화학물질들 중에서 선택된 최소한의 기준 물질 리스트;
- (3) 검증된 시험 방법에서 얻은 내용을 기반으로 정확성과 신뢰도의 비교 수준. 이는 제시된 시험 방법이 기준 화학물질의 최소한의 리스트를 이용해 평가했을 때 증명되어야 함⁽²⁵⁾

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⁽²⁵⁾

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⁽²⁵⁾

반복실험(Run) : 음성대조군과 양성대조군과 같이 시험되는 하나 이상의 시험물질로 구성됨

민감도(Sensitivity) : 시험법으로 모든 양성/활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항⁽²⁵⁾

생체 내 피부부식(Skin corrosion *in vivo*) : 비가역적인 피부손상으로, 시험물질 도포 후 최대 4시간 경과한 후 육안으로 관찰 가능한 피사가 표피층에서 진피층에 이르기까지 나타난다. 부식 반응은 궤양, 출혈, 괴사, 14일째 되는 관찰 마지막 시점에 발생하는 피부열로 인한 변색, 완전 탈모 부분 발생, 흉터를 특징으로 한다. 의심스러운 병변을 평가하기 위한 조직병리검사의 시행을 고려해야 한다.

특이도(Specificity) : 시험법으로 모든 음성/비활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 특이도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항이다⁽²⁵⁾.

물질(Substance) : 생산과정을 통해 얻어지거나 또는 자연 상태로 얻어진 화학원소들(elements)과 이들로 이루어진 혼합물(compounds). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함하지만 해당 물질의 안정성이나 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외함

시험물질(Test chemical) : "시험물질"은 시험대상이 되는 물질을 의미

UPLC(Ultra-High Performance Liquid Chromatography) : 초고성능 액체 크로마토그래피

정확한 화학구조와 분자구조를 알 수 없는 물질(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

부록 2. 피부부식 시험을 위해 검증된 RhE 시험법의 주요 시험법 및 구성요소

Nr.	1	2	3	4	5
시험법 구성	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
모델 표면	0.38 cm ²	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.6 cm ²	0.3 cm ²
조직 반복시험 수	노출시간 당 최소 2개	노출시간 당 최소 2-3개	노출시간 당 최소 2개	노출시간 당 최소 2개	노출시간 당 최소 2개
처리 용량 및 적용	<p><u>액체 및 점성</u>: 50±3 µL (131.6 µL/cm²)</p> <p><u>고체</u>: 20 ±2 mg (52.6 mg/cm²) + 100 µL ± 5 µL NaCl 용액 (9 g/L)</p> <p><u>왁스/점성</u>: 50±2 mg (131.6 mg/cm²) 나일론 메쉬 사용</p>	<p><u>액체</u>: 나일론 메쉬 유무에 관계없이 50 µL (79.4 µL/cm²)</p> <p><i>시험 화학물질과 나일론 메쉬의 사전 호환성 시험</i></p> <p><u>반고체</u>: 50 µL (79.4 µL/cm²)</p> <p><u>고체</u>: 25 µL H₂O (또는 필요한 경우) + 25 mg (39.7 mg/cm²)</p> <p><u>왁스(Waxes)</u>: 8 mm 직경의 평평한 '원반 모양'의 조각을 15 µL의 H₂O로 적신 조직 위에 놓음</p>	<p><u>액체 및 점성</u>: 나일론 메쉬를 사용하여 40±3 µL (80 µL/cm²)</p> <p><i>시험 화학물질과 나일론 메쉬의 사전 호환성 시험</i></p> <p><u>고체</u>: 20±2 µL H₂O + 20±3 mg (40 mg/cm²)</p> <p><u>왁스 / 점성</u>: 나일론 메쉬를 사용하여 20±3 mg (40 mg/cm²)</p>	<p><u>액체 및 점성</u>: 나일론 메쉬를 사용하여 50 µL (83.3 µL/cm²)</p> <p><i>시험 화학물질과 나일론 메쉬의 사전 호환성 시험</i></p> <p><u>반고체</u>: 50 µL (83.3 µL/cm²)</p> <p><u>고체</u>: 25 mg (41.7 mg/cm²) + 25 µL H₂O (또는 더 필요한 경우)</p> <p><u>왁스</u>: 납작한 '쿠키 같은' 8 mm 직경의 조각을 15 µL H₂O로 적신 조직 위에 놓음</p>	<p><u>액체 및 점성</u>: 나일론 메쉬를 사용하여 50 µL (166.7 µL/cm²)</p> <p><u>고체</u>: 50±2 mg (166.7 mg/cm²) + 50 µL H₂O</p> <p><u>왁스</u>: 고점도용 마이크로피펫과 팁을 이용해 액체와 점성 물질에 사용한다.</p>
직접적인 MTT 환원에 대한 사전 확인	액체인 경우 50 µL, 고체인 경우 20 mg을 2 mL MTT 용액(0.3 mg/mL)과 혼합하여 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH에서 180±5분 동안 배양 →용액이 청색/자색으로 변	액체인 경우 50 µL, 고체인 경우 25 mg을 1 mL MTT 용액(1 mg/mL)과 혼합하여 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분 동안 배양 →용액이 청색/자색으로 변하면, 죽은(freeze-killed) 해	액체인 경우 40 µL, 고체인 경우 20 mg을 1 mL MTT 용액(1 mg/mL)과 혼합하여 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH에서 180±15분 동안 배양 →용액이 청색/자색으로 변하면, 죽은(freeze-killed) 해	액체인 경우 50 µL, 고체인 경우 25 mg을 1 mL MTT 용액(1 mg/mL)과 혼합하여 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분 동안 배양 →용액이 청색/자색으로 변하면, 죽은(freeze-killed) 해	액체인 경우 50 µL, 고체인 경우 50 mg을 500 µL MTT 용액(0.5 mg/mL)과 혼합하여 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분 동안 배양 →용액이 청색/자색으로 변

	하면, 죽은(water-killed) 대조군이 수행되어야 한다.	당 대조군이 수행되어야 한다.	당 대조군이 수행되어야 한다.	당 대조군이 수행되어야 한다.	하면, 죽은(freeze-killed) 해당 대조군이 수행되어야 한다.
--	-------------------------------------	------------------	------------------	------------------	---

Nr.	1	2	3	4	5
시험법 구성	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
색 간섭 사전 확인	10 µL(액체) 또는 10 mg(고체)을 90 µL의 H ₂ O와 RT에서 15분간 혼화 →용액이 착색되면 살아있는 해당 대조군이 수행되어야 한다.	50 µL (액체) 또는 25 mg (고체)을 300 µL의 H ₂ O와 37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분 동안 혼화 →용액이 착색되면 살아있는 해당 대조군이 수행되어야 한다.	40 µL (액체) 또는 20 mg (고체)을 300 µL의 H ₂ O와 RT에서 60분 동안 혼화 →용액이 착색되면 살아있는 해당 대조군이 수행되어야 한다.	50 µL (액체) 또는 25 mg (고체)을 300 µL의 H ₂ O와 37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분 동안 혼화 →용액이 착색되면 살아있는 해당 대조군이 수행되어야 한다.	50 µL (액체) 또는 50 mg (고체)을 300 µL의 H ₂ O와 37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분 동안 혼화 →용액이 착색되면 살아있는 해당 대조군이 수행되어야 한다.
노출시간 및 온도	3분, 60분(±5분) 및 240 분(±10 분) 환기 가능한 실내온도 (RT, 18-28℃)	RT에서 3분, 37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분	RT에서 3분, 37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분	RT에서 3분, 37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분	RT에서 3분, 37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 60분
세척	25 mL 1X PBS (2 mL씩)	1x PBS로 부드럽게 20회 정도	1x PBS로 부드럽게 20회 정도	1x PBS로 부드럽게 20회 정도	1x PBS로 부드럽게 10회 이상
음성대조군	50 µL NaCl 용액 (9 g/L) 모든 노출시간마다 시험	50 µL H ₂ O 모든 노출시간마다 시험	40 µL H ₂ O 모든 노출시간마다 시험	50 µL H ₂ O 모든 노출시간마다 시험	50 µL H ₂ O 모든 노출시간마다 시험
양성대조군	50 µL 빙초산 4시간만 시험	50 µL 8N KOH 모든 노출시간마다 시험	40 µL 8N KOH 1시간만 시험	50 µL 8N KOH 모든 노출시간마다 시험	50 µL 8N KOH 1시간만 시험
MTT 용액	2 mL 0.3 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	500 µL 0.5 mg/mL

MTT 배양 시간 및 온도	37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 180분(±15분)	37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 180분	37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 180분(±15분)	37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 180분	37℃, 5% CO ₂ , 95% RH에서 180분(±5분)
----------------	---	---	---	---	--

Nr.	1	2	3	4	5
시험법 구성	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
추출 용매	산성화된 이소프로판올 500 µL(이소프로판올 중 0.04 N HCl) (완전히 격리된 조직)	2 mL 이소프로판올 (인서트의 상부 및 하부로부터 추출)	1.5 mL 이소프로판올 (인서트의 상부 및 하부로부터 추출)	2 mL 이소프로판올 (인서트의 상부 및 하부로부터 추출)	300 µL 이소프로판올 (완전히 격리된 조직)
추출 시간 및 온도	차광하여 RT에서 하룻밤	RT에서 흔들지 않고 하룻밤 또는 RT에서 120분 동안 흔들어 주면서(~120 rpm)	RT에서 흔들지 않고 하룻밤 또는 RT에서 120분 동안 흔들어 주면서(~120 rpm)	RT에서 흔들지 않고 하룻밤 또는 RT에서 120분 동안 흔들어 주면서(~120 rpm)	차광하여 RT에서 하룻밤
OD 값	기준 필터 없이 570 nm (545 ~ 595 nm)	기준 필터 없이 570 nm (또는 540 nm)	기준 필터 없이 570 nm (540 ~ 600 nm)	기준 필터 없이 540 ~ 570 nm	기준 필터 650 nm 포함 570 nm
조직 품질 관리	SDS 18시간 처리 1 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3.0 mg/mL	1 % Triton X-100 처리 4.08시간 ≤ ET ₅₀ ≤ 8.7시간	1 % Triton X-100 처리 4시간 ≤ ET ₅₀ ≤ 10시간	1 % Triton X-100 처리 2시간 ≤ ET ₅₀ ≤ 7시간	SDS 18시간 처리 1.4 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 4.0 mg/mL
허용 기준	1. 음성대조군(NaCl)으로 처리한 조직 반복시료의 평균 OD는 모든 노출시간에 대해 0.6 이상 1.5 이하이어야 한다. 2. 4시간 동안 양성대조군(빙초산)에 노출된 조직 반복시료의 평균 생존율은 음성대조군의 %로 표시되며, 20 %가 되어야 한다. 3. 20~100% 생존율을 가	1. 음성대조군(H ₂ O)으로 처리된 조직 반복시료의 평균 OD는 모든 노출시간에 대해 0.8 이상 2.8 이하이어야 한다. 2. 음성대조군의 %로 표시된 양성대조군 (8N KOH)으로 1시간 동안 노출된 조직 반복시료의 평균 생존율은 15% 미만이어야 한다. 3. 20~100%의 생존율 범	1. 음성대조군(H ₂ O)으로 처리한 조직 반복시료의 평균 OD는 모든 노출시간에 대해 0.8 이상 3.0 이하이어야 한다. 2. 음성대조군의 %로 표시된 양성대조군(8N KOH)으로 1시간(해당되는 경우 4 시간)동안 노출된 조직 반복시료의 평균 생존율은 15% 미만이어야 한다. 3. 20~100% 생존율의 범위	1. 음성대조군(H ₂ O)으로 처리된 조직 반복시료의 평균 OD는 모든 노출시간에 대해 0.8이상 2.8 이하이어야 한다. 2. 음성대조군의 %로 표시되는 양성대조군(8N KOH)으로 1시간 노출된 조직 반복시료의 평균 생존율은 20%가 되어야 한다. 3. 20~100% 생존율의 범위	1. 음성대조군(H ₂ O)으로 처리한 조직 반복시료의 평균 OD는 모든 노출시간에 대해 0.7 이상 2.5 이하이어야 한다. 2. 1시간 동안 양성대조군 (8N KOH)에 노출된 조직 반복시료의 평균 생존율은 음성대조군의 %로 표시되며, 15%가 되어야 한다. 3. 20~100% 생존율의 범위

	<p>지며 OD가 0.3 이상인 경우, 두 조직 반복시료 사이의 생존율 차이는 30%를 초과하면 안된다.</p>	<p>위에서 조직 반복시료간의 변동 계수(CV)는 30% 이하야 한다.</p>	<p>3. 20~100% 생존율의 범위 및 OD가 0.3 이상인 경우, 2개의 조직 반복시료 사이의 생존율 차이는 30%를 초과하면 안된다.</p>	<p>및 OD가 0.3 이상인 경우, 2개의 조직 반복시료 사이의 생존율 차이는 30%를 초과하면 안된다.</p>	<p>및 OD가 0.3 이상인 경우, 2개의 조직 반복시료 사이의 생존율 차이는 30%를 초과하면 안된다.</p>
--	--	---	--	---	---

부록 3. 하위분류를 위한 시험법의 수행

아래 표는 5 개의 시험법 개발자가 수행한 80 개 또는 79 개의 화학물질 세트를 기초로 계산한 5 개 시험법의 성능을 제공한다. 4 개의 시험법에 대한 계산(EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE 및 epiCS®)은 OECD 사무국이 수행하고, 전문가 하위 그룹이 동의하고 검토하였다⁽²¹⁾⁽²³⁾. LabCyte EPI-MODEL24 SCT 에 대한 계산은 개발자가 수행하였고, 전문가 평가 위원단(peer review panel)과 검증관리 그룹이 동의하고 검토하였다⁽⁴¹⁾⁽⁴³⁾.

전체 화학물질에 대한 예측 통계 (n=80 개의 화학물질, epiCS® 2번의 독립적인 시험 또는 EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ 3번의 독립적인 시험, 즉 각각 159* 또는 240 분류. n=79** 개의 화학물질, LabCyte EPI-MODEL24 SCT 3번의 독립적인 시험, 즉 237 분류. * 1개의 화학물질은 사용 불가능하여 epiCS®에서 한번만 시험되었다 ⁽²³⁾ . ** 1개의 화학물질은 사용 불가능하여 LabCyte EPI-MODEL24 SCT에서 시험되지 않았다.					
	EpiSkin™	EpiDerm™	SkinEthic™	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL 24
과분류					
1B와 1C로 과분류된 1A	21.5%	29%	31.2%	32.8%	30%
NC로 과분류된 1B와 1C	20.7%	23.4%	27%	28.4%	18.9%
NC로 과분류된 1A	0%	2.7%	0%	0%	2.7%
부식성으로 과분류	20.7%	26.1%	27%	28.4%	21.6%
전체 과분류율(모든 카테고리)	17.9%	23.3%	24.5%	25.8%	21.5%
하위분류					
1A로 하위분류된 1B와 1C	16.7%	16.7%	16.7%	12.5%	13.9%
1A로 하위분류된 NC	0%	0%	0%	0%	0%
1B와 1C로 하위분류된 NC	2.2%	0%	7.5%	6.6%	0%
전체 하위분류 비율(모든 카테고리)	3.3%	2.5%	5.4%	4.4%	2.1%
정확한 분류					
1A로 정확히 분류	83.3%	83.3%	83.3%	87.5%	86.1%
1B와 1C로 정확히 분류	76.3%	71%	61.3%	60.7%	70%
NC로 정확히 분류	79.3%	73.9%	73%	71.62%	78.4%
전체 정확도	78.8%	74.2%	70%	69.8%	76.4%

부록 4. RhE 조직에서 추출된 MTT 포르마잔 정량을 위한 HPLC/UPLC-
분광광도계 시스템의 검증을 위한 주요 측정인자 및 허용기준

매개변수	FDA가이드라인에서 유래된 프로토콜 ⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾	허용기준
선택성	살아있는 blank(아무 처리 없이 살아있는 RhE 조직의 이소프로판올 추출물), 죽은 blank(아무 처리 없이 죽은 RhE 조직의 이소프로판올 추출물)의 이소프로판올의 분석	$\text{Area}_{\text{interference}} \leq 20\% \text{Area}_{\text{LLOQ}}^1$
정밀성	이소프로판올(n=5)의 품질 관리(1.6 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 160 $\mu\text{g/mL}$ 의 MTT 포르마잔)	$\text{CV} \leq 15\%$ 또는 20% LLOQ
정확성	이소프로판올(n=5)의 품질 관리	$\% \text{Dev} \leq 15\%$ 또는 20% LLOQ
매트릭스 효과	살아있는 blank(n=5)의 품질 관리	$85\% \leq \text{매트릭스 효과} \leq 115\%$
결과	ULOQ ² 표준 이후 이소프로판올 분석	$\text{Area}_{\text{interference}} \leq 20\% \text{Area}_{\text{LLOQ}}^1$
재현성(하루내)	3번의 독립적인 보정곡선(ULOQ ² 에서 시작하여, 이소프로판올 내 MTT 포르마잔의 6번 연속 1/3 희석, 즉 200 $\mu\text{g/mL}$ 기준); 이소프로판올(n=5)의 품질 관리	검량선 : $\% \text{Dev} \leq 15\%$ 또는 20% LLOQ 품질관리 : $\% \text{Dev} \leq 15\%$ 와 $\text{CV} \leq 15\%$
재현성(일간)	1일째 : 1 검량선 및 이소프로판올 (n=3)의 품질 관리 2일째 : 1 검량선 및 이소프로판올 (n=3)의 품질 관리 3일째 : 1 검량선 및 이소프로판올 (n=3)의 품질 관리	
RhE 조직 추출물에서 MTT 포르마잔의 단기 안정성	살아있는 blank(n=3) 품질 관리는 샘플이 준비된 날, 상온에서 24시간 보관 후 분석	$\% \text{Dev} \leq 15\%$
필요한 경우, RhE 조직 추출물에서 MTT 포르마잔의 장기 안정성	살아있는 blank(n=3) 품질 관리는 준비된 날에, 지정된 온도(4°C, -20°C, -80°C)에서 며칠간 보관 후 분석	$\% \text{Dev} \leq 15\%$

¹ LLOQ : 하한정량한계, 1-2% 조직생존율에 해당됨. 즉, 0.8 $\mu\text{g/mL}$

² ULOQ : 상한 정량한계, 음성대조군 이소프로판올 추출물들의 농도 중 가장 높을 것으로 기대되는 MTT 포르마잔 농도보다 적어도 2배가 높은 것으로 정의됨, 즉, 200 $\mu\text{g/mL}$.

OECD/OCDE

431

Adopted:
14 June 2019

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS

In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method

INTRODUCTION

1. Skin corrosion refers to the production of irreversible damage to the skin manifested as visible necrosis through the epidermis and into the dermis, following the application of a test chemical [as defined by the United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)] (1). This updated Test Guideline 431 provides an in vitro procedure allowing the identification of non-corrosive and corrosive substances and mixtures in accordance with UN GHS (1). It also allows a partial sub-categorisation of corrosives.
2. The assessment of skin corrosion potential of chemicals has typically involved the use of laboratory animals (OECD Test Guideline 404 (TG 404); originally adopted in 1981 and revised in 1992, 2002 and 2015) (2). In addition to the present TG 431, two other in vitro test methods for testing corrosion potential of chemicals have been validated and adopted as OECD Test Guidelines 430 (3) and 435 (4). Furthermore the in vitro OECD TG 439 (5) has been adopted for testing skin irritation potential. A document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation describes several modules which group information sources and analysis tools, and provides guidance on (i) how to integrate and use existing testing and non-testing data for the assessment of skin irritation and skin corrosion potentials of chemicals and (ii) proposes an approach when further testing is needed (6).
3. This Test Guideline addresses the human health endpoint skin corrosion. It makes use of reconstructed human epidermis (RhE) (obtained from human derived non-transformed epidermal keratinocytes) which closely mimics the histological, morphological, biochemical and physiological properties of the upper parts of the human skin, i.e. the epidermis. This Test Guideline was originally adopted in 2004 and updated in 2013, 2016 and 2019 to include additional test methods using the RhE models. The Test Guideline was also updated in 2015 to introduce the possibility to use the methods to support the sub-categorisation of corrosive chemicals, and to refer to the IATA guidance document, and introduce the use of an alternative procedure to measure viability.

© OECD, (2019)

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

4. Five validated test methods using commercially available RhE models are included in this Test Guideline, as described below. Prevalidation studies (7), followed by a formal validation study for assessing skin corrosion (8) (9) (10) have been conducted (11) (12) for two of these commercially available test methods, EpiSkin™ Standard Model (SM), and EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (referred to in the following text as the Validated Reference Methods – VRMs, EpiSkin™=VRM1, EpiDerm™= VRM2). The outcome of these studies led to the recommendation that the two VRMs mentioned above could be used for regulatory purposes for distinguishing corrosive (C) from non-corrosive (NC) substances, and that the EpiSkin™ could moreover be used to support sub-categorisation of corrosive substances (13) (14) (15). Two other commercially available in vitro skin corrosion RhE test methods have subsequently shown similar results to the EpiDerm™ SCT according to PS-based Validation (16) (17) (18). These are the SkinEthic™ RHE1 and epiCS® (previously named EST-1000) that can also be used for regulatory purposes for distinguishing corrosive from non-corrosive substances (19) (20). Post validation studies performed by the RhE model producers in the years 2012 to 2014 with a refined protocol correcting interferences of unspecific MTT reduction by the test chemicals improved the performance of both discrimination of C/NC as well as supporting sub-categorization of corrosives (21) (22). Further statistical analyses of the post-validation data generated with EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE and epiCS® have been performed to identify alternative predictions models that improved the predictive capacity for sub-categorisation (23). Finally, the LabCyte EPI-MODEL24 is another commercially available in vitro skin corrosion RhE test that was shown to be scientific similar to the VRMs and can therefore be used for regulatory purposes to distinguish corrosive from non-corrosive substances as well as support sub-categorization of corrosives (40) (41) (42)(43).

5. Before a proposed similar or modified in vitro RhE test method for skin corrosion other than the VRMs can be used for regulatory purposes, its reliability, relevance (accuracy), and limitations for its proposed use should be determined to ensure its similarity to the VRMs, in accordance with the requirements of the Performance Standards (PS) (24) set out in accordance with the principles of Guidance Document No.34 (25). The Mutual Acceptance of Data will only be guaranteed after any proposed new or updated test method following the PS have been reviewed and included in this Test Guideline. The test methods included in this Test Guideline can be used to address countries' requirements for test results on in vitro test method for skin corrosion, while benefiting from the Mutual Acceptance of Data.

DEFINITIONS

6. Definitions used are provided in Annex I.

INITIAL CONSIDERATIONS

7. This Test Guideline allows the identification of non-corrosive and corrosive substances and mixtures in accordance with the UN GHS (1). This Test Guideline further supports the sub-categorisation of corrosive substances and mixtures into optional Sub-category 1A, in accordance with the UN GHS (1), as well as a combination of Sub-categories 1B and 1C (21) (22) (23). A limitation of this Test Guideline is that it does not allow discriminating between skin corrosive Sub-category 1B and Sub-category 1C in accordance with the UN GHS (1) due to the limited set of well-known in vivo corrosive Sub-category 1C chemicals. The five test methods under this test guideline are able to discriminate sub-categories 1A versus 1B-and-1C versus NC.

8. A wide range of chemicals representing mainly individual substances has been tested in the validation studies supporting the test methods included in this Test Guideline. The original database of the validation study conducted for identification of non-corrosives versus corrosives amounted to 60 chemicals covering a wide range of chemical classes (8) (9) (10). Testing to demonstrate sensitivity, specificity, accuracy and within-laboratory-reproducibility of the assay for sub-categorisation was further performed by the test method developers using 79 to 80 chemicals also covering a wide range of chemical classes, and results were reviewed by the OECD (21) (22) (23). On the basis of the overall data available, the Test Guideline is applicable to a wide range of chemical classes and physical states including liquids, semi-solids, solids and waxes. The liquids may be aqueous or non-aqueous; solids may be soluble or insoluble in water. Whenever possible, solids should be ground to a fine powder before application; no other prior treatment of the sample is required. In cases where evidence can be demonstrated on the non-applicability of test methods included in the Test Guideline to a specific category of test chemicals, these test methods should not be used for that specific category of test chemicals. In addition, this Test Guideline is assumed to be applicable to mixtures as an extension of its applicability to substances. However, due to the fact that mixtures cover a wide spectrum of categories and composition, and that only limited information is currently available on the testing of mixtures, in cases where evidence can be demonstrated on the non-applicability of the Test Guideline to a specific category of mixtures (e.g. following a strategy as proposed in (26)), the Test Guideline should not be used for that specific category of mixtures. When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are meaningful scientifically. Such considerations are not needed, when there is a regulatory requirement for testing of the mixture. Gases and aerosols have not been assessed yet in validation studies (8) (9) (10). While it is conceivable that these can be tested using RhE technology, the current Test Guideline does not allow testing of gases and aerosols.

9. Test chemicals absorbing light in the same range as MTT formazan and test chemicals able to directly reduce the vital dye MTT (to MTT formazan) may interfere with the tissue viability measurements and need the use of adapted controls for corrections. The type of adapted controls that may be required will vary depending on the type of interference produced by the test chemical and the procedure used to measure MTT formazan (see paragraphs 25-31).

10. While this Test Guideline does not provide adequate information on skin irritation, it should be noted that OECD TG 439 specifically addresses the health effect skin irritation *in vitro* and is based on the same RhE test system, though using another protocol (5). For a full evaluation of local skin effects after a single dermal exposure, the Guidance Document No. 203 on Integrated Approaches for Testing Assessment should be consulted (6). This IATA approach includes the conduct of *in vitro* tests for skin corrosion (such as described in this Test Guideline) and skin irritation before considering testing in living animals. It is recognized that the use of human skin is subject to national and international ethical considerations and conditions.

PRINCIPLE OF THE TEST

11. The test chemical is applied topically to a three-dimensional RhE model, comprised of non-transformed, human-derived epidermal keratinocytes, which have been cultured to

form a multi-layered, highly differentiated model of the human epidermis. It consists of organized basal, spinous and granular layers, and a multi-layered stratum corneum containing intercellular lamellar lipid layers representing main lipid classes analogous to those found in vivo.

12. The RhE test method is based on the premise that corrosive chemicals are able to penetrate the stratum corneum by diffusion or erosion, and are cytotoxic to the cells in the underlying layers. Cell viability is measured by enzymatic conversion of the vital dye MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS number 298-93-1], into a blue formazan salt that is quantitatively measured after extraction from tissues (27). Corrosive chemicals are identified by their ability to decrease cell viability below defined threshold levels (see paragraphs 35 and 36). The RhE-based skin corrosion test methods have shown to be predictive of in vivo skin corrosion effects assessed in rabbits according to the OECD guideline 404 (2).

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

13. Prior to routine use of any of the five validated RhE test methods that adhere to this Test Guideline, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly classifying the twelve Proficiency Substances listed in Table 1. In case of the use of a method for sub-classification, also the correct sub-categorisation should be demonstrated. In situations where a listed substance is unavailable or where justifiable, another substance for which adequate in vivo and in vitro reference data are available may be used (e.g. from the list of reference chemicals (24)) provided that the same selection criteria as described in Table 1 are applied.

Table 1. List of Proficiency Substances¹

Substance	CASRN	Chemical Class ²	UN GHS Cat. Based on <i>In Vivo</i> results ³	Cat. Based on <i>In Vitro</i> results ⁴	Mean cell viability for VRMs				Physical State
					VRM1		VRM2		
					3 min	60 min.	3 min.	60 min	
Sub-category 1A <i>In Vivo</i> Corrosives									
Bromoacetic acid	79-08-3	Organic acid	1A	(3) 1A	3	2.8	3.2	2.8	S
Boron trifluoride dihydrate	13319-75-01	Inorganic acid	1A	(3) 1A	2.4	4.2	4.4	10.1	L
Phenol	108-95-2	Phenol	1A	(3) 1A	29.8	21.8	22.6	13.5	S
Dichloroacetyl chloride	79-36-7	Electrophile	1A	(3) 1A	5.6	6.3	1.3	1.4	L
Combination of sub-categories 1B-and-1C <i>In Vivo</i> Corrosives									
Glyoxylic acid monohydrate	563-96-2	Organic acid	1B-and-1C	(3) 1B-and-1C	110.4	22.5	90.4	3.1	S
Lactic acid	598-82-3	Organic acid	1B-and-1C	(3) 1B-and-1C	80.2	9.4	90	3.5	L
Ethanolamine	141-43-5	Organic base	1B	(3) 1B-and-1C	66.2	40.3	69.7	9.3	Viscous
Hydrochloric acid (14.4%)	7647-01-0	Inorganic acid	1B-and-1C	(3) 1B-and-1C	69.3	5.7	80.8	9	L

<i>In Vivo</i> Non Corrosives									
Phenethyl bromide	103-63-9	Electrophile	NC	(3) NC	141	117.2	112.5	71.2	N
4-Amino-1,2,4-triazole	584-13-4	Organic base	NC	(3) NC	116.8	120.6	105.7	88.2	N
4-(methylthio)-benzaldehyde	3446-89-7	Electrophile	NC	(3) NC	136.7	150.4	85.4	81.6	N
Lauric acid	143-07-7	Organic acid	NC	(3) NC	102	117.4	90.7	64.4	N

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; UN GHS = United Nations Globally Harmonized System (1); VRM = Validated Reference Method, EpiSkin™=VRM1, EpiDerm™= VRM2; NC = Not Corrosive

¹The proficiency substances, sorted first by corrosives versus non-corrosives, then by corrosive sub-category and then by chemical class, were selected from the substances used in the ECVAM validation studies EpiSkin™ and EpiDerm™ (8) (9) (10) and from post-validation studies based on data provided by EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ and epiCS® developers (23). Unless otherwise indicated, the substances were tested at the purity level obtained when purchased from a commercial source (8) (10). The selection includes, to the extent possible, substances that: (i) are representative of the range of corrosivity responses (e.g. non-corrosives; weak to strong corrosives) that the VRMs are capable of measuring or predicting; (ii) are representative of the chemical classes used in the validation studies; (iii) have chemical structures that are well-defined; (iv) induce reproducible results in the VRM; (v) induce definitive results in the *in vivo* reference test method; (vi) are commercially available; and (vii) are not associated with prohibitive disposal costs.

²Chemical class assigned by Barratt et al. (8).

³The corresponding UN Packing groups are I, II and III, respectively, for the UN GHS 1A, 1B and 1C.

⁴The *in vitro* predictions reported in this table were obtained with all five test methods covered in TG 431; for phenol though the LabCyte EPI-MODEL24 had slightly discordant results across runs, i.e. 1A-1BC-1BC; other methods achieved these classifications in validation or post-validation testing performed by the test method developers.

⁵The viability values obtained in the ECVAM Skin Corrosion Validation Studies were not corrected for direct MTT reduction (killed controls were not performed in the validation studies). However, the post-validation data generated by the test method developers that are presented in this table were acquired with adapted controls (23).

14. As part of the proficiency exercise, it is recommended that the user verifies the barrier properties of the tissues after receipt as specified by the RhE model manufacturer. This is particularly important if tissues are shipped over long distance/time periods. Once a test method has been successfully established and proficiency in its use has been demonstrated, such verification will not be necessary on a routine basis. However, when using a test method routinely, it is recommended to continue to assess the barrier properties in regular intervals.

PROCEDURE

15. The following is a generic description of the components and procedures of the RhE test methods for skin corrosion assessment covered by this Test Guideline. The RhE models endorsed as scientifically valid for use within this Test Guideline, i.e. the EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE, epiCS® and LabCyte EPI-MODEL24 (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (40) (41), can be obtained from commercial sources. Standard Operating Procedures (SOPs) for these five RhE models are available (34) (35) (36) (37) (42), and their main test method components are summarised in Annex 2. It is recommended that the relevant SOP be consulted when implementing and using one of these methods in the laboratory. Testing with the five RhE test methods covered by this Test Guideline should comply with the following:

General conditions

16. Non-transformed human keratinocytes should be used to reconstruct the epithelium. Multiple layers of viable epithelial cells (basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum) should be present under a functional stratum corneum. The stratum corneum should be multi-layered containing the essential lipid profile to produce a functional barrier with robustness to resist rapid penetration of cytotoxic benchmark chemicals, e.g. sodium dodecyl sulphate (SDS) or Triton X-100. The barrier function should be demonstrated and may be assessed either by determination of the concentration at which a benchmark chemical reduces the viability of the tissues by 50% (IC50) after a fixed exposure time, or by determination of the exposure time required to reduce cell viability by 50% (ET50) upon application of the benchmark chemical at a specified, fixed concentration (see paragraph 18). The containment properties of the RhE model should prevent the passage of material around the stratum corneum to the viable tissue, which would lead to poor modelling of skin exposure. The RhE model should be free of contamination by bacteria, viruses, mycoplasma, or fungi.

*Functional conditions**Viability*

17. The assay used for quantifying tissue viability is the MTT-assay (27). The viable cells of the RhE tissue construct reduce the vital dye MTT into a blue MTT formazan precipitate, which is then extracted from the tissue using isopropanol (or a similar solvent). The OD of the extraction solvent alone should be sufficiently small, i.e., $OD < 0.1$. The extracted MTT formazan may be quantified using either a standard absorbance (OD) measurement or an HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure (38). The RhE model users should ensure that each batch of the RhE model used meets defined criteria for the negative control. An acceptability range (upper and lower limit) for the negative control OD values should be established by the RhE model developer/supplier. Acceptability ranges for the negative control OD values for the five validated RhE test methods included in this Test Guideline are given in Table 2. An HPLC/UPLC-Spectrophotometry user should use the negative control OD ranges provided in Table 2 as the acceptance criterion for the negative control. It should be documented that the tissues treated with negative control are stable in culture (provide similar OD measurements) for the duration of the exposure period.

Table 2. Acceptability ranges for negative control OD values to control batch quality

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
epiCS	≥ 0.8	≤ 2.8
LabCyte EPI-MODEL24 SCT	≥ 0.7	≤ 2.5

Barrier function

18. The stratum corneum and its lipid composition should be sufficient to resist the rapid penetration of certain cytotoxic benchmark chemicals (e.g. SDS or Triton X-100), as estimated by IC50 or ET50 (Table 3). The barrier function of each batch of the RhE model used should be demonstrated by the RhE model developer/vendor upon supply of the tissues to the end user (see paragraph 21).

Morphology

19. Histological examination of the RhE model should be performed demonstrating multi-layered human epidermis-like structure containing stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum and stratum corneum and exhibits lipid profile similar to lipid profile of human epidermis. Histological examination of each batch of the RhE model used demonstrating appropriate morphology of the tissues should be provided by the RhE model developer/vendor upon supply of the tissues to the end user (see paragraph 21).

Reproducibility

20. Test method users should demonstrate reproducibility of the test methods over time with the positive and negative controls. Furthermore, the test method should only be used if the RhE model developer/supplier provides data demonstrating reproducibility over time with corrosive and non-corrosive chemicals from e.g. the list of Proficiency Substances (Table 1). In case of the use of a test method for sub-categorisation, the reproducibility with respect to sub-categorisation should also be demonstrated.

Quality control (QC)

21. The RhE model should only be used if the developer/supplier demonstrates that each batch of the RhE model used meets defined production release criteria, among which those for viability (paragraph 17), barrier function (paragraph 18) and morphology (paragraph 19) are the most relevant. These data are provided to the test method users, so that they are able to include this information in the test report. Only results produced with QC accepted tissue batches can be accepted for reliable prediction of corrosive classification. An acceptability range (upper and lower limit) for the IC50 or the ET50 is established by the RhE model developer/supplier. The acceptability ranges for the five validated test methods are given in Table 3.

Table 3. QC batch release criterion

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiSkin™ (SM) (18 hours treatment with SDS)(33)	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™SCT (EPI-200) (1% Triton X-100)(34)	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 8.7 hours
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100)(35)	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 10.0 hours
epiCS (1% Triton X-100)(36)	ET ₅₀ = 2.0 hours	ET ₅₀ = 7.0 hours
LabCyte EPI-MODEL24 SCT (18 hours treatment with SDS) (42)	IC ₅₀ = 1.4 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL

Application of the Test Chemical and Control Substances

22. At least two tissue replicates should be used for each test chemical and controls for each exposure time. For liquid as well as solid chemicals, sufficient amount of test chemical should be applied to uniformly cover the epidermis surface while avoiding an infinite dose, i.e. a minimum of 70 µL/cm² or 30 mg/cm² should be used. Depending on the methods, the epidermis surface should be moistened with deionized or distilled water before application of solid chemicals, to improve contact between the test chemical and the epidermis surface (34) (35) (36) (37) (42). Whenever possible, solids should be tested as a fine powder. The application method should be appropriate for the test chemical (see e.g. references (34-37). At the end of the exposure period, the test chemical should be carefully washed from the epidermis with an aqueous buffer, or 0.9% NaCl. Depending on which of the five validated RhE test methods is used, two or three exposure periods are used per test chemical (for all five valid RhE models: 3 min and 1 hour; for EpiSkin™ an additional exposure time of 4 hours). Depending on the RhE test method used and the exposure period assessed, the incubation temperature during exposure may vary between room temperature and 37°C.

23. Concurrent negative and positive controls (PC) should be used in each run to demonstrate that viability (with negative controls), barrier function and resulting tissue sensitivity (with the PC) of the tissues are within a defined historical acceptance range. The suggested PC chemicals are glacial acetic acid or 8N KOH depending upon the RhE model used (see Annex 2 and relevant SOP for details). It should be noted that 8N KOH is a direct MTT reducer that might require adapted controls as described in paragraphs 25 and 26. The suggested negative controls are 0.9% (w/v) NaCl or water.

Cell Viability Measurements

24. The MTT assay, which is a quantitative assay, should be used to measure cell viability under this Test Guideline (27). The tissue sample is placed in MTT solution of appropriate concentration (0.3, 0.5 or 1 mg/mL, see Annex 2 and relevant SOP for details) for 3 hours. The precipitated blue formazan product is then extracted from the tissue using a solvent (e.g. isopropanol, acidic isopropanol), and the concentration of formazan is

measured by determining the OD at 570 nm using a filter band pass of maximum ± 30 nm, or by an HPLC/UPLC spectrophotometry procedure (see paragraphs 30 and 31) (38).

25. Test chemicals may interfere with the MTT assay, either by direct reduction of the MTT into blue formazan, and/or by colour interference if the test chemical absorbs, naturally or due to treatment procedures, in the same OD range of formazan (570 ± 30 nm, mainly blue and purple chemicals). Additional controls should be used to detect and correct for a potential interference from these test chemicals such as the non-specific MTT reduction (NSMTT) control and the non-specific colour (NSC) control (see paragraphs 26 to 30). This is especially important when a specific test chemical is not completely removed from the tissue by rinsing or when it penetrates the epidermis, and is therefore present in the tissues when the MTT viability test is performed. Detailed description of how to correct direct MTT reduction and interferences by colouring agents is available in the SOPs for the test methods (34) (35) (36) (37) (42).

26. To identify direct MTT reducers, each test chemical should be added to freshly prepared MTT medium (34) (35) (36) (37) (42). If the MTT mixture containing the test chemical turns blue/purple, the test chemical is presumed to directly reduce the MTT, and further functional check on non-viable epidermis should be performed, independently of using the standard absorbance (OD) measurement or an HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure. This additional functional check employs killed tissues that possess only residual metabolic activity but absorb the test chemical in similar amount as viable tissues. Each MTT reducing chemical is applied on at least two killed tissue replicates per exposure time, which undergo the whole skin corrosion test. The true tissue viability is then calculated as the percent tissue viability obtained with living tissues exposed to the MTT reducer minus the percent non-specific MTT reduction obtained with the killed tissues exposed to the same MTT reducer, calculated relative to the negative control run concurrently to the test being corrected (%NSMTT).

27. To identify potential interference by coloured test chemicals or test chemicals that become coloured when in contact with water or isopropanol and decide on the need for additional controls, spectral analysis of the test chemical in water (environment during exposure) and/or isopropanol (extracting solution) should be performed. If the test chemical in water and/or isopropanol absorbs light in the range of 570 ± 30 nm, further colorant controls should be performed or, alternatively, an HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure should be used in which case these controls are not required (see paragraphs 30 and 31). When performing the standard absorbance (OD) measurement, each interfering coloured test chemical is applied on at least two viable tissue replicates per exposure time, which undergo the entire skin corrosion test but are incubated with medium instead of MTT solution during the MTT incubation step to generate a non-specific colour (NSCliving) control. The NSCliving control needs to be performed concurrently per exposure time per coloured test chemical (in each run) due to the inherent biological variability of living tissues. The true tissue viability is then calculated as the percent tissue viability obtained with living tissues exposed to the interfering test chemical and incubated with MTT solution minus the percent non-specific colour obtained with living tissues exposed to the interfering test chemical and incubated with medium without MTT, run concurrently to the test being corrected (%NSCliving).

28. Test chemicals that are identified as producing both direct MTT reduction (see paragraph 26) and colour interference (see paragraph 27) will also require a third set of controls, apart from the NSMTT and NSCliving controls described in the previous

paragraphs, when performing the standard absorbance (OD) measurement. This is usually the case with darkly coloured test chemicals interfering with the MTT assay (e.g., blue, purple, black) because their intrinsic colour impedes the assessment of their capacity to directly reduce MTT as described in paragraph 26. These test chemicals may bind to both living and killed tissues and therefore the NSMTT control may not only correct for potential direct MTT reduction by the test chemical, but also for colour interference arising from the binding of the test chemical to killed tissues. This could lead to a double correction for colour interference since the NSCliving control already corrects for colour interference arising from the binding of the test chemical to living tissues. To avoid a possible double correction for colour interference, a third control for non-specific colour in killed tissues (NSKilled) needs to be performed. In this additional control, the test chemical is applied on at least two killed tissue replicates per exposure time, which undergo the entire testing procedure but are incubated with medium instead of MTT solution during the MTT incubation step. A single NSKilled control is sufficient per test chemical regardless of the number of independent tests/runs performed, but should be performed concurrently to the NSMTT control and, where possible, with the same tissue batch. The true tissue viability is then calculated as the percent tissue viability obtained with living tissues exposed to the test chemical minus %NSMTT minus %NSCliving plus the percent non-specific colour obtained with killed tissues exposed to the interfering test chemical and incubated with medium without MTT, calculated relative to the negative control run concurrently to the test being corrected (%NSKilled).

29. It is important to note that non-specific MTT reduction and non-specific colour interferences may increase the readouts of the tissue extract above the linearity range of the spectrophotometer. On this basis, each laboratory should determine the linearity range of their spectrophotometer with MTT formazan (CAS # 57360-69-7) from a commercial source before initiating the testing of test chemicals for regulatory purposes. In particular, the standard absorbance (OD) measurement using a spectrophotometer is appropriate to assess direct MTT-reducers and colour interfering test chemicals when the ODs of the tissue extracts obtained with the test chemical without any correction for direct MTT reduction and/or colour interference are within the linear range of the spectrophotometer or when the uncorrected percent viability obtained with the test chemical already defined it as a corrosive (see paragraphs 35 and 36). Nevertheless, results for test chemicals producing %NSMTT and/or %NSCliving $\geq 50\%$ of the negative control should be taken with caution.

30. For coloured test chemicals which are not compatible with the standard absorbance (OD) measurement due to too strong interference with the MTT assay, the alternative HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure to measure MTT formazan may be employed (see paragraph 31) (37). The HPLC/UPLC-spectrophotometry system allows for the separation of the MTT formazan from the test chemical before its quantification (38). For this reason, NSCliving or NSKilled controls are never required when using HPLC/UPLC-spectrophotometry, independently of the chemical being tested. NSMTT controls should nevertheless be used if the test chemical is suspected to directly reduce MTT or has a colour that impedes the assessment of the capacity to directly reduce MTT (as described in paragraph 26). When using HPLC/UPLC-spectrophotometry to measure MTT formazan, the percent tissue viability is calculated as percent MTT formazan peak area obtained with living tissues exposed to the test chemical relative to the MTT formazan peak obtained with the concurrent negative control. For test chemicals able to directly reduce MTT, true tissue viability is calculated as the percent tissue viability obtained with living tissues exposed to the test chemical minus %NSMTT. Finally, it should be noted that direct MTT-reducers

that may also be colour interfering, which are retained in the tissues after treatment and reduce MTT so strongly that they lead to ODs (using standard OD measurement) or peak areas (using UPLC/HPLC-spectrophotometry) of the tested tissue extracts that fall outside of the linearity range of the spectrophotometer cannot be assessed, although these are expected to occur in only very rare situations.

31. HPLC/UPLC-spectrophotometry may be used also with all types of test chemicals (coloured, non-coloured, MTT-reducers and non-MTT reducers) for measurement of MTT formazan (38). Due to the diversity of HPLC/UPLC-spectrophotometry systems, qualification of the HPLC/UPLC-spectrophotometry system should be demonstrated before its use to quantify MTT formazan from tissue extracts by meeting the acceptance criteria for a set of standard qualification parameters based on those described in the U.S. Food and Drug Administration guidance for industry on bio-analytical method validation (38) (39). These key parameters and their acceptance criteria are shown in Annex 4. Once the acceptance criteria defined in Annex 4 have been met, the HPLC/UPLC-spectrophotometry system is considered qualified and ready to measure MTT formazan under the experimental conditions described in this Test Guideline.

Acceptance Criteria

32. For each test method using valid RhE models, tissues treated with the negative control should exhibit OD reflecting the quality of the tissues as described in table 2 and should not be below historically established boundaries. Tissues treated with the PC, i.e. glacial acetic acid or 8N KOH, should reflect the ability of the tissues to respond to a corrosive chemical under the conditions of the test method (see Annex 2 and relevant SOP for details). The variability between tissue replicates of test chemical and/or control substances should fall within the accepted limits for each valid RhE model requirements (see Annex 2 and relevant SOP for details) (e.g. the difference of viability between the two tissue replicates should not exceed 30%). If either the negative control or PC included in a run fall out of the accepted ranges, the run is considered as not qualified and should be repeated. If the variability of test chemicals falls outside of the defined range, its testing should be repeated.

Interpretation of Results and Prediction Model

33. The OD values obtained for each test chemical should be used to calculate percentage of viability relative to the negative control, which is set at 100%. In case HPLC/UPLC-spectrophotometry is used, the percent tissue viability is calculated as percent MTT formazan peak area obtained with living tissues exposed to the test chemical relative to the MTT formazan peak obtained with the concurrent negative control. The cut-off percentage cell viability values distinguishing corrosive from non-corrosive test chemical (or discriminating between different corrosive sub-categories) are defined below in paragraphs 35 and 36 for each of the test methods covered by this Test Guideline and should be used for interpreting the results.

34. A single testing run composed of at least two tissue replicates should be sufficient for a test chemical when the resulting classification is unequivocal. However, in cases of borderline results, such as non-concordant replicate measurements, a second run may be considered, as well as a third one in case of discordant results between the first two runs.

35. The prediction model for the EpiSkin™ skin corrosion test method (9) (34) (22), associated with the UN GHS (1) classification system, is shown in Table 4:

Table 4. EpiSkin™ prediction model

Viability measured after exposure time points (t=3, 60 and 240 minutes)	Prediction to consider
< 35% after 3 min exposure	Corrosive: Optional Sub-category 1A *
≥ 35% after 3 min exposure AND < 35% after 60 min exposure OR ≥ 35% after 60 min exposure AND < 35% after 240 min exposure	Corrosive: A combination of optional Sub-categories 1B-and-1C
≥ 35% after 3 min exposure	Non-corrosive

*) According to the data generated in view of assessing the usefulness of the RhE test methods for supporting sub-categorisation, it was shown that around 22 % of the Sub-category 1A results of the EpiSkin™ test method may actually constitute Sub-category 1B or Sub-category 1C substances/mixtures (i.e. over classifications) (see Annex 3).

36. The prediction models for the EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), the SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36), the epiCS® (16) (23) (37) and LabCyte EPI-MODEL24 (41) (42) skin corrosion test methods, associated with the UN GHS (1) classification system, are shown in Table 5:

Table 5. EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS® and LabCyte EPI-MODEL24 SCT

Viability measured after exposure time points (t=3 and 60 minutes)	Prediction to be considered
STEP 1 for EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS® and LabCyte EPI-MODEL24 SCT	
< 50% after 3 min exposure	Corrosive
≥ 50% after 3 min exposure AND < 15% after 60 min exposure	Corrosive
≥ 50% after 3 min exposure AND ≥ 15% after 60 min exposure	Non-corrosive
STEP 2 for EpiDerm™ SCT - for substances/mixtures identified as Corrosive in step 1	
< 25% after 3 min exposure	Optional Sub-category 1A *
≥ 25% after 3 min exposure	A combination of optional Sub-categories 1B- and-1C
STEP 2 for SkinEthic™ RHE - for substances/mixtures identified as Corrosive in step 1	
< 18% after 3 min exposure	Optional Sub-category 1A *
≥ 18% after 3 min exposure	A combination of optional Sub-categories 1B- and-1C
STEP 2 for epiCS® - for substances/mixtures identified as Corrosive in step 1	
< 15% after 3 min exposure	Optional Sub-category 1A *
≥ 15% after 3 min exposure	A combination of optional Sub-categories 1B- and-1C
STEP 2 for LabCyte EPI-MODEL24 SCT - for substances/mixtures identified as Corrosive in step 1	
< 15% after 3 min exposure	Optional Sub-category 1A *
≥ 15% after 3 min exposure	A combination of optional Sub-categories 1B- and-1C

* According to the data generated in view of assessing the usefulness of the RHE test methods for supporting sub-categorisation, it was shown that around 29%, 31%, 33% and 30% of the Sub-category 1A results of the EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE, epiCS® and LabCyte EPI-MODEL24 SCT, respectively, may actually constitute Sub-category 1B or Sub-category 1C substances/mixtures (i.e. over-classifications) (see Annex 3).

DATA AND REPORTING

Data

37. For each test, data from individual tissue replicates (e.g. OD values and calculated percentage cell viability for each test chemical, including classification) should be reported in tabular form, including data from repeat experiments as appropriate. In addition, means and ranges of viability and CVs between tissue replicates for each test should be reported. Observed interactions with MTT reagent by direct MTT reducers or coloured test chemicals should be reported for each tested chemical.

Test Report

38. The test report should include the following information:

Test Chemical and Control Substances:

- Mono-constituent substance: chemical identification, such as IUPAC or CAS name, CAS number, SMILES or InChI code, structural formula, purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
- Multi-constituent substance, UVCB and mixture: characterised as far as possible by chemical identity (see above), quantitative occurrence and relevant physicochemical properties of the constituents;
- Physical appearance, water solubility, and any additional relevant physicochemical properties;
- Source, lot number if available;
- Treatment of the test chemical/control substance prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
- Stability of the test chemical, limit date for use, or date for re-analysis if known;
- Storage conditions.

*RhE model and protocol used and rationale for it (if applicable)**Test Conditions:*

- RhE model used (including batch number);
- Calibration information for measuring device (e.g. spectrophotometer), wavelength and band
- pass (if applicable) used for quantifying MTT formazan, and linearity range of measuring device;
- Description of the method used to quantify MTT formazan;
- Description of the qualification of the HPLC/UPLC-spectrophotometry system, if applicable;
- Complete supporting information for the specific RhE model used including its performance. This should include, but is not limited to:
 - i) Viability;
 - ii) Barrier function;
 - iii) Morphology;
 - iv) Quality controls (QC) of the model;
- Reference to historical data of the model. This should include, but is not limited to acceptability of the QC data with reference to historical batch data;
- Demonstration of proficiency in performing the test method before routine use by testing of the proficiency substances.

Test Procedure:

- Details of the test procedure used (including washing procedures used after exposure period);
- Doses of test chemical and control substances used;
- Duration of exposure period(s) and temperature(s) of exposure;
- Indication of controls used for direct MTT-reducers and/or colouring test chemicals, if applicable;
- Number of tissue replicates used per test chemical and controls (PC, negative control, and NSMTT, NSCliving and NSCKilled, if applicable), per exposure time;
- Description of decision criteria/prediction model applied based on the RhE model used;
- Description of any modifications of the test procedure (including washing procedures).
- Run and Test Acceptance Criteria:
- Positive and negative control mean values and acceptance ranges based on historical data;
- Acceptable variability between tissue replicates for positive and negative controls;
- Acceptable variability between tissue replicates for test chemical.

Results:

- Tabulation of data for individual test chemicals and controls, for each exposure period, each run and each replicate measurement including OD or MTT formazan peak area, percent tissue viability, mean percent tissue viability, differences between replicates, SDs and/or CVs if applicable;
- If applicable, results of controls used for direct MTT-reducers and/or colouring test chemicals including OD or MTT formazan peak area, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, differences between tissue replicates, SDs and/or CVs (if applicable), and final correct percent tissue viability;
- Results obtained with the test chemical(s) and control substances in relation to the defined run and test acceptance criteria;
- Description of other effects observed;
- The derived classification with reference to the prediction model/decision criteria used.

*Discussion of the results:**Conclusions:*

LITERATURE

1. UN. (2013). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Geneva. Available at: [\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html\]](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html)
2. OECD. (2015). Guideline for Testing of Chemicals. (No. 404.): Acute Dermal Irritation, Corrosion, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3. OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 430.): In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 435.): In Vitro Membrane Barrier Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. (5) OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 439.): In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
5. OECD. (2015). Guideline for the Testing of Chemicals (No. 439.): In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
6. OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 203.) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
7. Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on In Vitro Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.
8. Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. Toxicol. In Vitro 12, 471-482.
9. Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhtutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol. in Vitro 12, 483-524.
10. Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhtutter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, ATLA 28, pp. 371-401.
11. Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation

- of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23, 129-147.
12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [<http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>].
 13. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: In Vitro Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. Available at: [http://www.iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf].
 14. EC-ECVAM. (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an In Vitro Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].
 15. EC-ECVAM. (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000. Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>].
 16. Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for In Vitro Skin Corrosivity Testing. *Toxicol. In Vitro* 19, 925-929.
 17. Kandárová H., Liebsch M., Spielmann H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for In Vitro Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol. In Vitro* 20, 547-559.
 18. Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24, 1379-1385.
 19. EC-ECVAM. (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].
 20. EC-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an In-Vitro Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].
 21. OECD. (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety

- Publications, Series on Testing and Assessment (No. 190.). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
22. Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28, 131-145.
 23. Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No. 431. *Toxicol. In Vitro* 29, 2055-2080.
 24. OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 219). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
 25. OECD. (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
 26. Eskes C. et al. (2012). Regulatory Assessment of In Vitro Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 62, 393-403.
 27. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
 28. Tinois E., et al. (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human Epidermis In Vitro. In: *In Vitro Skin Toxicology*. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.
 29. Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994). New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol. in Vitro* 8, 889 - 891.
 30. Ponc M., Boelsma E., Weerheim A., Mulder A., Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203, 211 - 225.
 31. Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). In Vitro and Post Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193: 310-319.
 32. Parenteau N.L., Bilbo P., Nolte C.J., Mason V.S. and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9, 163-171.
 33. Wilkins L.M., Watson S.R., Prosky S.J., Meunier S.F. and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8, 747-756.

34. EpiSkin™ (December 2011)SOP, INVITTOX Protocol (No. 118.). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu/hm/>].
35. EpiDerm™ SOP. (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for : In vitro EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu/html>].
36. SkinEthic™ RHE SOP,INVITTOX Protocol (January 2012). SkinEthic™ Skin Corrosivity Test. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu/html>].
37. EpiCS® SOP, Version 4.1 (January 2012). In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems. Available at: [<http://www.ecvam.jrc.ec.europa.eu.html>].
38. Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLCspectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in Preparation.
39. US FDA. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Available at: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].
40. Katoh M., Hamajima F., Ogasawara T., and Ken-ichiro Hata. (2010). Assessment of the human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin corrosion testing according to the OECD test Guideline 431. J Toxicol. Sci. 35, 411-417.
41. LabCyte Validation Management Team (2018). Validation Study for in vitro skin corrosion test method using reconstructed human epidermal tissue LabCyte EPI-MODEL24. Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z1.pdf].
42. LabCyte EPI-MODEL24 SCT SOP, Version 1.6. (May, 2017). Skin corrosion test using the reconstructed human model “LabCyte EPI-MODEL24”. Available at: [http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z2.pdf].
43. Report of the Peer-review of the validation study for LabCyte EPI-MODEL24 In Vitro Skin Corrosion Test Method. Available at [http://www.jacvam.jp/files/doc/01_05/01_05_Z3.pdf].

ANNEX 1- DEFINITIONS

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with “concordance” to mean the proportion of correct outcomes of a test method (25).

Cell viability: Parameter measuring total activity of a cell population e.g. as ability of cellular mitochondrial dehydrogenases to reduce the vital dye MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue), which depending on the endpoint measured and the test design used, correlates with the total number and/or vitality of living cells.

Chemical: means a substance or a mixture.

Concordance: This is a measure of test method performance for test methods that give a categorical result, and is one aspect of relevance. The term is sometimes used interchangeably with accuracy, and is defined as the proportion of all chemicals tested that are correctly classified as positive or negative. Concordance is highly dependent on the prevalence of positives in the types of test chemical being examined (25).

ET50: Can be estimated by determination of the exposure time required to reduce cell viability by 50% upon application of the benchmark chemical at a specified, fixed concentration, see also IC50.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): A system proposing the classification of chemicals (substances and mixtures) according to standardized 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).

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment.

IC50: Can be estimated by determination of the concentration at which a benchmark chemical reduces the viability of the tissues by 50% (IC50) after a fixed exposure time, see also ET50.

ET50. Infinite dose: Amount of test chemical applied to the epidermis exceeding the amount required to completely and uniformly cover the epidermis surface.

Mixture: means a mixture or 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).

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue tetrazolium bromide.

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.

NC: Non corrosive.

NSCKilled control: Non-Specific Colour control in killed tissues.

NSCliving control : Non-Specific Colour control in living tissues.

NSMTT: Non-Specific MTT reduction.

OD: Optical Density

PC: 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.

Performance standards (PS): Standards, based on a validated test method, that provide a basis for evaluating the comparability of a proposed test method that is mechanistically and functionally similar. Included are: (i) essential test method components; (ii) a minimum list of Reference Chemicals selected from among the chemicals used to demonstrate the acceptable performance of the validated test method; and (iii) the similar levels of reliability and accuracy, based on what was obtained for the validated test method, that the proposed test method should demonstrate when evaluated using the minimum list of Reference Chemicals (25).

Relevance: Description of relationship of the test method to the effect of interest and whether it is meaningful and useful for a particular purpose. It is the extent to which the test method correctly measures or predicts the biological effect of interest. Relevance incorporates consideration of the accuracy (concordance) of a test method (25).

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 (25).

Run: A run consists of one or more test chemicals tested concurrently with a negative control and with a PC.

Sensitivity: The proportion of all positive/active chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (25).

Skin corrosion in vivo: The production of irreversible damage of the skin; namely, visible necrosis through the epidermis and into the dermis, following the application of a test chemical for up to four hours. Corrosive reactions are typified by ulcers, bleeding, bloody scabs, and, by the end of observation at 14 days, by discoloration due to blanching of the skin, complete areas of alopecia, and scars. Histopathology should be considered to evaluate questionable lesions.

Specificity: The proportion of all negative/inactive chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (25).

Substance: means 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: means what is being tested.

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography.

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

ANNEX 2 - MAIN TEST METHOD COMPONENTS OF THE RHE TEST METHODS VALIDATED FOR SKIN CORROSION TESTING

Nr.	1	2	3	4	5
Test Method Component	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
Model surface	0.38 cm ²	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.6 cm ²	0.3 cm ²
Number of tissue replicates	At least 2 per exposure time	2-3 per exposure time	At least 2 per exposure time	At least 2 per exposure time	At least 2 per exposure time
Treatment doses and application	<p><u>Liquids and viscous</u>: 50 ± 3 µL (131.6 µL/cm²)</p> <p><u>Solids</u>: 20± 2 mg (52.6 mg/cm²) +100 µL=5µL NaCl solution (9 g/L)</p> <p><u>Waxy/sticky</u>: 50 ± 2 mg (131.6 mg/cm²) with a nylon mesh</p>	<p><u>Liquids</u>: 50 µL (79.4 µL/cm²) with or without a nylon mesh</p> <p><i>Pre-test compatibility of test chemical with nylon mesh</i></p> <p><u>Semi solids</u>: 50 µL (79.4 µL/cm²)</p> <p><u>Solids</u>: 25 µL H₂O (or necessary) + 25 mg (39.7 mg/cm²)</p> <p><u>Waxes</u>: flat "disc like" piece of ca. 8 mm diameter placed atop the tissue wetted with 15µL H₂O.</p>	<p><u>Liquids and viscous</u>: 40 ± 3 µL (80µL/cm²) using nylonmesh</p> <p><i>Pre-test compatibility of test chemical with nylon mesh</i></p> <p><u>Solids</u>: 20 µL ± 2µL H₂O + 20± 3 mg (40 mg/cm²)</p> <p><u>Waxy/sticky</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) with a nylon mesh</p>	<p><u>Liquids and viscous</u>: 50 µL (83.3µL/cm²) using nylonmesh</p> <p><i>Pre-test compatibility of test chemical with nylon mesh</i></p> <p><u>Semi solids</u>: 50 µL (83.3 µL/cm²)</p> <p><u>Solids</u>: 25 mg (41.7 mg/cm²) + 25 µL H₂O (or more if necessary)</p> <p><u>Waxy/sticky</u>: flat "cookie like" piece of ca. 8 mm diameter placed atop the tissue wetted with 15µL H₂O</p>	<p><u>Liquids and viscous</u>: 50 µL (166.7µL/cm²)</p> <p><u>Solids</u>: 50± 2 mg (166.7 mg/cm²) + 50 µL H₂O</p> <p><u>Waxy</u>: Use a positive displacement pipette and tip as liquid and viscous substance.</p>

Nr.	1	2	3	4	5
Test Method Component	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
Pre-check for direct MTT reduction	50 µL (liquid) or 20 mg (solid) + 2 mL MTT 0.3 mg/mL solution for 180±5 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH → if solution turns blue/purple, water-killed adapted controls should be performed	50 µL (liquid) or 25 mg (solid) + 1 mL MTT 1 mg/mL solution for 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH → if solution turns blue/purple, freeze-killed adapted controls should be performed	40 µL (liquid) or 20 mg (solid) + 1 mL MTT 1 mg/mL solution for 180±15 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH → if solution turns blue/purple, freeze-killed adapted controls should be performed	50 µL (liquid) or 25 mg (solid) + 1 mL MTT 1 mg/mL solution for 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH → if solution turns blue/purple, freeze-killed adapted controls should be performed	50 µL (liquid) or 50 mg (solid) + 500 µL MTT 0.5 mg/mL solution for 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH → if solution turns blue/purple, freeze-killed adapted controls should be performed
Pre-check for colour interference	10 µL (liquid) or 10 mg (solid) + 90 µL H ₂ O mixed for 15 min at RT → if solution becomes coloured, living adapted controls should be performed	50 µL (liquid) or 25 mg (solid) + 300 µL H ₂ O mixed for 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH → if solution becomes coloured, living adapted controls should be performed	40 µL (liquid) or 20 mg (solid) + 300 µL H ₂ O mixed for 60 min at RT → if solution becomes coloured, living adapted controls should be performed	50 µL (liquid) or 25 mg (solid) + 300 µL H ₂ O mixed for 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH → if solution becomes coloured, living adapted controls should be performed	50 µL (liquid) or 50 mg (solid) + 500 µL H ₂ O mixed for 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH → if solution becomes coloured, living adapted controls should be performed
Exposure time and temperature	3 min, 60 min (±5 min) and 240 min (±10 min) In ventilated cabinet Room Temperature (RT, 18-28°C)	3 min at RT, and 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH	3 min at RT, and 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH	3 min at RT, and 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH	3 min at RT, and 60 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95% RH
Rinsing	25 mL 1x PBS (2 mL/throwing)	20 times with a constant soft stream of 1x PBS	20 times with a constant soft stream of 1x PBS	20 times with a constant soft stream of 1x PBS	10 times or more with a constant strong stream of 1x PBS
Negative control	50 µL NaCl solution (9 g/L) Tested with every exposure time	50 µL H ₂ O Tested with every exposure time	40 µL H ₂ O Tested with every exposure time	50 µL H ₂ O Tested with every exposure time	50 µL H ₂ O Tested with every exposure time
Positive control	50 µL Glacial acetic acid Tested only for 4 hours	50 µL 8N KOH Tested with every exposure time	40 µL 8N KOH Tested only for 1 hour	50 µL 8N KOH Tested with every exposure time	50 µL 8N KOH Tested only for 1 hour
MTT solution	2 mL 0.3 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	500 µL 0.5 mg/mL
MTT incubation	180 min (±15 min) at 37°C, 5%	180 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95%	180 min (±15 min) at 37°C, 5%	180 min at 37°C, 5% CO ₂ , 95%	180 min (±5 min) at 37°C, 5%

Nr.	1	2	3	4	5
Test Method Component	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
time and temperature	CO2, 95% RH	RH	CO2, 95% RH	RH	CO2, 95% RH
Test Method Component	EpiSkin™ EIT	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE EIT	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
Extraction solvent	500 µL acidified isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) (isolated tissue fully immersed)	2 mL isopropanol (extraction from top and bottom of insert)	1.5 mL isopropanol (extraction from top and bottom of insert)	2 mL isopropanol (extraction from top and bottom of insert)	300 µL isopropanol (isolated tissue fully immersed)
Extraction time And temperature	Overnight at RT, protected from light	Overnight without shaking at RT or for 120 min with shaking (~120 rpm) at RT	Overnight without shaking at RT or for 120 min with shaking (~120 rpm) at RT	Overnight without shaking at RT or for 120 min with shaking (~120 rpm) at RT	Overnight at RT, protected from light
OD reading	570 nm (545 - 595 nm) without reference filter	570 nm (or 540 nm) without reference filter	570 nm (540 - 600 nm) without reference filter	540 - 570 nm without reference filter	570 nm with reference filter 650 nm
Tissue Quality Control	18 hours treatment with SDS 1.0mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3.0mg/mL	Treatment with 1% Triton X-100 4.08 hours ≤ ET ₅₀ ≤ 8.7 hours	Treatment with 1% Triton X-100 4.0 hours ≤ ET ₅₀ ≤ 10.0 hours	Treatment with 1% Triton X-100 2.0 hours ≤ ET ₅₀ ≤ 7.0 hours	18 hours treatment with SDS 1.4mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 4.0 mg/mL
Acceptability Criteria	<p>1. Mean OD of the tissue replicates treated with the negative control (NaCl) should be ≥ 0.6 and ≤ 1.5 for every exposure time</p> <p>2. Mean viability of the tissue replicates exposed for 4 hours with the positive control (glacial acetic acid), expressed as % of the negative control, should be ≤ 20%</p> <p>3. In the range 20-100% viability and for ODs ≥ 0.3, difference of viability between the two tissue replicates should not</p>	<p>1. Mean OD of the tissue replicates treated with the negative control (H₂O) should be ≥ 0.8 and ≤ 2.8 for every exposure time</p> <p>2. Mean viability of the tissue replicates exposed for 1 hour with the positive control (8N KOH), expressed as % of the negative control, should be ≤ 15%</p> <p>3. In the range 20 - 100% viability, the Coefficient of Variation (CV) between tissue replicates should be ≤ 30%</p>	<p>1. Mean OD of the tissue replicates treated with the negative control (H₂O) should be ≥ 0.8 and ≤ 3.0 for every exposure time</p> <p>2. Mean viability of the tissue replicates exposed for 1 hour (and 4 hours, if applicable) with the positive control (8N KOH), expressed as % of the negative control, should be ≤ 15%</p> <p>3. In the range 20-100% viability and for ODs ≥ 0.3, difference of viability between the two</p>	<p>1. Mean OD of the tissue replicates treated with the negative control (H₂O) should be ≥ 0.8 and ≤ 2.8 for every exposure time</p> <p>2. Mean viability of the tissue replicates exposed for 1 hour with the positive control (8N KOH), expressed as % of the negative control, should be ≤ 15%</p> <p>3. In the range 20-100% viability and for ODs ≥ 0.3, difference of viability between the two tissue replicates should not</p>	<p>1. Mean OD of the tissue replicates treated with the negative control (H₂O) should be ≥ 0.7 and ≤ 2.5 for every exposure time</p> <p>2. Mean viability of the tissue replicates exposed for 1 hour with the positive control (8N KOH), expressed as % of the negative control, should be ≤ 15%</p> <p>3. In the range 20-100% viability and for ODs ≥ 0.3, difference of viability between the two tissue replicates should not</p>

Nr.	1	2	3	4	5
Test Method Component	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
	exceed 30%.		tissue replicates should not exceed 30%.	exceed 30%.	exceed 30%.

ANNEX 3 - PERFORMANCE OF TEST METHODS FOR SUB-CATEGORISATION

The table below provides the performances of the five test methods calculated based on a set of 79 or 80 chemicals tested by the five test developers. Calculations of four test methods (EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE and epiCS®) were performed by the OECD Secretariat, reviewed and agreed by an expert subgroup (21) (23). Calculation of LabCyte EPI-MODEL24 SCT was performed by the test developer, reviewed and agreed by the validation management group and a peer review panel (41) (43).

STATISTICS ON PREDICTIONS OBTAINED ON THE ENTIRE SET OF CHEMICALS

(n= 80 chemicals tested over 2 independent runs for epiCS® or 3 independent runs for EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ and SkinEthic™ RHE i.e. respectively 159* or 240 classifications.)

n= 79** chemicals tested over 3 independent runs for LabCyte EPI-MODEL24 SCT, i.e. 237 classification.)

*one chemical was tested once in epiCS® because of no availability (23).

** one chemical was not tested in LabCyte EPI-MODEL24 SCT because of no availability.

	EpiSkin	EpiDerm	SkinEthic	epiCS	LabCyte EPI- MODEL24
Overclassifications:					
1B-and-1C overclassified 1A	21.5%	29.0%	31.2%	32.8%	30.0%
NC overclassified 1B-and-1C	20.7%	23.4%	27.0%	28.4%	18.9%
NC overclassified 1A	0.0%	2.7%	0.0%	0.0%	2.7%
Overclassified as Corrosive	20.7%	26.1%	27.0%	28.4%	21.6%
Global overclassification rate (all categories)	17.9%	23.3%	24.5%	25.8%	21.5%
Underclassifications:					
1A underclassified 1B-and-1C	16.7%	16.7%	16.7%	12.5%	13.9%
1A underclassified NC	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
1B-and-1C underclassified NC	2.2%	0.0%	7.5%	6.6%	0.0%
Global underclassification rate (all categories)	3.3%	2.5%	5.4%	4.4%	2.1%
Correct Classifications:					
1A correctly classified	83.3%	83.3%	83.3%	87.5%	86.1%
1B-and-1C correctly classified	76.3%	71.0%	61.3%	60.7%	70.0%
NC correctly classified	79.3%	73.9%	73.0%	71.62%	78.4%
Overall Accuracy	78.8%	74.2%	70.0%	69.8%	76.4%

ANNEX 4 - Key parameters and acceptance criteria for qualification of an HPLC/UPLC-spectrophotometry system for measurement of MTT formazan extracted from RhE tissues

Parameter	Protocol Derived from FDA Guidance (36)(38)	Acceptance Criteria
Selectivity	Analysis of isopropanol, living blank (isopropanol extract from living RhE tissues without any treatment), dead blank (isopropanol extract from killed RhE tissues without any treatment)	$\text{Area}_{\text{interference}} = 20\%$ of $\text{Area}_{\text{LLOQ}}^1$
Precision	Quality Controls (i.e., MTT formazan at 1.6 g/mL, 16 g/mL and 160 g/mL) in isopropanol (n=5)	CV = 15% or = 20% for the LLOQ
Accuracy	Quality Controls in isopropanol (n=5)	%Dev = 15% or = 20% for LLOQ
Matrix Effect	Quality Controls in living blank (n=5)	85% = %Matrix Effect= 115%
Carryover	Analysis of isopropanol after an ULOQ ² standard	$\text{Area}_{\text{interference}} = 20\%$ of $\text{Area}_{\text{LLOQ}}$
Reproducibility (intra-day)	3 independent calibration curves (based on 6 consecutive 1/3 dilutions of MTT formazan in isopropanol starting at ULOQ, i.e., 200 g/mL); Quality Controls in isopropanol (n=5)	Calibration Curves: %Dev = 15% or = 20% for LLOQ Quality Controls: %Dev= 15% and CV = 15%
Reproducibility (inter-day)	Day 1: 1 calibration curve and Quality Controls in isopropanol (n=3) Day 2: 1 calibration curve and Quality Controls in isopropanol (n=3) Day 3: 1 calibration curve and Quality Controls in isopropanol (n=3)	
Short Term Stability of MTT Formazan in RhE Tissue Extract	Quality Controls in living blank (n=3) analysed the day of the preparation and after 24 hours of storage at room temperature	%Dev = 15%
Long Term Stability of MTT Formazan in RhE Tissue Extract, if required	Quality Controls in living blank (n=3) analysed the day of the preparation and after several days of storage at a specified temperature (e.g., 4°C, -20°C, -80°C)	%Dev = 15%

Note:

¹LLOQ: Lower Limit of Quantification, defined to cover 1-2% tissue viability, i.e., 0.8 µg/mL.

²ULOQ: Upper Limit of Quantification, defined to be at least two times higher than the highest expected MTT formazan concentration in isopropanol extracts from negative controls i.e., 200 µg/mL.

“화장품 피부감작성 동물대체시험법

(인체피부모델을 이용한 피부부식 시험법) 가이드라인(민원인 안내서)”

발 행 일 2019 년 9 월

발 행 인 식품의약품안전평가원장

편 집 위 원 장 독성평가연구부장 정자영

편 집 위 원

도 움 주 신 분 김규봉, 김배환, 김보라, 배옥남, 안수선, 정미숙,
양성준, 권경진

문 의 처 식품의약품안전평가원, 특수독성과

Tel : 043-719-5153, 5155 Fax : 043-719-5150

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