

화장품 등 피부자극 동물대체시험법
[인체피부모델을 이용한 피부자극 시험법]
가이드라인
(민원인 안내서)

2021. 8.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

화장품 등 피부자극 동물대체시험법(인체피부모델을 이용한 피부자극 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 행정 사무의 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 기술 하는 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. 2021년 8월 31일 <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> 담당자 확 인(부서장) 강남희 김광진 </div>		

이 안내서는 화장품 등 피부자극 동물대체시험법(인체피부모델을 이용한 피부자극 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 2021년 8월 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: 043-719-5153, 5155

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연 번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2014-4-001	2014.4.	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(V) 제정
2	안내서-0752-01	2017.5.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)
3	안내서-0752-02	2021.8.	제목을 “ 화장품 등 피부자극 동물대체시험법(인체피부모델을 이용한 피부자극 시험법) 가이드라인”으로 수정, 내용 정비 및 OECD 가이드라인 영문본을 추가하여 개정

목 차

I. 개요	6
II. 시험원리	6
III. 제한점 및 고려사항	7
IV. 시험방법	7
V. 결과 판정	9
VI. 시험결과 및 보고	10
- 별첨 1 : 번역본 (OECD TG 439)	
- 별첨 2 : 원문 (OECD TG 439)	

화장품 등 피부자극 동물대체시험법 (인체피부모델을 이용한 피부자극 시험법) 가이드라인

I. 개요

본 시험법은 인체피부 상층부인 표피(epidermis)의 생화학적 및 생리학적 특성을 매우 유사하게 모방한 인체피부모델(Reconstructed human Epidermis, RhE)을 이용하여 UN GHS 기준에 따라 피부자극 물질을 구별하는 생체외(*in vitro*) 피부자극 시험법이다.

본 시험법은 생체내(*in vivo*) 피부자극 시 발생하는 작용기전의 초기 단계인 세포 및 조직 손상을 직접적으로 다룬다. 시험물질을 인체피부모델에 국소적으로 적용하여 일정 시간 노출시킨 후 MTT 분석법으로 세포 생존율을 측정하여 시험물질의 피부자극을 평가한다.

본 가이드라인에는 7개의 검증된 시험법이 포함되어 있으며 각 시험법은 상용화된 인체피부모델(EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ RHE, LabCyte EPI-MODEL24, epiCS®, Skin+®, KeraSkin™)을 사용한다.

II. 시험원리

피부자극물질은 각질층을 투과하여 피부세포의 기초가 되는 부분을 손상시킬 수 있으며, 손상된 세포는 진피층의 세포, 특히 혈관의 기질 세포와 내피세포에 염증 반응을 일으킨다. 이로 인한 내피세포의 확장과 투과성의 증가는 홍반과 부종을 유발하며 이는 피부자극의 주요 특징으로 나타난다. 본 시험법은 이러한 원리를 바탕으로 시험물질에 의한 세포 및 조직 손상 정도를 측정하여 피부자극물질을 구별할 수 있다. 인체유래 각질세포로 구성된 인체피부모델에 시험물질을 국소적으로 적용한 후 MTT 분석법으로 세포 생존율을 측정하여 시험물질의 피부자극성을 평가한다.

III. 제한점 및 고려사항

본 시험법은 각 국가의 규제 체계에 따라 단독으로 사용하거나 통합독성평가

(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)에서 시험전략(testing strategy) 내의 일부로 사용하여 UN GHS category 2(피부자극물질) 또는 No Category(비자극성 물질) 물질을 구별할 수 있다.

본 시험법은 고체, 액체, 반고체 및 왁스에 적용할 수 있으며, 가능하다면 고체는 적용 전에 고운 분말로 갈아서 사용해야 한다. 가스와 에어로졸은 검증 연구에서 아직 평가되지 않았으므로 본 가이드라인에서는 허용하지 않는다.

세포 생존을 측정에 활용되는 MTT 포르마잔과 동일한 파장에서 빛을 흡수하는 시험물질이거나 생체염료인 MTT를 MTT 포르마잔으로 직접 환원시킬 수 있는 시험물질은 세포 생존을 측정을 간접할 수 있으므로 이를 보정하기 위한 추가적인 대조군 사용이 필요할 수 있다.

IV. 시험방법

4.1 인체피부모델 및 시험물질 준비

시험을 수행하기 전 각 배치(batch)의 인체피부모델에 대해 개발자 또는 공급자가 설정한 음성대조군 흡광도(OD) 값의 허용 범위(상한 및 하한 값)를 충족하는지 확인해야 한다. 본 시험 가이드라인에서 검증된 7개 인체피부모델의 음성대조군 OD 값의 허용 범위는 표 1에 제시되어 있다.

표 1. 검증된 인체피부모델의 음성대조군 OD 값 허용 범위

인체피부모델	허용 하한 값	허용 상한 값
EpiSkin™(SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24	≥ 0.7	≤ 2.5
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8
Skin+®	≥ 0.8	≤ 2.5
KeraSkin™	≥ 0.7	≤ 1.6

또한, 각 인체피부모델은 품질 관리 기준을 충족하는 경우(개발자 또는 공급자가 정한 생산 출하 기준에 부합하는 경우)에만 사용할 수 있다. 이는 SDS(sodium dodecyl

sulfate) 또는 Triton X-100에 대한 IC₅₀ 값이나 ET₅₀ 값으로 입증할 수 있으며, 검증된 7개 인체피부모델의 SDS와 Triton X-100에 대한 IC₅₀ 또는 ET₅₀ 허용 범위(상한 및 하한 값)는 표 2에 제시되어 있다.

표 2. 검증된 인체피부모델의 품질 관리 기준

인체피부모델	허용 하한 값	허용 상한 값
EpiSkin™(SM) (SDS 18시간 처리)	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™SIT (EPI-200) (1% Triton X-100)	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 8.7 시간
SkinEthic™RHE (1% Triton X-100)	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 10.0 시간
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (SDS 18시간 처리)	IC ₅₀ = 1.4 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL
epiCS® (1% Triton X-100)	ET ₅₀ = 2.0 시간	ET ₅₀ = 7.0 시간
Skin+® (1% Triton X-100)	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 9.0 시간
KeraSkin™ SIT (SDS 18시간 처리)	IC ₅₀ = 1.5 mg/mL	IC ₅₀ = 4.8 mg/mL

액체시험물질은 원물질 그대로 사용하며, 고체시험물질은 가능하다면 적용 전에 고운 분말로 갈아서 사용하고 다른 전처리는 필요하지 않다. 음성대조물질은 증류수 또는 인산염완충용액(PBS)을 사용하고, 양성대조물질은 5% 수용성 SDS를 사용한다.

매 시험마다 동시 음성대조군 및 양성대조군을 사용하고, 각 시험물질과 대조 물질에 대해 최소한 3개의 반복시험을 사용한다.

4.2 시험물질 및 대조물질 적용

액체 및 고체 시험물질은 모델의 표면을 균일하게 덮을 수 있도록 충분한 양을 적용한다. 고체물질의 경우, 처리하기 전에 시험물질이 표면에 쉽게 접촉될 수 있도록 탈이온수(DPBS) 또는 증류수로 표피의 표면을 적셔준다. 시험법에 따라 시험물질이 표면에 잘 퍼지도록 나일론 메쉬를 사용할 수도 있다.

각 RhE 시험법에 따라 시험물질의 적용 시간(15~60분) 및 배양 온도(20 °C~37 °C)는 다를 수 있으며 이는 각 시험법에 사용하는 인체피부모델의 고유한 특성(예: 장벽 기능)에 기반한다.

시험물질 적용이 끝난 후 수용성 완충제(PBS 등) 또는 0.9% 염화나트륨(NaCl) 용액을 사용하여 표피의 표면을 세척한다. 세척이 끝나면 세포배양배지에 넣어 37 °C에서 42시간 동안 후배양(post-incubation) 한다.

4.3 세포 생존율 측정

세포 생존율을 정량화하기 위해 MTT 분석법을 사용한다. 조직 모델에 MTT 용액을 넣고 3시간 동안 반응시킨 후 이소프로판올(또는 유사한 용매)을 이용하여 조직에서 청색의 MTT 포르마잔 침전물을 추출한다. MTT 포르마잔의 농도는 표준흡광도를 측정하거나 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용하여 정량화할 수 있다. 시험물질이 MTT에 직접 작용하거나(예: MTT 환원제) 원래 색상이 있거나 또는 조직 처리 중에 착색되는 경우 추가 대조군을 사용하여 시험물질이 생존율 측정을 간섭하는지 확인하고 이를 보정해야 한다(별첨1-27~32항 참조).

V. 결과 판정

5.1 결과 판정

판정기준은 시험물질을 적용 및 후배양 시킨 후의 평균 조직 생존율이 50% 이하 ($\leq 50\%$)인 경우, UN GHS에 따른 분류 및 표시가 필요(Category 2 또는 Category 1)한 것으로 간주한다.

평균 조직 생존율(%)	판정
≤ 50	피부자극성
> 50	비자극성

그러나 본 가이드라인에 포함된 RhE 시험법은 UN GHS Category 1과 Category 2를 구분할 수 없으므로 최종 분류를 결정하기 위해 피부부식성에 관한 추가 정보가 필요하다. 시험물질이 비피부부식성으로 확인되고(TG 430, 431, 435에 근거하여), 시험물질 적용 및 후배양 시킨 후의 평균 조직 생존율이 50% 이하($\leq 50\%$)로 나타나면 해당 시험물질은 UN GHS Category 2(피부자극성 물질)로 간주한다.

또한, 각국의 규제 체계에 따라(예: UN GHS Category 3을 채택하지 않는 경우) 시험물질을 적용 및 후배양 시킨 후의 평균 조직 생존율이 50%를 초과($> 50\%$)하는

경우에는 UN GHS No Category로 간주할 수 있다.

5.2 인정 요건

각 RhE 시험법에 대해, 음성대조군(증류수 또는 PBS)의 평균 흡광도 값과 양성 대조군(5% 수용성 SDS)의 평균 조직 생존율은 기존에 확립된 허용 범위를 충족해야 한다. 또한 조직 반복시험 측정 값 간의 표준편차(SD)는 각 시험법의 허용 범위 내에 있어야 한다(별첨 1의 부록 3, 표 2 참조).

VI. 시험결과 및 보고

데이터는 각 시험의 조직 반복시험(replicate tissue)의 데이터(예: 각 시험물질의 흡광도 값, 세포 생존율 데이터 계산 값, 분류)와 관련 반복실험 데이터, 평균 \pm SD 값 등을 표 형식으로 요약한다. 각 시험물질에 대해 MTT 용액, 유색 시험물질 간의 상호작용도 보고해야 한다. 시험결과보고서에는 다음의 내용을 포함하도록 한다.

시험물질

- 물리적 특성, 용해도, 물리화학적 특성 및 출처(시판되는 경우 제품번호)
- 단일성분물질의 경우 구조식, 순도 및 적절하고 실질적으로 제공 가능한 불순물의 화학 물질 정보 등
- 다성분물질, UVCB 및 복합물질의 경우 구성성분의 화학물질 정보로 파악 가능한 특성, 구성성분의 정량적 비율, 물리화학적 특성
- 시험 전 시험물질 및 대조물질의 처리(예: 가온, 분쇄 등) 여부(해당되는 경우)
- 시험물질의 안정성, 사용기한 및 보관 조건

시험조건

- 사용된 RhE 모델(배치 번호 포함)
- 측정기기의 보정 정보(예: 분광광도계), MTT 포르마잔 정량화에 사용되는 파장 및 밴드 패스(해당되는 경우), 측정기기의 직선 범위 및 MTT 포르마잔 정량화 방법에 대한 설명
- HPLC/UPLC-spectrophotometry 시스템의 적격성에 대한 설명(해당되는 경우), 사용된 RhE 모델의 생존율, 장벽기능, 형태적 특징 및 품질 관리 등에 대한 설명

시험 절차

- 사용된 시험 절차의 세부사항(세척과정 등), 시험물질 및 대조물질의 용량, 적용 시간 및 온도, 적용 후 배양 기간

- MTT 직접 환원제 및 유색 시험물질에 사용된 대조군에 대한 설명(해당되는 경우)
- 시험물질군 및 대조군의 반복시료 수(양성대조군, 음성대조군, NSMTT, NSCliving 및 NSCKilled 등, 적용가능 한 경우)
- 사용된 RhE 모델 시험법의 판정기준 및 예측모델에 대한 설명

결과

- 각 시험물질군 및 대조군의 적용기간, 반복실험, 각 시료의 측정값(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, 조직 생존율, 평균 조직 생존율, 조직 반복시료간의 표준 편차 또는 변동계수)에 관한 데이터의 도표화
- 해당되는 경우, MTT 직접 환원제 및 유색 시험물질에 사용되는 대조군의 시험 결과(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, SD, 최종적으로 보정된 조직 생존율)
- 정해진 시험 회차 및 시험물질군과 대조군의 허용기준에 대한 결과
- 사용된 예측모델/판정기준에 근거한 분류

결과 토의

- 시험을 수행하는 동안 확인된 본 가이드라인과의 편차 및 이러한 편차가 시험에 영향을 주었는지의 여부

별첨 1. 번역본(OECD TG 439)

인체피부모델을 이용한 피부자극 시험법

In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method

개요

1. 피부자극은 단일물질 또는 혼합물에 노출된 후 피부에 발생하는 가역적인 손상을 지칭한다[UN의 '화학물질의 분류 및 표시에 관한 세계조화시스템 (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, 이하 GHS)'에 의한 정의](1). 본 시험 가이드라인은 UN GHS Category 2에 따라 자극성 화학물질(단일물질 및 혼합물)의 유해성 확인을 위해 사용할 수 있는 생체외(*in vitro*) 시험법을 제공한다(1)(2). UN GHS의 선택 사항인 Category 3(약한 자극 물질)을 채택하지 않는 회원국 또는 지역에서도 분류되지 않는(non-classified) 물질을 확인하는데 본 시험 가이드라인을 사용할 수 있다. 따라서 각 국가의 규제 체계 및 분류 체계에 따라 본 시험 가이드라인을 생체내(*in vivo*) 피부자극시험의 대체시험법으로 단독 사용하거나 시험전략(testing strategy) 내에서 일부 대체시험법으로 사용하여 화학물질의 피부자극성을 결정할 수 있다(3).

2. 일반적으로 피부자극 평가는 실험동물의 사용을 포함한다[OECD TG 404, 1981년 최초 채택, 1992년, 2002년, 2015년 개정](4). 부식성 시험의 경우 검증된 세 가지 생체외 시험법이 OECD TG 430, 431 및 435로 채택되었다(5)(6)(7). 피부부식 및 자극 통합독성평가(IATA)에 대한 가이드라인 지침서 203번(Guidance Document No. 203)은 정보 출처 및 분석 도구를 그룹화 하는 몇 가지 모듈을 설명하고, (i) 화학물질의 피부자극 및 피부부식 가능성 평가를 위해 기존 시험 및 비시험(non-test) 데이터를 통합하고 사용 방법에 대한 지침을 제공하며, (ii) 추가 시험이 필요한 경우에 대한 접근법을 제안한다(3).

3. 본 시험 가이드라인은 인체 건강 평가항목인 피부자극을 다루고 있다. 본 시험 가이드라인은 인체피부 상층부인 표피(epidermis)의 생화학적 및 생리학적 특성을 매우 유사하게 모방하여 재구성한 인체 표피(Reconstructed human Epidermis, 이하 RhE)의

생체의 시험계를 기반으로 한다. RhE 시험계는 전형적인 표피 조직 구조 및 세포 구성(cytoarchitecture)을 가진 모델을 구성하기 위해 인체유래의 비형질전환 각질세포를 세포원으로 사용한다. 유사시험법평가기준(Performance Standards, PS)은 가이드라인 지침서 34번(Guidance Document No. 34)의 원칙에 따른 RhE 기반 유사 시험법이나 변형된 시험법의 검증과 평가를 용이하게 한다(8)(9). 본 시험 가이드라인은 2010년에 최초로 채택되어, 2013년에 RhE 모델을 사용하는 추가 시험법을 포함시키기 위해 개정되었으며, 2015년에는 GD 203을 반영하고 생존율 측정을 위한 대체 방법을 도입하기 위해 개정되었고, 이후 RhE 모델을 사용하는 시험법을 추가하기 위해 개정되었다.

4. 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법의 목록 및 각 시험법 검증에 사용된 검증 연구의 유형에 관한 정보는 부록 2에 수록되어 있다. 부록 2에 제시된 것처럼 검증된 참고 시험법(Validated Reference Method, 이하 VRM)이 현재의 시험 가이드라인 및 유사시험법평가기준(8)을 개발하는 데 사용되었다. 독립적인 전문평가(peer-review)에서 본 시험 가이드라인에 포함된 모든 시험법은 최소한의 예측력(민감도 80%, 특이도 70%, 정확도 75%)을 충족하는 것으로 확인되었다. 데이터 상호인정(Mutual Acceptance of Data)은 유사시험법평가기준(8)에 따라 검증되어 OECD가 검토 및 채택한 시험법에 대해서만 보장될 수 있다. 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법은 생체의 피부자극 시험법의 시험결과에 대한 국가의 요구사항을 다루는데 시험법의 구별 없이 사용할 수 있으며 동시에 데이터 상호인정의 적용을 받을 수 있다.

5. 용어정의는 부록 1에 수록되어 있다.

초기 고려사항 및 제한점

6. RhE 시험법의 특성을 기술하고 평가한 전향적 검증연구에서 입증된 바와 같이 (16) 본 시험 가이드라인의 제한점은 선택사항인 UN GHS Category 3(약한 자극물질)에 속하는 물질은 분류할 수 없다는 것이다(1). 그러므로 회원국의 규제 체계에 따라 본 시험 가이드라인을 어떻게 사용할지 결정한다. 단일 피부 노출 후 발생하는 국소 피부 자극에 대한 전체 평가를 위해서 통합독성평가(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)에 관한 가이드라인 지침서 203번(Guidance Document No. 203)을 참조해야 한다(3). 인체 피부의 사용은 국내외의 윤리적 고려사항과 조건의 영향을 받는다.

7. 본 시험 가이드라인은 인체 건강 평가항목인 피부자극을 다룬다. 본 시험 가이드라인은 피부 부식에 대해 충분한 정보를 제공하지 않지만, 피부 부식에 관한 OECD TG 431이 동일한 RhE 시험계를 기반으로 한다(단 프로토콜은 상이함)(6). 본 시험 가이드라인은 사람의 생체외 표적기관(*in vitro* the target organ of the species of interest)에 해당하는 인체 각질세포를 이용한 RhE 모델에 기반하고 있다. 또한 생체내 자극 시 발생하는 염증의 단계적 반응 및 작용기전(국소적 외상을 일으키는 세포 및 조직 손상)의 초기 단계를 직접적으로 다루고 있다. 본 시험 가이드라인의 기반이 되는 VRM 검증 연구에서는 광범위한 화학물질을 시험하였고, VRM 검증 연구 데이터베이스는 총 58개의 화학물질을 포함한다(16)(18)(23). 본 시험 가이드라인은 고체 및 액체, 반고체, 왁스에 적용할 수 있다. 액체는 수성 또는 비수성, 고체는 수용성 또는 비수용성일 수 있다. 가능하다면 고체는 적용 전에 고운 분말로 갈아야 하며, 다른 전처리는 필요하지 않다. 가스와 에어로졸은 검증 연구에서 아직 평가되지 않고 있다(29). RhE 기술을 사용하여 가스와 에어로졸을 시험하는 것이 가능할 수 있지만, 현재의 시험 가이드라인은 이를 허용하지 않는다.

8. 혼합물, 시험하기 어려운 물질(예: 불안정한 물질) 또는 본 가이드라인에 명시된 적용 범위 내에 명확하게 포함되지 않는 시험물질의 시험을 고려할 때는 해당 시험 결과가 과학적으로 유의미한지를 우선 검토해야 한다. 혼합물 시험에 대한 규제적 요구가 존재하는 경우 이와 같은 검토는 필요하지 않다. 단, 혼합물은 광범위한 카테고리과 구성을 포함하고 혼합물 시험에 대한 정보가 제한적이기 때문에 본 시험 가이드라인을 혼합물의 특정 카테고리에 적용할 수 없는 것을 입증할 수 있는 경우(예: Eskes *et al*, 2012(30)에서 제안한 전략에 따름) 해당 카테고리의 혼합물에 본 시험 가이드라인을 사용해서는 안 된다. 특정 화학물질류(specific chemical classes) 또는 물리화학적 특성에 본 시험 가이드라인을 적용할 수 없다고 확인된 경우에도 마찬가지로 주의해야 한다. 65가지 농화학 제제에 대한 생체외 및 생체내 데이터 비교 연구에서는 전체 정확도가 54%(65개 농화학 제제), 민감도가 44%(25개 제제), 특이도가 60%(40개 제제)로 나타났다. 이 데이터는 RhE 기반 생체외 피부 자극 시험을 농화학 제제에 적용할 수 있는 가능성이 부족하다는 사실을 보여준다(47).

9. MTT 포르마잔과 동일한 파장에서 빛을 흡수하는 시험물질 및 생체염료 MTT를 MTT 포르마잔으로 직접 환원할 수 있는 시험물질은 세포 생존을 측정을 간접할 수 있으므로 보정을 위해 적합한 대조군 사용이 필요할 수 있다(27~33항 참조).

10. 분류가 명확한 시험물질의 경우, 3개 반복시험(replicate tissues)의 단회 시험으로 충분하다. 그러나 반복시험의 결과가 서로 일치하지 않거나 평균 생존율 $50 \pm 5\%$ 등의 경계 값 결과가 나오는 경우에는 2차 시험을 고려해야 하며, 앞선 두 번의 시험 결과가 일치하지 않은 경우에는 3차 시험을 고려해야 한다.

시험 원리

11. 시험물질은 비형질전환 인체유래 표피 각질세포로 구성된 3차원 RhE 모델에 국소적으로 적용된다. RhE 모델은 각질세포를 고도로 분화된 다층의 인체 표피 모델이 형성될 때까지 배양한 것이다. 이는 기저층(basal layer) 및 유극층(spinous layer), 과립층(granular layer), 그리고 체내에 분포하는 지방 중 주요 부류인 세포간 판상형 지방층(lamellar lipid layer)을 포함하는 다층의 각질층(stratum corneum)으로 구성되어 있다.

12. 홍반과 부종을 주요 특징으로 하는 화학물질에 의한 피부자극은 화학물질이 각질층을 투과하여 시작되는 연쇄반응의 결과로, 각질세포 및 그 외 피부세포의 기저층(underlying layers)을 손상시킬 수 있다. 손상된 세포는 염증매개물질을 분비하거나 염증의 연쇄반응을 일으키는데 이는 진피층의 세포(특히 혈관의 기질세포 및 내피 세포)에 영향을 미친다. 내피세포가 팽창하고 침투성이 증가하면 홍반 및 부종이 발생한다(29). 특히 RhE 기반의 시험법은 생체의 시험계에 혈관생성능력이 없는 경우, 세포/조직 손상 등의 연쇄반응의 시작(16) (17)을 세포 생존율로 판독한다.

13. RhE 모델의 세포 생존율은 생체염료인 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue; CAS No. 298-93-1]가 효소에 의하여 청색의 포르마잔염(formazan salt)으로 전환되는 것을 조직에서 추출하여 정량적으로 측정한다(31). 자극성 물질은 정해진 임계치(즉, 50% 이하(\leq))이면 UN GHS Category 2) 이하로 세포 생존율을 감소시키는 것을 통해 식별할 수 있다. 시험 가이드라인의 규제 체계 및 적용 가능성에 따라, 정해진 임계치 이상의 세포 생존율을 나타내는 시험 물질은 비자극성 물질로 간주될 수 있다(즉, 50% 초과($>$))이면 UN GHS No Category).

숙련도 확인

14. 각 실험실은 본 시험 가이드라인(부록 2)에 포함된 시험법을 일반적으로 사용하기

전에, 표 1의 숙련도 물질 10개를 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 본 시험 가이드라인에 포함된 특정 시험법의 사용자는 부록 3의 표 2에 제시된 각 숙련도 물질(표 1)의 세포 생존율 참고 범위(indicative range)를 참고해야 한다. 목록의 숙련도 물질이 이용 가능하지 않거나 다른 합당한 이유로 사용할 수 없는 등의 경우에는 표 1에 기술된 것과 동일한 선정 기준이 적용된다는 조건하에 생체외 및 생체내 참고 데이터가 충분히 있는 다른 물질(예: 참고 물질(8))을 사용할 수 있다. 이때는 대체 숙련도 물질 사용의 타당성을 밝혀야 한다.

15. 숙련도 시험의 일환으로 RhE 모델 수령 후 생산자가 지정한 조직 장벽 특성(barrier properties) 검사를 실시하는 것이 좋다. 이는 조직이 긴 시간에 걸쳐 장거리 운송되었을 때 특히 중요하다. 시험법의 성공적으로 확립되고 숙련도가 확보 및 입증되면 조직 장벽 특성 검사를 정기적으로 할 필요는 없다. 하지만 시험법을 주기적으로 사용할 때는 일정한 간격으로 장벽 특성을 계속해서 평가할 것을 권장한다.

표 1 : 숙련도 물질¹

Chemical	CAS No.	생체내(<i>in vivo</i>) 점수 ²	물리적 상태	UN GHS Category
분류되지 않는 물질(UN GHS No Category)				
Naphthalene acetic acid	86-87-3	0	고체	No Cat.
Isopropanol	67-63-0	0.3	액체	No Cat.
Methyl stearate	112-61-8	1	고체	No Cat.
Heptyl butyrate	5870-93-9	1.7	액체	No Cat. (Cat. 3으로 선택가능) ³
Hexyl salicylate	6259-76-3	2	액체	No Cat. (Cat. 3으로 선택가능) ³
분류된 물질(UN GHS Category 2)				
Cyclamen aldehyde	103-95-7	2.3	액체	Cat. 2
1-Bromohexane ⁴	111-25-1	2.7	액체	Cat. 2
Potassium hydroxide(5% aq.)	1310-58-3	3	액체	Cat. 2
1-Methyl-3-phenyl-1-piperazine ⁴	5271-27-2	3.3	고체	Cat. 2
Heptanal	111-71-7	3.4	액체	Cat. 2

참고:

- 1 숙련도 물질은 검증 연구에 사용된 물질의 하위집단으로 다음의 기준에 따라 선정되었다. (i) 화학물질이 상용화되었음, (ii) Draize 자극 점수의 전체 범위를 나타냄(비자극부터 강한 자극까지), (iii) 잘 정의된 화학구조를 가지고 있음, (iv) 검증 과정에 사용되는 화학적 기능이 나타남, (v) 복수의 시험 및 복수의 실험실에서 재현 가능한 생체외 결과, (vi) 생체외에서 정확하게 예측됨, (vii) 극도의 독성과 관련이 없고(예: 생식계에 대한 발암성 또는 독성) 과도한 폐기 비용과 관련이 없음.
- 2 생체내 점수, OECD 시험 가이드라인 404에 따름(4).
- 3 이 시험 가이드라인에서 UN GHS Category 3(약한 자극 물질) 옵션 (1)은 카테고리 없음으로 간주됨.
- 4 1-methyl-3-phenyl-1-piperazine 및 1-bromohexane은 공급원 및 실험기관에 따라 다른 결과가 나타날 수 있으며 14항에서와 같이 고려될 수 있음.

시험 절차

16. 다음은 피부자극 평가를 위한 RhE 시험법의 구성요소 및 절차에 대한 설명이다 (각 시험법 관련 매개변수는 부록 3 참조). 본 시험 가이드라인에 따른 시험법에 대한 표준작업지침서(SOP)를 사용할 수 있다(32)(33)(34)(35)(42)(44)(48).

RhE 시험법 구성요소

일반적인 조건(General conditions)

17. 상피조직(epithelium) 재구성에는 비형질전환 인체 각질세포를 사용해야 한다. 다층의 살아있는 상피세포(기저층, 유극층, 과립층)가 제 기능을 하는(functional) 각질층 아래에 존재해야 한다. 각질층은 세포독성 기준물질(benchmark chemical)(예: sodium dodecyl sulfate(SDS) 또는 Triton X-100)의 빠른 투과를 견딜 수 있는 견고한 기능적 장벽을 생성하기 위해 필요한 필수 지질성분이 포함된 다층의 구조이어야 한다. 장벽 기능은 일정한 노출시간 후 기준 물질이 조직 생존율을 50% 감소시키는 농도(IC₅₀) 또는 지정된 일정 농도로 기준 물질을 도포하고 세포 생존율이 50% 감소하는데 필요한 노출시간(ET₅₀)으로 입증 및 평가되어야 한다. RhE 모델의 방어 특성은 각질층 주위의 물질이 살아있는 조직으로 투과되는 것을 막는 것으로 투과가 될 경우 피부 노출 모델로 적합하지 않을 수 있다. RhE 모델은 박테리아 또는 바이러스, 마이코플라스마 및 진균 등에 오염되지 않아야 한다.

기능적인 조건(Functional conditions)

생존율(Viability)

18. 생존율 정량화에는 MTT 시험법이 사용된다(31). RhE 조직 모델의 살아있는 세포들은 생체염료 MTT를 청색 MTT 포르마잔 침전물로 환원시키고, 이 침전물은 이소프로판올(또는 유사한 용매)을 이용하여 조직에서 추출한다. 추출 용매의 흡광도(OD)는 0.1 미만($OD < 0.1$)이어야 한다. 추출된 MTT 포르마잔은 표준흡광도(OD) 측정을 이용하거나 33항에 설명된 대로 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 이용하여 정량화할 수 있다(36). RhE 모델 사용자는 해당 RhE 모델의 각 배치(batch)가 음성대조군에 대한 기준을 충족하는지 확인해야 한다. 음성대조군 OD 값(피부 자극 시험 조건에서)에 대한 허용범위(상한 및 하한 값)는 RhE 모델 개발자/공급업자에 의해 설정되었다. 본 시험 가이드라인에 포함된 검증된 RhE 시험법의 음성대조군 OD 값 허용범위는 부록 3의 표 4에 제시되어 있다. HPLC/UPLC-spectrophotometry 사용자는 부록 3의 표 4에 제시된 음성대조군 OD 범위를 음성대조군 허용 기준으로 사용해야 한다. 음성대조군으로 처리된 조직이 시험 노출 기간 동안 안정적으로 배양되고 있다는 사실(유사한 생존율 측정값 유지)을 문서화해야 한다.

장벽기능(*Barrier function*)

19. 각질층과 해당 지질 구성은 SDS 또는 Triton X-100 등, 세포 독성 기준 물질(cytotoxic benchmark chemicals)이 모델 내에서 빠르게 투과하는 것(IC_{50} 또는 ET_{50} 으로 측정)을 저지하기에 충분해야 한다(부록 3 표 5).

형태학(*Morphology*)

20. RhE 모델이 인체 표피와 유사한 구조(다층 각질층 포함)임을 입증하기 위해 조직학적 검사를 수행하여야 한다.

재현성(*Reproducibility*)

21. 시험법의 양성대조군 및 음성대조군 결과는 시간 간격을 두고 시험하더라도 재현성을 보여야 한다.

품질 관리(*Quality control*)

23. 개발자 또는 공급자가 각 RhE 모델이 정해진 생산 출하 기준에 부합한다는 사실을

입증한 경우에만 RhE 모델을 사용해야 하며, 이 중에서도 생존율(18항), 장벽 기능(19항), 형태학(20항) 등이 가장 관련성이 높다. 이러한 자료가 시험법 사용자에게 제공되어 사용자가 시험 보고서에 이 자료를 포함시킬 수 있어야 한다. RhE 모델 개발자 또는 공급업자는 IC₅₀ 또는 ET₅₀의 허용범위(상한 및 하한 값)를 확립해야 한다. 품질보증 된 조직을 이용하여 얻은 결과만이 자극성 물질 분류에서 신뢰성 있는 예측으로 인정될 수 있다. 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법의 허용 범위는 부록 3의 표 5에서 확인할 수 있다.

시험물질 및 대조물질 적용

23. 매 실험마다 각 시험물질과 대조물질에 대해 최소한 3개의 조직 반복시료를 사용해야 한다. 액체 및 고체 시험물질의 경우, 시험물질이 표피 표면을 균일하게 덮을 수 있도록 충분하게 적용한다(즉, 26~83 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 또는 mg/cm^2) (부록 3 참조). 고체물질의 경우, 시험물질이 표피 표면에 쉽게 접촉하도록 시험물질을 처리하기 전에 탈이온수 또는 증류수로 표피 표면을 적셔준다. 가능하면 고체는 고운 분말로 만들어 시험해야 한다. 모든 시험 조건에서 물질이 퍼지게 하는 보조 도구로서 나일론 메쉬를 사용할 수 있다(부록 3 참조). 시험물질 적용이 끝나면 수용성 완충제(PBS 등) 또는 0.9% 염화나트륨(NaCl) 용액으로 표피 표면에서 시험물질을 조심스럽게 씻어낸다. RhE 시험법에 따라 적용 시간은 15분~60분, 배양 온도는 20°C ~ 37°C로 다를 수 있다. 이러한 적용시간 및 온도는 각 RhE 시험법에 따라 최적화되며 시험법들의 상이한 고유 속성(예: 장벽 기능)을 반영한다(부록 3 참조).

24. 매 실험마다 동시 음성대조군(NC) 및 양성대조군(PC)을 사용하여 생존율(음성대조군 사용) 및 장벽 기능 및 그에 따른 조직 민감도(양성대조군 사용)가 기존 실험으로 축적된 결과를 통해 정해진 허용범위 내에 있음을 입증해야 한다. 양성대조물질은 5% 수용성 SDS, 음성대조물질은 증류수 또는 인산염완충용액(PBS)을 추천한다.

세포 생존율 측정(Cell Viability Measurements)

25. 시험 절차에 따르면 시험물질을 적용한 직후 곧바로 생존율을 측정하지 않고 새 배지로 조직을 세척한 다음 충분한 배양시간이 지난 후에 측정하는 것이 중요하다. 이러한 배양시간을 통해 약한 세포독성의 영향은 회복시키고, 뚜렷한 세포독성은 나타나도록 한다. 본 시험 가이드라인에 있는 두 가지 RhE 기반 시험법의 최적화 단계에서

시험물질 적용 후 최적의 배양시간이 42시간인 것으로 확인되었으며(11)(12)(13)(14)(15) 이는 현재 본 시험가이드라인에 포함된 모든 시험법에서 표준 매개변수(standard parameter)로 사용한다.

26. MTT 분석법은 본 시험 가이드라인에 따라 세포 생존율을 측정하는데 사용되어야 하는 표준화된 정량 분석법이다. MTT 분석법은 3차원 조직 구조에서 호환하여 사용할 수 있다. 조직을 적절한 농도(예: 0.3~1 mg/mL)의 MTT 용액에 3시간 동안 넣어 두면 MTT는 살아있는 세포에 의해 청색 포르마잔으로 변환된다. 침전된 청색 포르마잔 생성물은 용매(예: 이소프로판올, 산성(acidic) 이소프로판올)를 사용하여 조직에서 추출하고, 포르마잔 농도는 최대 ± 30 nm의 필터 밴드 패스(filter band pass) 또는 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용하여 570 nm 흡광도에서 측정한다(33항 참조)(36).

27. 시험물질의 광학적 특성 또는 MTT에 대한 화학 반응(예: 화학물질이 색 발현을 야기할 뿐 아니라 방해하거나 뒤바꿀 수 있음)이 시험법을 간접하여 생존율 측정에 오류가 생길 수 있다. 이는 특정 시험물질이 세척과정에서 완전하게 제거되지 않았거나 표피를 투과한 경우 등에서 나타날 수 있다. 시험물질이 MTT에 직접 작용하거나(예: MTT 환원제), 원래 색상이 있거나, 조직 처리 중에 착색되는 경우에는 추가 대조군을 사용하여 시험 물질이 생존율 측정을 간접하는지 확인하고 이를 보정해야 한다(28항 및 32항 참조). MTT 직접 환원 및 착색제에 의한 간접을 보정하는 방법에 관한 자세한 설명은 본 시험 가이드라인에 포함된 검증된 시험법의 표준작업지침서에서 확인할 수 있다(32)(33)(34)(35)(42)(44)(48).

28. 직접적인 MTT 환원제를 식별하기 위해서는 새로 준비한 MTT 용액에 각 시험 물질을 첨가해야 한다. 시험물질이 포함된 MTT 복합물질이 청색/자색으로 변하면 시험물질이 직접 MTT를 환원하는 것으로 추정하며, 표준흡광도(OD) 측정 또는 HPLC/UPLC-분광광도계 사용과는 별개로 살아있지 않은(non-viable) RhE 조직에 대한 기능적 확인이 추가로 이루어져야 한다. 추가 기능 조사에서는 죽은 조직을 사용하는데, 이들은 대사 활성도가 매우 낮지만 살아있는 조직과 비슷한 방식으로 시험물질을 흡수한다. 각 MTT 환원 시험물질을 최소한 두 개 이상의 죽은 조직에 적용하고 비특이적 MTT 환원(NSMTT)을 위해 전체 시험 과정을 진행한다(32)(33)(34)(35)(42)(44)(48). 수행된 독립 시험/횟수와 무관하게 각 시험물질 당 하나의 NSMTT 대조군이면 충분하다. MTT 환원제에 노출된 살아있는 조직의 생존율에서 동일한 MTT 환원제에 노출된 죽은 조직의 비특이적 MTT 환원율을 빼서 실제 조직 생존율을 계산하는데, 이는 보정된 시험에서 동시에 진행되는 음성대조군과 비교하여 계

산된다(%NSMTT).

29. 유색 시험물질 혹은 물이나 이소프로판올과 접촉할 때 착색되는 시험물질의 간섭 가능성을 식별하고 추가 대조군의 필요성을 판단하기 위해, 물(노출 환경) 및/또는 이소프로판올(추출 용액)에서 시험물질의 스펙트럼 분석을 실시해야 한다. 물 및/또는 이소프로판올에서 시험물질이 570 ± 30 nm 범위의 빛을 흡수하는 경우, 추가적으로 착색제 대조군(colorant control)을 사용하며, 이러한 대조군이 필요하지 않는 경우 HPLC/UPLC-분광광도계 방법을 사용해야 한다(32항 및 33항 참조). 표준흡광도(OD) 측정을 실시하는 경우, 간섭을 일으키는 착색된 각 시험물질을 최소 2개의 살아있는 반복시료에 적용하고 전체 시험절차를 진행하지만, MTT 배양 단계에서는 비특이적 색상(NSCliving) 대조군을 생성하기 위해 MTT 용액 대신 배지에서 배양한다. NSCliving 대조군은 유색 시험물질(colored chemicals)과 동시에 시험해야 하며, 복수의 시험을 할 경우에는 살아있는 조직 고유의 생물학적 변이성으로 인해 각 실험마다(매회) 독립적인 NSCliving 대조군이 필요하다. 간섭을 일으키는 시험물질에 노출시킨 살아있는 조직을 MTT 용액에서 배양하여 얻은 조직 생존율에서, 동일한 시험물질에 노출시킨 살아있는 조직을 MTT가 없는 배지에서 배양하여 얻은 비특이적 색상 대조군의 조직 생존율 (%NSCliving)을 빼서 순수 조직 생존율을 계산하는데, 보정된 시험에서도 이를 동시에 진행한다.

30. 직접적인 MTT 환원(28항 참조)과 색 간섭(29항 참조)을 동시에 유발하는 것으로 확인된 시험물질의 표준흡광도(OD)를 측정할 때에도 앞서 설명한 NSMTT 및 NSCliving 대조군과는 별개로 세 번째 대조군이 필요하다. MTT 시험을 간섭하는 어두운 색의 시험물질(예: 청색, 자색, 흑색)이 주로 이 경우에 해당되는데, 28항에서 기술한 바와 같이 시험물질 본연의 색이 MTT를 직접적으로 환원시키는 능력에 대한 평가를 방해하기 때문이다. 이러한 시험물질은 살아있는 조직 및 죽은 조직 모두에 결합할 수 있으므로 NSMTT 대조군은 시험물질에 의한 직접적인 MTT 환원 가능성 뿐만 아니라 죽은 조직에 남아있는 시험물질의 결합으로 인한 색 간섭에 대해서도 보정해준다. 이 경우 색 간섭에 대한 이중 보정이 발생할 수 있는데 시험물질이 살아있는 조직에 결합하여 발생하는 색 간섭을 NSCliving 대조군이 이미 한번 보정하기 때문이다. 이중으로 색 간섭을 보정하는 것을 피하기 위해 죽은 조직(NSCKilled)의 비특이적 색상에 대한 세 번째 대조군이 필요하다. 이 추가 대조군에서는 시험물질을 최소 2개 이상의 죽은 조직 반복시료에 적용하는데, 이때 죽은 조직 반복시료는 전체 시험 절차를 거치지만 MTT 배양 단계에서는 MTT 용액 대신 배양액에서 배양된다. 각 시험/횃수와는 무관하게 시험물질 당 하나의 NSCKilled 대조군으로 충분하지만 가능하면 동일한 조직 배치에서 NSMTT 대조군과 동시에 수행되어야 한다. 그런 다음 순수 조직 생

존율은 시험물질에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 조직 생존율(%Viability)에서 %NSMTT와 %NSCliving을 빼준 뒤 간섭을 일으키는 시험물질을 죽은 조직에 노출시킨 후 배지로 배양하여 얻은 비특이적 색상 대조군의 비율(%NSCKilled)을 더하여 계산하며 보정된 시험에서 동시에 진행되는 음성대조군과 비교하여 계산된다. (즉, 순수 조직 생존율 = %Viability - %NSMTT - %NSCliving + %NSCKilled)

31. 비특이적 MTT 환원 및 비특이적 색상 간섭이 분광광도계의 직선 범위 이상으로 조직 추출물의 판독 값을 높일 수 있다는 점에 유의한다. 이에 따라 각 실험실은 규제 목적으로 시험물질을 시험하기 전에, 시판되는 MTT 포르마잔(CAS # 57360-69-7)으로 분광광도계의 직선 범위를 결정해야 한다. MTT 직접 환원 및/또는 색 간섭에 대한 보정 없이 시험물질에서 얻은 조직 추출물의 OD가 분광광도계의 직선 범위 내에 있거나 시험물질에서 얻은 보정되지 않은 생존율이 50%이하($\leq 50\%$)인 경우에는 분광광도계를 이용한 표준흡광도(OD) 측정값이 직접적인 MTT 환원제 또는 색 간섭 시험물질을 평가하는데 적합하다. 그러나 음성대조군의 %NSMTT 및/또는 %NSCliving의 값이 50% 이상($\geq 50\%$)인 시험물질의 결과 값은 분류되지 않는 물질과 분류된 물질을 구분하는 기준(cut-off)이므로 주의해야 한다(35항 참조).

32. MTT 시험에서 매우 강한 색 간섭으로 인해 표준흡광도(OD) 측정에 적합하지 않은 유색(colored) 시험물질의 경우, MTT 포르마잔 측정을 위해 HPLC/UPLC-spectrophotometry 방법을 대신 사용할 수 있다(33항 참조) (36). HPLC/UPLC-spectrophotometry 시스템은 정량적 측정 전에 MTT 포르마잔을 시험물질로부터 분리하게 해준다(36). 이로 인해 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용할 때는 시험물질에 관계없이 NSCliving 또는 NSCKilled 대조군이 필요하지 않다. 그러나 시험물질이 직접적으로 MTT를 환원하는 것으로 판단되거나 MTT를 직접 환원시키는 능력의 평가를 방해하는 색상을 띠는 경우(28항 참조), NSMTT 대조군이 사용되어야 한다. MTT 포르마잔 측정에 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용하는 경우 조직 생존율은 동시에 음성대조군에서 구한 MTT 포르마잔 피크에 대한 시험물질에 노출된 살아있는 조직의 MTT 포르마잔 피크영역으로 계산된다. MTT를 직접 환원하는 시험물질의 경우, 순수 조직 생존율은 시험물질에 노출된 살아있는 조직의 조직 생존율에서 %NSMTT를 뺀 값으로 계산된다. 마지막으로 매우 드물게 발생하는 경우이긴 하지만, 색 간섭을 일으키는 MTT 직접 환원제는 처리 후 조직에 잔류하는 MTT를 강력하게 환원시켜서 시험 조직 추출물의 흡광도(표준 흡광도 측정 사용) 또는 피크 영역(HPLC/UPLC-spectrophotometry 사용)이 분광광도계의 직선 범위를 벗어나게 할 수 있으므로 이러한 조직 추출물은 평가할 수 없다.

33. HPLC/UPLC-spectrophotometry는 모든 유형의 시험물질(유색, 무색, MTT 환원제, MTT 비환원제)에서 MTT 포르마잔 측정을 위해 사용할 수 있다(36). HPLC/UPLC-spectrophotometry 시스템이 다양하기 때문에 조직 추출물의 MTT 포르마잔 정량화를 위해 사용하기 전에, HPLC/UPLC-spectrophotometry 시스템의 적격성을 확인해야 하며 이는 바이오분석법 검증 관련 산업에 대한 미국식품의약청 지침에 명시된 내용에 기초하여 일련의 표준 적격성 매개변수(a set of standard qualification parameters)에 대한 허용 기준을 충족하는지를 통해 입증한다(36)(37). 이러한 주요 매개변수 및 허용 기준은 부록 4에서 볼 수 있다. 부록 4에 정의된 허용 기준을 충족하면, HPLC/UPLC-spectrophotometry 시스템은 본 시험 가이드라인에 명시된 시험 조건에 따른 MTT 포르마잔 측정에 적합하며 바로 사용할 수 있는 것으로 간주된다.

허용 기준

34. 검증된 RhE 모델 배치를 사용하는 각 시험법(22항 참조)에 대해, 음성대조군으로 처리된 조직은 출하 및 수령 단계, 모든 프로토콜 과정에서 조직의 품질을 보여주는 흡광도를 나타내야 한다. 대조군 흡광도 값이 기준에 확립된 시험결과의 범위 아래로 내려가서는 안 된다. 마찬가지로 양성대조군(5% 수용성 SDS)으로 처리된 조직도 시험법의 조건에 따라 자극성 화학물질에 반응하여야 한다(부록 3 참조. 추가적인 정보는 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법의 SOP 참조 (32)(33)(34)(35)(42) (44)(48). 조직 반복시험 간 측정값의 변동성[표준편차(SD)]은 시험법의 허용범위 내에 있어야 한다(부록 3 참조)

결과 해석 및 예측 모델

35. 각 시험물질의 흡광도 값은 생존율 100%로 하는 음성대조군과 비교하여 생존율을 계산하는데 사용된다. HPLC/UPLC-spectrophotometry가 사용되는 경우, 조직 생존율은 동시 음성대조군의 MTT 포르마잔 피크와 비교한 시험물질에 노출된 살아있는 조직의 MTT 포르마잔 피크영역(%)으로 계산된다. 분류되지 않는 시험물질로부터 자극성 물질을 구분하는 세포 생존율의 기준 값(cut-off value)과 실험결과를 평가하고 자극성 화학물질을 식별하는데 사용되는 통계적 절차를 명확하게 정의 및 문서화하고 유효성을 입증해야 한다(시험법 표준작업지침서 참조). 자극성 예측을 위한 기준 값은 아래와 같다.

- 시험물질 적용 및 후배양 시킨 후 평균 조직 생존율이 50% 이하($\leq 50\%$)인 경우, UN GHS에 따른 분류 및 표시가 필요하다(Category 2 또는 Category 1).

본 시험 가이드라인에 실린 RhE 시험법은 UN GHS Category 1과 Category 2를 구분할 수 없으므로 피부부식성에 관한 추가 정보가 최종 분류 결정에 필요할 것이다[IATA 지침서 참조(3)]. 시험물질이 비부식성(예: TG 430, 431, 435에 근거함)으로 확인되고 적용 및 후배양 시킨 후 조직 생존율이 50%이하($\leq 50\%$)로 나타나면, 해당 시험물질은 UN GHS Category 2에 따라 피부 자극 물질로 간주된다.

- 회원국의 규제 체계에 따라(예: UN GHS Category 3을 채택하지 않는 등), 적용 및 후배양 시킨 후 조직 생존율이 50%를 초과(> 50%)하는 경우에는 UN GHS No Category에 따라 피부 자극이 없는 것으로 간주된다.

시험자료 및 보고

데이터

36. 매 시험마다 조직 반복시험에서 얻은 데이터(예: 분류를 포함한 각 시험물질의 흡광도 값 및 세포 생존율 데이터 계산 값)를 관련 반복시험 데이터 등과 함께 표 형식으로 보고해야 한다. 또한 각 시험에 대한 평균 \pm SD가 보고되어야 한다. 각 시험물질에 대해 MTT 용액과 유색 시험물질 간의 상호작용도 보고되어야 한다.

시험 보고서

37. 시험 보고서에는 다음 내용이 포함되어야 한다.

시험 물질 및 대조 물질

- 단일성분물질: IUPAC 또는 CAS명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드와 같은 화학물질 식별정보, 구조식, 순도, 적절하고 실질적으로 제공 가능한 불순물의 화학 물질 정보 등
- 다성분물질, UVCB 및 복합물질: 화학물질 정보로 파악 가능한 특성(상기 참조), 구성성분의 정량적 비율, 물리화학적 특성
- 물리적 성질, 용해도, 물리화학적 기타 관련 특성
- 출처(시판되는 경우 제품번호)
- 해당되는 경우 시험 전 시험물질/대조물질 처리 여부(예: 데우기, 분쇄)
- 시험물질의 안정성 및 사용기한(알 수 있는 경우, 재분석 날짜)
- 보관 조건

사용된 RhE 모델 및 프로토콜(해당되는 경우, 선정 근거)

시험조건:

- 사용된 RhE 모델(배치 번호 포함)
- 측정기기의 보정 정보(예: 분광광도계), MTT 포르마잔 정량화에 사용되는 파장 및 밴드 패스(해당되는 경우), 측정기기의 직선 범위, MTT 포르마잔 정량화에 사용된 방법에 대한 설명
- HPLC/UPLC-spectrophotometry 시스템의 적격성에 대한 설명(해당되는 경우), 사용된 특정 RhE 모델의 성능을 포함한 추가 정보. 최소한 다음 사항을 포함할 것
 - i) 생존율
 - ii) 장벽 기능
 - iii) 형태적 특징
 - iv) 모델 품질 관리(QC)
- 모델의 과거 데이터 참조. 과거 배치 데이터에 근거한 QC 데이터 허용 기준을 포함해야 하며 이에 국한되지 않음.
- 일반적으로 시험법 사용 전에 숙련도 확인 물질에 대한 평가로 시험법 수행의 숙련도 확인

시험 절차

- 사용된 시험 절차의 세부사항(적용 후 사용된 세척 절차 포함), 시험물질 및 대조물질의 용량
- 적용 시간 및 온도, 적용 후 배양 기간
- MTT 직접 환원제 및 유색 시험물질에 사용된 대조군에 대한 설명(해당되는 경우)
- 시험물질 및 대조군 당 사용된 조직 반복시료의 수(양성대조군, 음성대조군, NSMTT, NSCliving, NSCKilled 등)
- 사용된 RHE 모델에 근거하여 모델에 적용된 판정기준/예측모델에 대한 설명
- 시험 절차의 변경 사항 설명(세척 절차 포함)

반복실험 및 시험인정 요건

- 과거 데이터에 기반을 둔 양성 및 음성대조군의 평균값 및 허용 가능 범위, 양성 및 음성대조군에 대한 조직 반복시료 간의 허용 가능한 편차
- 시험물질의 조직 반복시료 간의 허용 가능한 편차

결과:

- 각 시험물질 및 대조군의 각 적용 기간, 각 반복실험, 각 시료의 측정값(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, 조직 생존율, 평균 조직 생존율, 조직 반복시료간의 표준 편차 또는 CV)에 관한 데이터의 도표화
- 해당되는 경우, MTT 직접 환원제 및/또는 유색 시험물질에 사용되는 대조군의 결과(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 영역, %NSMTT, %NSCliving, %NSCKilled, SD, 최종적으로 보정된 조직 생존율)
- 정해진 시험 회차 및 시험물질과 대조물질로부터 얻은 허용기준에 대한 결과
- 관찰된 기타 결과에 대한 설명
- 사용된 예측모델/판정기준에 근거한 분류

결과 토의

- 시험 동안 확인된 본 가이드라인과의 편차 및 이러한 편차가 시험에 영향을 주었는지의 여부

결론

참고문헌

1. United Nations (UN). (20173). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second 7th Revised Edition, UN New York and Geneva, 20173. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev075/075files_e.html].
2. EURL-ECVAM. (2009). Statement on the “Performance Under UN GHS of Three In vitro Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]
3. OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. OECD. (2015). OECD Guideline for Testing of Chemicals. (No. 404.): Acute Dermal Irritation, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
5. OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 430.): In vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER).
6. OECD. (2016). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431.): In vitro Skin Model. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
7. OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 435.): In vitro Membrane Barrier Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
8. OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In vitro Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
9. 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.

10. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on In vitro Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in vitro* 15, 57-93.
11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in vitro* 16, 765 - 770.
12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on In vitro Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107 - 0114.
13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on In vitro Skin Irritation Tests - An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.
14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005). The In vitro Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.
15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on In vitro Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.
16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on In vitro Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

17. Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]
18. Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on In vitro Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, ATLA 35, 603-619.
19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007). In vitro Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, AATEX, 14, 351-358.
20. EURL-ECVAM. (2007). Statement on the Validity of In vitro Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/altanimal-testing].
21. EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to In vitro Skin Irritation Testing. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] N.B. These are the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.
22. EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of In vitro Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing].
23. OECD. (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on In vitro Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No. 137.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
24. Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for In vitro Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, J Toxicol Sci, 34, 327-334
25. Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL²⁴ Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, AATEX, 16, 111-122

26. OECD. (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 159.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
27. OECD. (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 155.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
28. Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the In vitro Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
29. Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). In vitro Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In vitro* 18, 231-243.
30. 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).
31. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
32. EpiSkin™. (February 2009). SOP, Version 1.8, ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
33. EpiDerm™. (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: In vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200). Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
34. SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
35. LabCyte. (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation

- Test Using the Reconstructed Human Model “LabCyte EPI-MODEL24”
Available at:
[<http://www.jppte.co.jp/english/business/LabCyte/Testprotocol.pdf>].
36. 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. (2015) Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry 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. *Toxicol In vitro*. 29(4), 741-761.
 37. 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>].
 38. Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: *Practical Contact Dermatitis*, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw- Hill, New York.
 39. EURL-ECVAM. (2009). Performance Standards for In vitro Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). Available at:
[http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] N.B. This is the current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available related to the present TG.
 40. EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for In vitro Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009. Available at:
[http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing].
 41. EC. (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, *Official Journal of the European Union* L225, 1-333.
 42. Skin+ ® RHE SOP, Version 5.0 (May 2016), Skin Irritation Test for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals with Sterlab’s RHE: 42

- Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation. Available at [http://www.sterlab-store.com/wpcontent/uploads/SOP_Sterlab_skin_irritation_v5-May-2016.pdf].
43. Peer Review Report of the Validation of the Skin Irritation Tests Using Skin+ ® and Using epiCS® (2018)
 44. epiCS® RHE SOP, Version 5.1 (January 2017) Skin Irritation Test for use with CellSystems Reconstructed Human Epidermal Model epiCS® Test Method 20 min application + 42 hours Post- Incubation. Available at [<https://reconstructed-humanepidermis.com/user-data/downloads/manuelsops/INVITTOX%20protocol%20epiCS%20Skin%20Irritation%20version%205.1%2C%2001.2017.pdf>].
 45. ESAC Opinion on the Validation Study of the epiCS® Test Method based on the EURL ECVAM/OECD Performance Standards for in vitro Skin Irritation Testing using Reconstructed human Epidermis (RhE), ESAC Opinion Number 2016-05
 46. EURL ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches (2016)
 47. Kolle S.N, van Ravenzwaay B. and Landsiedel R. (2017). Regulatory accepted but out of domain: In vitro skin irritation tests for agrochemical formulations. Regul. Toxicol. Pharmacol 89, 125-130.
 48. KeraSkin™ SIT SOP, Version 1.5 (January, 2019), KeraSkin™ skin irritation test operation protocol. Available at:
[<http://www.keraskin.co.kr/eng/product/skinmodel.asp>]
 49. Jung, K.M., Lee, S.H., Jang, W.H., Jung, H.S., Heo, Y., Park, Y.H., Bae, S., Lim, K.M., Seok, S.H., 2014. KeraSkin-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 28, 742-750.
 50. Han, J., Kim, S., Lee, S.H., Kim, J.S., Chang, Y.J., Jeong, T.C., Kang, M.J., Kim, T.S., Yoon, H.S., Lee, G.Y., Bae, S., Lim, K.M., 2020. Me-too validation study for in vitro skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, KeraSkin for OECD test guideline 439. Regulatory toxicology and pharmacology : 117, 104725.
 51. OECD (2021). Validation study report and Independent Peer-Review Report for inclusion of KeraSkin™ SIT to the Test Guideline 439 on In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Environment,

Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 339.),
Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

부록 1. 용어 정의

정확도(Accuracy): 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”과 “정확도(Accuracy)”는 같은 의미로 쓰인다(9).

세포 생존율(Cell viability): 세포 미토콘드리아 탈수소효소가 생체염료 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue)를 환원시키는 능력 등과 같이 세포 군집의 총 활성도를 측정하는 지표로, 측정된 평가 변수 및 시험 설계에 따라 생세포의 총 숫자 및/또는 활성도에서 상관관계가 나타난다.

화학물질(Chemical): 단일 물질 또는 복합 물질을 의미한다.

일치성(Concordance): 시험법의 수행도에 대한 척도로 각 카테고리에 해당하는 결과를 제공하며 상관성의 한 측면이다. 이 용어는 정확도와 교차 사용이 가능하며, 양성 또는 음성으로 정확하게 분류되는 모든 시험 물질의 비율로 정의된다. 일치성은 시험 물질 유형에서 양성 비율에 따라 크게 달라진다(9).

ET₅₀: 지정된 일정 농도로 기준물질을 도포할 때 세포 생존율을 50% 감소시키는데 필요한 노출 시간으로 추정 가능(IC₅₀ 참조).

국제연합 화학물질 분류 및 표시에 관한 국제조화 시스템(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): 물리적 및 보건적, 환경적 유해성의 표준 유형 및 정도에 따른 화학 물질(단일 물질 및 복합 물질)의 분류체제로 그림문자 및 표시어, 유해성 설명, 주의사항, 안전정보문서 등으로 관련 내용을 전달하며, 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급대원 등 포함) 및 환경을 보호하기 위해 부작용 관련 정보를 제시한다(1).

HPLC: 고성능 액체크로마토그래피.

IATA: 통합독성평가(Integrated Approach on Testing and Assessment).

IC₅₀: 기준 물질이 일정 시간 노출 후 조직 생존율을 50% 감소시키는 농도(IC₅₀)로 추정 가능(ET₅₀ 참조).

혼합물(Mixture): 서로 반응하지 않는 두 가지 이상의 물질로 구성된 복합물질 또는 용액.

단일 성분 물질(Mono-constituent substance): 정량 구성에 따라 하나의 주요 성분이 80%(w/w) 이상 존재하는 물질.

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

다성분 물질(Multi-constituent substance): 정량 구성에 따라 두 가지 이상의 주요 성분이 $\geq 10\%$ (w/w) 및 $< 80\%$ (w/w) 농도로 존재하는 물질. 다성분 물질은 제조 공정의 결과물이다. 복합 물질과 다성분 물질의 차이에서 복합 물질은 두 개 이상의 물질이 화학반응 없이 섞여 있는 것이며, 다성분 물질은 화학반응의 결과물이다.

NSCKilled: 죽은 조직의 비특이적 색상(Non-Specific Colour in killed tissues).

NSCLiving: 살아있는 조직의 비특이적 색상(Non-Specific Colour in living tissues).

NSMTT: 비특이적 MTT 환원(Non-Specific MTT in killed tissues).

유사시험법평가기준(Performance standards, PS): 검증된 시험법을 기반으로 기전적 및 기능적으로 유사하게 제시된 시험법의 비교 가능성을 평가하는 기준. 여기에는 (i) 필수 시험법 구성요소, (ii) 검증된 시험법의 허용 가능한 수행도를 입증하는 데 사용된 화학물질 중에 선택된 참고 화학 물질의 최소 목록, (iii) 검증된 시험법에서 얻은 값을 기반으로 한 정확도 및 신뢰도의 유사성(참고 화학 물질의 최소 목록(9)을 사용하여 평가할 때 제시된 시험방법이 입증되어야 함)이 포함된다.

양성대조군(Positive Control, PC): 시험 시스템의 모든 구성요소를 포함한 복제군으로 양성 반응을 유발한다고 알려진 화학 물질로 처리된다. 양성대조군의 변동성을 보장하기 위해 시간별 반응이 평가될 수 있도록 양성 반응 정도가 과하지 않아야 한다.

상관성(Relevance): 시험과 관심 효과의 관련성 및 시험이 특정 목적에 의미 있고 유용한지에 대한 설명. 상관성은 시험이 얼마나 관심 생물학적 효과를 정확하게 측정하고 예측하는지 나타내며, 시험법의 정확도(일치성)를 내포한다(9).

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실내, 실험실간 재현성(reproducibility)으로 평가된다(9).

대체 시험(Replacement test): 유해성 식별 및/또는 위험 평가를 위해 일반적으로 사

용 및 승인된 시험을 대체하도록 설계된 시험, 모든 가능한 시험 상황 및 화학물질에 대해 승인된 시험과 비교하여 인체 또는 동물의 건강, 환경을 이에 상응하거나 더 좋은 방법으로 보호할 수 있다고 확인된 경우(9).

반복시험(Run): 음성대조군 및 양성대조군과 함께 하나 이상의 시험 물질로 구성된 시험.

민감도(Sensitivity): 시험에 의해 올바르게 분류된 양성/활성 시험 물질의 비율. 카테고리적 결과를 나타내는 시험법 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 주요 고려사항이다(9).

생체내(*in vivo*) 피부 자극: 최대 4시간 동안 시험 물질을 도포하고 피부에 회복 가능한 손상을 유발한다. 피부 자극은 영향을 받은 피부 조직의 반응으로 국소적으로 발생하며 자극 직후에 나타난다(38) 피부 조직의 선천성(비특이적) 면역체계를 포함하는 국소 염증 반응에 의해 발생한다. 관련 특징으로는 염증 반응을 포함한 회복 가능한 과정 및 염증 과정과 관련된 자극(홍반, 수종, 가려움, 통증) 임상 징후를 들 수 있다.

특이도(Specificity): 시험에 의해 올바르게 분류된 음성/비활성 시험 물질의 비율. 카테고리적 결과를 나타내는 시험법 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 주요 고려사항이다(9).

단일 물질(Substance): 자연 상태에 존재하거나 생산 과정을 통해 만들어진 화학 원소 및 관련 화합물로 안전성 유지에 필요한 첨가제 및 생산과정에서 생긴 불순물 등은 포함하지만, 해당 물질의 안전성에 영향을 미치거나 구조를 바꾸지 않고 분리할 수 있는 용매는 제외한다.

시험 물질(Test chemical): 시험 대상 물질.

UPLC: 초고성능 액체크로마토그래피.

UVCB: 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성으로 이루어진 화합물, 복잡한 반응산물 또는 생물학적 물질.

부록 2. 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법

RhE 시험계를 기반으로 하는 7개의 상업적으로 이용 가능한 생체의 시험법에 대한 사전 검증연구, 최적화 및 검증연구(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28)(43)(45)(50)(51)가 최소 예측력(민감도 80%, 특이도 70%, 정확도 75%)에 따라 완료되었다. 본 시험 가이드라인에 포함된 7개 시험법의 목록 및 각 시험법 검증에 사용된 검증연구의 유형은 아래와 같다. 본 가이드라인 및 유사시험법 평가기준 개발에 사용된 VRM은 EpiSkin™과 EpiDerm™ SIT(EPI-200)이다.

번호	시험법 명칭	검증 연구 유형	참조
1	EpiSkin™	완전한 전향적 검증 연구(2003~2007년) 이 시험법의 구성요소는 기존 및 업데이트된 ECVAM PS의 필수 시험법 구성요소를 정의하는데 사용되었다(39)(40)(21)*. 또한 분류되지 않는 물질과 분류 물질의 식별과 관련된 시험법의 데이터가 오리지널 PS*의 특이도 및 민감도 값을 정의하는 주요 기반이 되었다.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT(EPI-200)	EpiDerm™(오리지널): 2003~2007년에 EpiSkin™과 함께 최초로 완전한 전향적 검증연구를 거쳤다. 이 시험법의 구성요소는 ECVAM PS의 필수 시험법 구성요소를 정의하는 데 사용되었다(39) (40) (21)*.	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40)
		EpiDerm™ SIT (EPI-200): 오리지널 EpiDerm™의 수정본으로 오리지널 ECVAM PS(21)를 사용하여 2008년에 검증되었다*.	(2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	오리지널 ECVAM 유사시험법평가기준(21)에 기반한 2008년 검증 연구*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	업데이트된 ECVAM PS*(39) (40)에 기초한 OECD TG 439(8)의 유사시험법평가기준(PS)에 근거한 검증 연구(2011~2012년).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) 및 이 시험 가이드라인의 PS(8)*
5	epiCS®	유사시험법평가기준에 기반한 SIT 검증연구 OECD GD 220(8)에 따라 수행됨 2016년 ESAC 의견(45) 및 2018년 독립적 전문가 평가가 진행됨(43)	(1) (8) (23) (39) (40) (44) (43) (45)
6	Skin+®	유사시험법평가기준에 기반한 SIT 검증연구 OECD GD 220(8)에 따라 수행됨 2016년 ESAC 의견(46) 및 2018년 독립적 전문가 평가(43)가 진행됨.	(1) (8) (23) (39) (40) (42) (43) (46)
7	KeraSkin™ SIT	유사시험법평가기준에 기반한 SIT 검증연구 OECD GD 220(8)에 따라 수행 및 독립적 전문가 평가(2020년)	(48) (49) (50) (51)

참고:

오리지널 ECVAM 유사시험법평가기준(PS)(21)은 EU 위험물질 지침 28차 개정안(41)에 따른 분류체계와 관련하여 시험법 1번 및 2번의 수행도를 평가한 전향적 검증 연구(16)가 완료됨에 따라 2007년에 개발되었다. 2008년 UN GHS가 도입되면서(1), 분류되지 않는 물질과 분류 물질을 구분하는 기준 값(cut-off value)의 생체내 점수가 2.0에서 2.3으로 변경되었다. 변경된 규제 요건에 맞추기 위해 ECVAM PS의 정확도 값 및 참조 물질 목록이 2009년에 업데이트되었다(2)(39)(40). 오리지널 PS 및 업데이트된 PS도 시험법 1번 및 2번(16)의 데이터에 주로 기반하고 있으나 시험법 3번의 참조 물질에 대한 데이터를 추가로 사용했다. 2010년에는 본 시험 가이드라인과 관련된 PS를 규정하기 위해 업데이트된 ECVAM PS가 사용되었다(8). 본 시험 가이드라인의 목적에 따라 EpiSkin™은 PS의 모든 기준을 개발하는데 사용되었기 때문에 VRM으로 간주된다. 검증 연구에 대한 자세한 정보, 생성 데이터의 정리 및 UN GHS 시행 결과에 따른 PS의 필수 적응 배경 등은 본 OECD 시험 가이드라인의 ECVAM/BfR 배경 설명서에서 확인할 수 있다(23).

SIT: 피부자극시험

RhE: 인체피부모델

부록 3. 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법별 프로토콜 매개변수

표 2. 각 시험법 별 프로토콜 매개변수 개요

RhE 시험법은 매우 유사한 프로토콜을 보여주며, 모두 37°C에서 42시간 동안 후배양 한다(32)(33)(34)(35)(42)(44)(48). 편차는 주로 다음과 같은 시험법의 다양한 장벽 기능과 관련된 3가지 매개변수를 포함한다. A) 전배양 시간 및 용량, B) 시험물질 도포, C) 후배양 용량.

	EpiSkin™ (SM) (23)	EpiDerm™ SIT (EPI-200) (23)	SkinEthic RhE™ (23)	LabCyte EPI-MODEL24 SIT (26)	epiCS® (43)(44)	Skin+® (42)(43)	KeraSkin™ SIT (48)
A) 전배양							
배양 시간	18~24시간	18~24시간	≥ 2시간	15~30시간	4시간 또는 하룻밤	2시간 또는 하룻밤	20~24시간
배지 용량	2 mL	0.9 mL	0.3 or 1 mL	0.5 mL	1 mL	1mL	0.9mL
B) 시험물질 적용							
액체	10 μL	30 μL	16 μL	25 μL	30 μL	16 μL	40 μL
	(26 μL/cm²)	(47 μL/cm²)	(32 μL/cm²)	(83 μL/cm²)	(50 μL/cm²)	(32 μL/cm²)	(67 μL/cm²)
고체	10 mg	25 mg*	16 mg	25 mg	30 mg	16 mg	40 mg
	(26 mg/cm²) +DW(5μL)	(39 mg/cm²) DPBS(25μL)	(32 mg/cm²) +DW(10μL)	(83 mg/cm²) +DW(25μL)	(50 mg/cm²) +DPBS(50μl)	(32 mg/cm²) +DW(10μL)	(67 mg/cm²) +DPBS(40μL)
나일론 메시 사용 여부	사용하지 않음	필요한 경우	사용됨	사용하지 않음	사용됨	사용됨	사용하지 않음
전체 적용 시간	15분	60분	42분	15분	20분	42분	30분
적용 온도	실온	a) 실온에서 25분	실온	실온	실온	실온	37°
		b) 37°C에서 35분					
C) 후배양 용량							
배지 용량	2 mL	0.9 mL × 2	2 mL	1 mL	1 mL	2 mL	0.9 mL
MTT solution 용량	2 mL 0.3 mg/mL	300 μL 1 mg/mL	300 μL 1 mg/mL	500 μL 0.5 mg/mL	300 μL 1 mg/mL	300 μL 0.5 mg/mL	300 μL 0.4 mg/mL

D) 허용 기준							
음성대조군으로 처리한 조직 반복시료의 평균 OD(물 또는 DPBS)	≥ 0.6 및 ≤ 1.5	≥ 0.8 및 ≤ 2.8	≥ 0.8 및 ≤ 3	≥ 0.7 및 ≤ 2.5	≥ 0.8 및 ≤ 2.8	≥ 0.8 및 ≤ 2.5	≥ 0.7 및 ≤ 1.6
양성대조군(SDS 5%)으로 처리한 조직 반복시료의 평균 생존율, 음성대조군 대비 %로 표시	< 40%	< 20%	< 40%	< 40%	< 20 %	< 40%	$\leq 40\%$
조직 반복시료 간 표준편차	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$

RT: 실온(18~25℃)

DW: 증류수

DPBS: Dulbecco의 인산염 완충식염수

* 수량은 SOP에 설명된 대로 보정된 스폰으로 측정한다.

표 3. 각 시험법 및 숙련도 물질에서 얻은 세포 생존율(%) 참고 범위

목록에 제시된 값은 정보 목적으로 제공되며 각 시험법의 검증연구에 참여한 실험실에서 얻은 범위를 나타낸다. 이들 범위는 본 시험 가이드라인의 일부는 아니지만 시험법을 규제 목적 하에 일반적으로 사용하기 전 실험실에 처음으로 세팅할 때 유용하게 쓰일 수 있다.

	EpiSkin™ (SM) (23)	EpiDerm™ SIT (EPI-200) (23)	SkinEthic RhE™ (23)	LabCyte EPI-MODEL24 SIT (26)	epiCS® (43)(44)	Skin+® (42)(43)	KeraSkin™ SIT (51)
분류되지 않는 물질(UN GHS No Category)							
naphthalene acetic acid	92.3 +/- 5.2	100.7 +/- 8.4	104.0 +/- 12.9	100.4 +/- 7.6	99.3 +/- 10.4	94.6 +/- 17.9	81.8 +/- 15.0
isopropanol	88.1 +/- 8.7	65.6 +/- 16.5	101.0 +/- 11.3	76.7 +/- 7.0	97 +/- 6.8	90.7 +/- 27.5	76.6 +/- 9.4
methyl stearate	98.5 +/- 11.3	107.7 +/- 4.9	104.4 +/- 15.8	99.3 +/- 10.4	101 +/- 8.0	101.7 +/- 6.5	93.4 +/- 11.3
heptyl butyrate	102 +/- 4.2	107.1 +/- 4.2	92.1 +/- 17.5	105.4 +/- 11.1	100.3 +/- 5.1	79 +/- 17.8	87.3 +/- 11.9
hexyl salicylate	89 +/- 1.8	106.9 +/- 5.2	95.9 +/- 12.5	100.9 +/- 8.2	95 +/- 8.0	89.1 +/- 16.3	88.3 +/- 10.4
분류된 물질(UN GHS Category 2)							
cyclamen aldehyde	25.4 +/- 12.1	18.5 +/- 16.2	1.7 +/- 0.9	9.1 +/- 2.9	12.8 +/- 26.4	3 +/- 0.4	1.7 +/- 3.0
1-bromohexane	24.4 +/- 15.9	16.9 +/- 2.5	1.3 +/- 3.9	15.7 +/- 3.4	10.4 +/- 4.8	5.6 +/- 0.7	18.9 +/- 12.9
potassium hydroxide (5%aq.)	9.3 +/- 10.0	4.3 +/- 1	16.7 +/- 17	3.3 +/- 3.1	2.6 +/- 3.6	5.2 +/- 1.5	-1.2 +/- 2.0 ¹⁾
1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	23.8 +/- 17.8	7.35 +/- 2.7	8.2 +/- 7.1	5.8 +/- 3.7	38.8 +/- 37.9	4.5 +/- 0.7	5.4 +/- 9.5
heptanal	16.6 +/- 13.6	5.1 +/- 0.3	1.3 +/- 0.9	9.9 +/- 1.3	4.4 +/- 4.9	9.3 +/- 0.2	2.8 +/- 2.8

1) 음성 값은 감지 한계에 가까운 평균 세포 생존율 및 데이터의 변동(variation)을 나타낸다.

표 4. 본 시험 가이드라인에 포함된 MTT 시험법의 음성대조군 OD 값 허용범위

	허용 하한 값	허용 상한 값
EpiSkin™(SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™SIT(EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0.7	≤ 2.5
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8
Skin+®	≥ 0.8	≤ 2.5
KeraSkin™SIT	≥ 0.7	≤ 1.6

표 5. 본 시험 가이드라인에 포함된 시험법의 QC 배치 출하 기준

	허용 하한 값	허용 상한 값
EpiSkin™(SM) (SDS 18시간 처리) (32)	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™SIT(EPI-200) (1% Triton X-100) (33)	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 8.7 시간
SkinEthic™RHE (1% Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 10.0 시간
LabCyte EPI-Model 24 SIT (SDS 18시간 처리) (35)	IC ₅₀ = 1.4 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL
epiCS® (1% Triton X-100) (44)	ET ₅₀ = 2.0 시간	ET ₅₀ = 7.0 시간
Skin+® (1% Triton X-100) (42)	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 9.0 시간
KeraSkin™SIT (SDS 18시간 처리) (48)	IC ₅₀ = 1.5 mg/mL	IC ₅₀ = 4.8 mg/mL

부록 4. RhE 조직에서 추출한 MTT 포르마잔 측정을 위한 HPLC/UPLC-spectrophotometry 시스템의 적격성에 관한 주요 매개변수 및 허용 기준

매개변수	FDA 지침에서 파생된 프로토콜(36) (37)	허용 기준
선별성	살아있는 blank(아무것도 처리하지 않은 살아있는 RhE 조직의 이소프로판올 추출물), 죽은 blank(아무것도 처리하지 않은 죽은 RhE 조직의 이소프로판올 추출물)의 이소프로판올 분석	$\text{Area}_{\text{interference}} = \text{Area}_{\text{LLOQ}}$ 의 20% ¹
정밀도	이소프로판올의 품질 관리(즉, 1.6 µg/mL, 16 µg/mL, 160 µg/mL에서의 MTT 포르마잔) (n=5)	CV = 15% 또는 = LLOQ에 대해 20%
정확도	이소프로판올의 품질 관리(n=5)	%Dev = 15% 또는 = LLOQ에 대해 20%
매트릭스 효과	살아있는 blank(n=5)의 품질 관리	85% = 매트릭스 효과 % = 115%
캐리오버	ULOQ ² 표준 후 이소프로판올 분석	$\text{Area}_{\text{interference}} = \text{Area}_{\text{LLOQ}}$ 의 20%
재현성(1일 내)	세 번의 독립적인 보정곡선 (ULOQ(200 µg/mL) 에서 시작하여 이소프로판올 내 MTT 포르마잔을 6번 연속 1/3 희석) 이소프로판올의 품질 관리(n=5)	검량선: %Dev = 15% 또는 = LLOQ 품질 관리에 대해 20%, %Dev = 15% 및 CV = 15%
재현성(일간)	1일차: 1개의 검량선 및 이소프로판올의 품질 관리(n=3) 2일차: 1개의 검량선 및 이소프로판올의 품질 관리(n=3) 3일차: 1개의 검량선 및 이소프로판올의 품질 관리(n=3)	
RhE 조직 추출물의 MTT 포르마잔 단기 안정성	살아있는 blank(n=3)의 품질 관리, 샘플이 준비된 날 실온 (18~25°C)에서 24시간 보관 후 분석	%Dev = 15%
필요한 경우, RhE 조직 추출물의 MTT 포르마잔 장기 안정성	살아있는 blank(n=3)의 품질 관리, 샘플이 준비된 날 지정 온도(4°C, -20°C, -80°C)에서 며칠간 보관 후 분석	%Dev = 15%

참고:

¹LLOQ(Lower Limit of Quantification): 최소정량한계, 조직 생존율 1~2%, 즉 0.8µg/mL로 정의됨.

²ULOQ(Upper Limit of Quantification): 최대정량한계, 음성대조군의 이소프로판올 추출물에서 MTT 포르마잔 최고 예상농도보다 2배 이상 높게, 즉 200µg/mL로 정의됨.

OECD/OCDE

439

Adopted:
14 June 2021

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods

INTRODUCTION

1. Skin irritation refers to the production of reversible damage to the skin occurring after exposure to a substance or mixture [as defined by the United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)] (1). This Test Guideline (TG) provides an *in vitro* procedure that may be used for the hazard identification of irritant chemicals (substances and mixtures) in accordance with UN GHS Category 2 (1) (2). In member countries or regions that do not adopt the optional UN GHS Category 3 (mild irritants), this TG can also be used to identify non-classified chemicals. Therefore, depending on the regulatory framework and the classification system in use, this TG may be used to determine the skin irritancy of chemicals either as a stand-alone replacement test for *in vivo* skin irritation testing or as a partial replacement test within a testing strategy (3).

2. The assessment of skin irritation has typically involved the use of laboratory animals [OECD TG 404; originally adopted in 1981 and revised in 1992, 2002, and 2015] (4). For the testing of corrosivity, three validated *in vitro* test methods have been adopted as OECD TGs 430, 431 and 435 (5) (6) (7). A Guidance Document (GD) 203 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 test and non-test data for the assessment of skin irritation and skin corrosion potentials of chemicals and (ii) proposes an approach when further testing is needed (3).

3. This TG addresses the human health endpoint skin irritation. It is based on the *in vitro* test system of reconstructed human epidermis (RhE), which closely mimics the biochemical and physiological properties of the upper parts of the human skin, i.e. the epidermis. The RhE test system uses human derived non-transformed keratinocytes as cell source to reconstruct an epidermal model with representative histology and cytoarchitecture. Performance Standards (PS) are available to facilitate the validation and assessment of similar and modified RhE-based test methods, in accordance with the principles of GD 34 (8) (9). This TG was originally adopted in 2010, updated in 2013 to include additional test methods using the RhE models, updated in 2015 to refer to the GD 203 and introduce the use of an alternative procedure to measure viability, and updated subsequently to include additional test methods using the RhE models.

4. The test methods included in this TG are listed in Annex 2, which also provides information on the type of validation study used to validate the respective test methods. As noted in Annex 2, the Validated Reference Method (VRM) has been used to develop the present TG and the PS (8). Following an independent peer-review, all methods included in this TG were considered to meet the following minimum predictive capacity: 80% sensitivity, 70% specificity, and 75% accuracy. Mutual Acceptance of Data will only be guaranteed for test methods, which are validated according to the PS (8), if these test methods have been reviewed and adopted by OECD. The test methods included in this TG can be used indiscriminately to address countries' requirements for test results from *in vitro* test methods for skin irritation, while benefiting from the Mutual Acceptance of Data.

5. Definitions of terms used in this document are provided in ANNEX 1 - .

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

6. A limitation of the TG, as demonstrated by the full prospective validation study assessing and characterising RhE test methods (16), is that it does not allow the classification of chemicals to the optional UN GHS Category 3 (mild irritants) (1). Thus, the regulatory framework in member countries will decide how this TG will be used. For a full evaluation of local skin effects after a single dermal exposure, the GD 203 on IATA should be consulted (3). It is recognized that the use of human skin is subject to national and international ethical considerations and conditions.

7. This TG addresses the human health endpoint skin irritation. While this TG does not provide adequate information on skin corrosion, it should be noted that OECD TG 431 on skin corrosion is based on the same RhE test system, though using another protocol (6). This TG is based on RhE models using human keratinocytes, which therefore represent *in vitro* the target organ of the species of interest; moreover, it directly covers the initial step of the inflammatory cascade/mechanism of action (cell and tissue damage resulting in localised trauma) that occurs during irritation *in vivo*. A wide range of chemicals has been tested in the validation study of the VRM underlying this TG and the database of the VRM validation study amounted to 58 chemicals in total (16) (18) (23). The TG is applicable to solids, liquids, semi-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 pre-treatment of the sample is required. Gases and aerosols have not been assessed yet in a validation study (29). While it is conceivable that these can be tested using RhE technology, the current TG does not allow testing of gases and aerosols.

8. When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this TG, 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. 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 TG to a specific category of mixtures (e.g. following a strategy as proposed in Eskes et al (30)), the TG should not be used for that specific category of mixtures. Similar care should be taken in case specific chemical classes or physico-chemical properties are found not to be applicable to the current TG. A study comparing *in vitro* and *in vivo* data for 65 agrochemical formulations revealed an overall accuracy of 54% (based on 65 agrochemical formulations), a sensitivity of 44% (based on 25 formulations) and a specificity of 60% (based on 40 formulations). This data indicates a lack of applicability of the RhE based *in vitro* skin irritation test for agrochemical formulations (47).

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 cell viability measurements and need the use of adapted controls for corrections (see paragraphs 27-33).

10. A single testing run composed of three replicate tissues should be sufficient for a test chemical when the classification is unequivocal. However, in cases of borderline results, such as non-concordant replicate measurements and/or mean percent viability equal to $50 \pm 5\%$, a second run should be considered, as well as a third one in case of discordant results between the first two runs.

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. Chemical-induced skin irritation, manifested mainly by erythema and oedema, is the result of a cascade of events beginning with penetration of the chemicals through the *stratum corneum* where they may damage the underlying layers of keratinocytes and other skin cells. The damaged cells may either release inflammatory mediators or induce an inflammatory cascade which also acts on the cells in the dermis, particularly the stromal and endothelial cells of the blood vessels. It is the dilation and increased permeability of the endothelial cells that produce the observed erythema and oedema (29). Notably, the RhE-based test methods, in the absence of any vascularisation in the *in vitro* test system, measure the initiating events in the cascade, e.g. cell / tissue damage (16) (17), using cell viability as readout.

13. Cell viability in RhE model is measured by enzymatic conversion of the vital dye MTT [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue; CAS number 298-93-1], into a blue formazan salt that is quantitatively measured after extraction from tissues (31). Irritant chemicals are identified by their ability to decrease cell viability below the defined threshold levels (i.e. $\leq 50\%$, for UN GHS Category 2). Depending on the regulatory framework and applicability of the TG, test chemicals that produce cell viabilities above the defined threshold level, may be considered non-irritants (i.e. $> 50\%$, No Category).

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

14. Prior to routine use of any of the validated test methods that adhere to this TG (Annex 2), laboratories should demonstrate technical proficiency, using the ten Proficiency Substances listed in Table 1. Users of specific methods included in the TG may want to consult Table 2 in Annex 3 for indicative ranges of cell viability achieved for individual proficiency substances listed in Table 1 below. In situations where, for instance, a listed substance is unavailable or cannot be used for other justified reasons, 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 (8)) provided that the same selection criteria as described in Table 1 are applied. Using an alternative proficiency substance should be justified.

15. As part of the proficiency testing, it is recommended that users verify the barrier properties of the tissues after receipt as specified by the RhE model producer. 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 acquired and demonstrated, such verification will not be necessary on a routine basis.

Table 1. Proficiency Substances ¹

Substance	CAS NR	<i>In vivo</i>	Physical	UN GHS
-----------	--------	----------------	----------	--------

		score ²	state	Category
NON-CLASSIFIED SUBSTANCES (UN GHS No Category)				
naphthalene acetic acid	86-87-3	0	Solid	No Cat.
isopropanol	67-63-0	0.3	Liquid	No Cat.
methyl stearate	112-61-8	1	Solid	No Cat.
heptyl butyrate	5870-93-9	1.7	Liquid	No Cat. (Optional Cat. 3) ³
hexyl salicylate	6259-76-3	2	Liquid	No Cat. (Optional Cat. 3) ³
CLASSIFIED SUBSTANCES (UN GHS Category 2)				
cyclamen aldehyde	103-95-7	2.3	Liquid	Cat. 2
1-bromohexane ⁴	111-25-1	2.7	Liquid	Cat. 2
potassium hydroxide (5% aq.)	1310-58-3	3	Liquid	Cat. 2
1-methyl-3-phenyl-1-piperazine ⁴	5271-27-2	3.3	Solid	Cat. 2
heptanal	111-71-7	3.4	Liquid	Cat. 2

Notes:

¹ The Proficiency Substances are a subset of the substances used in the validation study and the selection is based on the following criteria: (i) the chemical substances are commercially available; (ii) they are representative of the full range of Draize irritancy scores (from non-irritant to strong irritant); (iii) they have a well-defined chemical structure; (iv) they are representative of the chemical functionality used in the validation process; (v) they provided reproducible *in vitro* results across multiple testing and multiple laboratories; (vi) they were correctly predicted *in vitro*, and (vii) they are not associated with an extremely toxic profile (e.g. carcinogenic or toxic to the reproductive system) and they are not associated with prohibitive disposal costs.

² *In vivo* score in accordance with the OECD TG 404 (4).

³ Under this TG, the UN GHS optional Category 3 (mild irritants) (1) is considered as No Category.

⁴ 1-methyl-3-phenyl-1-piperazine and 1-bromohexane can have variable results in different laboratories dependent on the supplier and could be considered as suggested in paragraph 14.

PROCEDURE

16. The following is a description of the components and procedures of a RhE test method for skin irritation assessment (See also Annex 3 for parameters related to each test method). Standard Operating Procedures (SOPs) for the test methods complying with this TG are available (32) (33) (34) (35) (42) (44) (48).

RHE TEST METHOD COMPONENTS**General Conditions**

17. 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*. *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 tissue 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. 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

18. The assay used for quantifying viability is the MTT assay (31). The viable cells of the RhE tissue construct can 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 optical density (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 (36), as further explained in paragraph 33. 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 (in the Skin Irritation Test Method conditions) is established by the RhE model developer/supplier. Acceptability ranges for the validated RhE test methods included in this TG are given in Annex 3, Table 4. An HPLC/UPLC-Spectrophotometry user should use the negative control OD ranges provided in Annex 3, Table 4 as the acceptance criterion for the negative control. It should be documented that the tissues treated with the negative control are stable in culture (provide similar viability measurements) for the duration of the test exposure period.

Barrier function

19. The *stratum corneum* and its lipid composition should be sufficient to resist the rapid penetration of cytotoxic benchmark chemicals, e.g. SDS or Triton X-100, as estimated by IC50 or ET50 (Annex 3, Table 5).

Morphology

20. Histological examination of the RhE model should be provided demonstrating human epidermis-like structure (including multi-layered *stratum corneum*).

Reproducibility

21. The results of the positive and negative controls of the test method should demonstrate reproducibility over time.

Quality control (QC)

22. 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 18), barrier function (paragraph 19) and morphology (paragraph 20) are the most relevant. These data should be provided to the test method users, so that they are able to include this information in the test report. An acceptability range (upper and lower limit) for the IC50 or the ET50 should be established by the RhE model developer/supplier. Only results produced with qualified tissues can be accepted

for reliable prediction of irritation classification. The acceptability ranges for the test methods included in this TG are given in Annex 3, Table 5.

Application of the Test Chemical and Control Substances

23. At least three replicates should be used for each test chemical and for the controls in each run. For liquid as well as solid chemicals, sufficient amount of test chemical should be applied to uniformly cover the epidermis surface, i.e. ranging from 26 to 83 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ or mg/cm^2 (see Annex 3). For solid chemicals, the epidermis surface should be moistened with deionised or distilled water before application, to improve contact between the test chemical and the epidermis surface. Whenever possible, solids should be tested as a fine powder. A nylon mesh may be used as a spreading aid for all test conditions (see Annex 3). At the end of the exposure period, the test chemical should be carefully washed from the epidermis surface with aqueous buffer, or 0.9% NaCl. Depending on the RhE test methods used, the exposure period ranges between 15 and 60 minutes, and the incubation temperature between 20 and 37°C. These exposure periods and temperatures are optimized for each individual RhE test method and represent the different intrinsic properties of the test methods (e.g. barrier function) (see Annex 3).

24. Concurrent negative control (NC) and positive control (PC) should be used in each run to demonstrate that viability (using the NC), barrier function and resulting tissue sensitivity (using the PC) of the tissues are within a defined historical acceptance range. The suggested PC is 5% aqueous SDS. The suggested NCs is either water or phosphate buffered saline (PBS).

Cell Viability Measurements

25. According to the test procedure, it is essential that the viability measurement is not performed immediately after exposure to the test chemical, but after a sufficiently long post-treatment incubation period of the rinsed tissue in fresh medium. This period allows both for recovery from weak cytotoxic effects and for appearance of clear cytotoxic effects. A 42 hours post-treatment incubation period was found optimal during test optimisation of two of the RhE-based test methods underlying this TG (11) (12) (13) (14) (15), and is now a standard parameter for all test methods included in this TG.

26. The MTT assay is a standardised quantitative method which should be used to measure cell viability under this TG. It is compatible with use in a three-dimensional tissue construct. The tissue sample is placed in MTT solution of appropriate concentration (e.g. 0.3 - 1 mg/mL) for 3 hours. The MTT is converted into blue formazan by the viable cells. 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 using an HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure (see paragraph 33) (36).

27. Optical properties of the test chemical or its chemical action on MTT (e.g. chemicals may prevent or reverse the colour generation as well as cause it) may interfere with the assay leading to a false estimate of viability. This may occur when a specific test chemical is not completely removed from the tissue by rinsing or when it penetrates the epidermis. If a test chemical acts directly on the MTT (e.g. MTT-reducer), is naturally coloured, or becomes coloured during tissue treatment, additional controls should be used to detect and correct for test chemical interference with the viability measurement technique (see paragraphs 28 and 32). Detailed description of how to correct direct MTT

reduction and interferences by colouring agents is available in the SOPs for the validated test methods included in this TG (32) (33) (34) (35) (42) (44) (48).

28. To identify direct MTT reducers, each test chemical should be added to freshly prepared MTT solution. If the MTT mixture containing the test chemical turns blue/purple, the test chemical is presumed to directly reduce MTT and a further functional check on non-viable RhE tissues 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 a similar way as viable tissues. Each MTT reducing test chemical is applied on at least two killed tissue replicates which undergo the entire testing procedure to generate a non-specific MTT reduction (NSMTT) (32) (33) (34) (35) (42) (44) (48). A single NSMTT control is sufficient per test chemical regardless of the number of independent tests/runs performed. 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).

29. 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 32 and 33). When performing the standard absorbance (OD) measurement, each interfering coloured test chemical is applied on at least two viable tissue replicates, which undergo the entire testing procedure 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 to the testing of the coloured test chemical and in case of multiple testing, an independent NSCliving control needs to be conducted with each test performed (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).

30. Test chemicals that are identified as producing both direct MTT reduction (see paragraph 28) and colour interference (see paragraph 29) 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 28. 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 (NSCKilled) needs to be performed. In this additional control, the test chemical is applied on at least two killed tissue replicates, 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).

31. 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. 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 is already $\leq 50\%$. Nevertheless, results for test chemicals producing %NSMTT and/or %NSCliving $\geq 50\%$ of the negative control should be taken with caution as this is the cut-off used to distinguish classified from not classified chemicals (see paragraph 35).

32. 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 33) (36). The HPLC/UPLC-spectrophotometry system allows for the separation of the MTT formazan from the test chemical before its quantification (36). 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 28). 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.

33. 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 (36). 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 (36) (37). 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 TG.

Acceptability Criteria

34. For each test method using valid RhE model batches (see paragraph 22), tissues treated with the negative control should exhibit OD reflecting the quality of the tissues that followed shipment, receipt steps and all protocol processes. Control OD values should not be below historically established boundaries. Similarly, tissues treated with the PC, i.e. 5% aqueous SDS, should reflect their ability to respond to an irritant chemical under the conditions of the test method (see Annex 3 and for further information SOPs of the test methods included in this TG (32) (33) (34) (35) (42) (44) (48). Associated and appropriate measures of variability between tissue replicates, i.e., standard deviations (SD) should fall within the acceptance limits established for the test method used (see Annex 3).

Interpretation of Results and Prediction Model

35. The OD values obtained with each test chemical can be used to calculate the percentage of viability normalised to the negative control, which is set to 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 value of percentage cell viability distinguishing irritant from non-classified test chemicals and the statistical procedure(s) used to evaluate the results and identify irritant chemicals should be clearly defined, documented, and proven to be appropriate (see SOPs of the test methods for information). The cut-off values for the prediction of irritation are given below:

- The test chemical The test chemical is identified as requiring classification and labelling according to UN GHS (Category 2 or Category 1) if the mean percent tissue viability after exposure and post-treatment incubation is less than or equal (\leq) to 50%. Since the RhE test methods covered by this TG cannot resolve between UN GHS Categories 1 and 2, further information on skin corrosion will be required to decide on its final classification [see also the GD 203 (3)]. In case the test chemical is found to be non-corrosive (e.g., based on TG 430, 431 or 435), and shows tissue viability after exposure and post-treatment incubation is less than or equal (\leq) to 50%, the test chemical is considered to be irritant to skin in accordance with UN GHS Category 2.
- Depending on the regulatory framework in member countries (e.g., in case of non-adoption of the optional UN GHS Category 3), the test chemical may be considered as non-irritant to skin in accordance with UN GHS No Category if the tissue viability after exposure and post-treatment incubation is more than ($>$) 50%.

DATA AND REPORTING

Data

36. For each run, data from individual replicate tissues (e.g. OD values and calculated percentage cell viability data for each test chemical, including classification) should be reported in tabular form, including data from repeat experiments as appropriate. In addition means \pm SD for each run should be reported. Observed interactions with MTT reagent and coloured test chemicals should be reported for each tested chemical.

Test Report

37. 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), including spectral information for UVCB if possible, 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 the choice, 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 and temperature of exposure and post-exposure incubation period;
- 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);
- Description of decision criteria/prediction model applied based on the R_{hE} model used;
- Description of any modifications to 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 chemical for each run and each replicate measurement including OD or MTT formazan peak area, percent tissue viability, mean percent tissue viability and SD;
- 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, SD, 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

- Any deviations from the guideline that are identified during the test, and whether they impacted the results from the assay or not.

LITERATURE

1. United Nations (UN). (2019). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second 8th Revised Edition, UN New York and Geneva, 2019. Available at: [<https://unece.org/ghs-rev8-2019>].
2. EURL-ECVAM. (2009). Statement on the "Performance Under UN GHS of Three *In vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards", Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]
3. OECD. (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. OECD. (2015). OECD Guideline for Testing of Chemicals. (No. 404.): Acute Dermal Irritation, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
5. OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 430.): *In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER).
6. OECD. (2016). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431.): *In vitro* Skin Model. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
7. OECD. (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 435.): *In vitro* Membrane Barrier Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
8. OECD. (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In vitro* Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 220). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
9. 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.
10. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in vitro* 15, 57-93.
11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in vitro* 16, 765-770.
12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107-114.
13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005). The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005). The *In vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, ATLA 33, 329-349.
15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
16. Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, ATLA 35, 559-601.
17. Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing]
18. Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, ATLA 35, 603-619.
19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, AATEX, 14, 351-358.
20. EURL-ECVAM. (2007). Statement on the Validity of *In vitro* Tests for Skin Irritation, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing].
21. EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In vitro* Skin Irritation Testing. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] N.B. These are the original PS used for the validation of two test methods. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available.
22. EURL-ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing].
23. OECD. (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No. 137.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
24. Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, J Toxicol Sci, 34, 327-334.
25. Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, AATEX, 16, 111-122.
26. OECD. (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing

- and Assessment (No. 159.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
27. OECD. (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 155.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
 28. Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omoni, T. (2012). Validation Study of the *In vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
 29. Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In vitro* 18, 231-243.
 30. 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.
 31. Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
 32. EpiSkin™. (February 2009). SOP, Version 1.8, ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
 33. EpiDerm™. (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200). Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
 34. SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing.html].
 35. LabCyte. (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model "LabCyte EPI-MODEL24" Available at: [<http://www.jppe.co.jp/english/business/LabCyte/Testprotocol.pdf>].
 36. 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. (2015) Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry 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. *Toxicol In vitro*. 29(4), 741-761.
 37. 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>].
 38. Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: *Practical Contact Dermatitis*, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
 39. EURL-ECVAM. (2009). Performance Standards for *In vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing] N.B. This is the

current version of the ECVAM PS, updated in 2009 in view of the implementation of UN GHS. These PS should not be used any longer as an updated version (8) is now available related to the present TG.

40. EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009. Available at: [http://www.ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/alt-animal-testing].
41. EC. (2001). Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th Time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions Relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances, Official Journal of the European Union L225, 1-333.
42. Skin+ ® RHE SOP, Version 5.0 (May 2016), Skin Irritation Test for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals with Sterlab's RHE: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation. Available at [http://www.sterlab-store.com/wp-content/uploads/SOP_Sterlab_skin_irritation_v5-May-2016.pdf].
43. Peer Review Report of the Validation of the Skin Irritation Tests Using Skin+ ® and Using epiCS® (2018)
44. epiCS® RHE SOP, Version 5.1 (January 2017) Skin Irritation Test for use with CellSystems Reconstructed Human Epidermal Model epiCS® Test Method 20 min application + 42 hours Post- Incubation. Available at [<https://reconstructed-human-epidermis.com/user-data/downloads/manuels-sops/INVITTOX%20protocol%20epiCS%20Skin%20Irritation%20version%205.1%2C%2001.2017.pdf>].
45. ESAC Opinion on the Validation Study of the epiCS® Test Method based on the EURL ECVAM/OECD Performance Standards for *in vitro* Skin Irritation Testing using Reconstructed human Epidermis (RHE), ESAC Opinion Number 2016-05
46. EURL ECVAM Status Report on the Development, Validation and Regulatory Acceptance of Alternative Methods and Approaches (2016)
47. Kolle S.N, van Ravenzwaay B. and Landsiedel R. (2017). Regulatory accepted but out of domain: *In vitro* skin irritation tests for agrochemical formulations. Regul. Toxicol. Pharmacol 89, 125-130.
48. KeraSkin™ SIT SOP, Version 1.5 (January, 2019), KeraSkin™ skin irritation test operation protocol. Available at: [<http://www.keraskin.co.kr/eng/product/skinmodel.asp>]
49. Jung, K.M., Lee, S.H., Jang, W.H., Jung, H.S., Heo, Y., Park, Y.H., Bae, S., Lim, K.M., Seok, S.H., 2014. KeraSkin-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA 28, 742-750.
50. Han, J., Kim, S., Lee, S.H., Kim, J.S., Chang, Y.J., Jeong, T.C., Kang, M.J., Kim, T.S., Yoon, H.S., Lee, G.Y., Bae, S., Lim, K.M., 2020. Me-too validation study for *in vitro* skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, KeraSkin for OECD test guideline 439. Regulatory toxicology and pharmacology : 117, 104725.
51. OECD (2021). Validation study report and Independent Peer-Review Report for inclusion of KeraSkin™ SIT to the Test Guideline 439 on *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 339.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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 (9).

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 (9).

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 by the United Nations (UN)): 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.

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

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

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.

NSKilled: Non-Specific Colour in killed tissues.

NSCliving: Non-Specific Colour in living tissues.

NSMTT: Non-Specific MTT reduction.

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 comparable levels of accuracy and reliability, based on what was obtained for the validated test method, that the proposed test method should demonstrate when evaluated using the minimum list of Reference Chemicals (9).

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.

Relevance: Description of relationship of the test to the effect of interest and whether it is meaningful and useful for a particular purpose. It is the extent to which the test correctly measures or predicts the biological effect of interest. Relevance incorporates consideration of the accuracy (concordance) of a test method (9).

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 (9).

Replacement test: A test which is designed to substitute for a test that is in routine use and accepted for hazard identification and/or risk assessment, and which has been determined to provide equivalent or improved protection of human or animal health or the environment, as applicable, compared to the accepted test, for all possible testing situations and chemicals (9).

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 test chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (9).

Skin irritation *in vivo*: The production of reversible damage to the skin following the application of a test chemical for up to 4 hours. Skin irritation is a locally arising reaction of the affected skin tissue and appears shortly after stimulation (38). It is caused by a local inflammatory reaction involving the innate (non-specific) immune system of the skin tissue. Its main characteristic is its reversible process involving inflammatory reactions and most of the clinical characteristic signs of irritation (erythema, oedema, itching and pain) related to an inflammatory process.

Specificity: The proportion of all negative/inactive test chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (9).

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 tested.

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography.

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

ANNEX 2 - TEST METHODS INCLUDED IN THIS TG

Pre-validation, optimisation and validation studies have been completed for seven commercially available *in vitro* test methods (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (43) (45) (50) (51) based on the RhE test system with the following minimum of predictive capacity: (80% sensitivity, 70% specificity, and 75% accuracy). These seven test methods are included in this TG and are listed below, together with the type of validation study used to validate the respective test methods. The VRMs that have been used to develop the present TG and the PS (8) are EpiSkin™ and EpiDerm™ SIT (EPI-200).

Nr.	Test method name	Validation study type	References
1	EpiSkin™ (VRM)	Full prospective validation study (2003-2007). The test method components of this method were used to define the essential test method components of the original and updated ECVAM PS (39) (40) (21)*. Moreover, the method's data relating to identification of non-classified vs classified substances formed the main basis for defining the specificity and sensitivity values of the original PS*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200) (VRM)	EpiDerm™ (original): Initially the test method underwent full prospective validation together with Nr. 1. from 2003-2007. The test method components of this method were used to define the essential test methods components of the original and updated ECVAM PS (39) (40) (21)*. EpiDerm™ SIT (EPI-200): A modification of the original EpiDerm™ was validated using the original ECVAM PS (21) in 2008*	(2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33)
3	SkinEthic™ RHE	Validation study based on the original ECVAM Performance Standards (21) in 2008*.	(2) (21) (22) (23) (31)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Validation study (2011-2012) based on the Performance Standards (PS) of OECD TG 439 (8) which are based on the updated ECVAM PS* (39) (40).	(24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) and PS of this TG (8)*
5	epiCS*	Performance Standards based Validation Study for SIT according to OECD GD 220 (8) following ESAC opinion in 2016 (45) and independent peer review in 2018 (43)	(1) (8) (23) (39) (40) (44) (43) (45)
6	Skin+®	Performance Based Validation Study for SIT according to OECD GD 220 (8) following ECVAM opinion in 2016 (46) and independent peer review in 2018 (43)	(1) (8) (23) (39) (40) (42) (43) (46)
7	KeraSkin™ SIT	Performance Standards based Validation Study according to OECD GD 220 (8) followed by independent peer-review in 2020.	(48) (49) (50) (51)

Note: The original ECVAM Performance Standards (PS) (21) were developed in 2007 upon completion of the prospective validation study (16) which had assessed the performance of test methods Nr 1 and 2 in reference to the classification system as described in the 28th amendment to the EU Dangerous Substances Directive (41). In 2008 the UN GHS was introduced (1), effectively shifting the cut-off value for distinguishing non-classified from classified substances from an *in vivo* score of 2.0 to 2.3. To adapt to this changed regulatory requirement, the accuracy values and reference chemical list of the ECVAM PS were updated in 2009 (2) (39) (40). As the original PS, also the updated PS were largely based data from methods Nr. 1 and 2 (16), but additionally used data on reference chemicals from method Nr. 3. In 2010, the updated ECVAM PS were used for stipulating the PS related to this TG (8). For the purpose of this TG, EpiSkin™ is considered the VRM, due to the fact that it was used to develop all the criteria of the PS. Detailed information on the validation studies, a compilation of the data generated as well as background to the necessary adaptations of the PS as a consequence of the UN GHS implementation can be found in the ECVAM/BfR explanatory background document to this OECD TG (23).

SIT: Skin Irritation Test

RHE: Reconstructed Human Epidermis

ANNEX 3 - PROTOCOL PARAMETERS SPECIFIC TO EACH OF THE TEST METHODS INCLUDED IN THIS TG

Table 2- Overview of protocol parameters for each test method included in this TG

The RhE methods do show very similar protocols and notably all use a post-incubation period of 42 hours at 37°C (32) (33) (34) (35) (42) (44) (48). Variations concern mainly three parameters relating to the different barrier functions of the test methods and listed here: A) pre-incubation time and volume, B) Application of test chemicals and C) Post-incubation volume.

	EpiSkin™ (SM) (23)	EpiDerm™ SIT (EPI-200) (23)	SkinEthic RHE™ (23)	LabCyte EPI-MODEL24 SIT (26)	epiCS® (43)(44)	Skin+® (42)(43)	KeraSkin™ SIT (48)
A) Pre-incubation							
Incubation time	18- 24 hours	18-24 hours	≥ 2 hours	15-30 hours	4 hours or overnight	2 hours or overnight	20-24 hours
Medium volume	2 mL	0.9 mL	0.3 or 1 mL	0.5 mL	1 mL	1 mL	0.9 mL
B) Test chemical application							
For liquids	10 µL (26 µL/cm²)	30 µL (47 µL/cm²)	16 µL (32 µL/cm²)	25 µL (83 µL/cm²)	30 µL (50 µL/cm²)	16 µL (32 µL/cm²)	40 µL (67 µL/cm²)
For solids	10 mg (26 mg/cm²) + DW (5 µL)	25 mg* (39 mg/cm²) + DPBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm²) + DW (10 µL)	25 mg (83 mg/cm²) + DW (25 µL)	30 mg (50 mg/cm²) + DPBS (50 µl)	16 mg (32 mg/cm²) + DW (10 µL)	40 mg (67 mg/cm²) + DPBS (40 µL)
Use of nylon mesh	Not used	If necessary	Applied	Not used	Applied	Applied	Not used
Total application time	15 minutes	60 minutes	42 minutes	15 minutes	20 minutes	42 minutes	30 minutes
Application temperature	RT	a) at RT for 25 minutes b) at 37°C for 35 minutes	RT	RT	RT	RT	37°C

C) Post-incubation volume							
Medium volume	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL	1 mL	2 mL	0.9 mL
MTT solution	2 mL 0.3 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	500 µL 0.5 mg/mL	300 µL 1 mg/mL	300 µL 0.5 mg/mL	300 µL 0.4 mg/mL
D) Acceptability Criteria							
Mean OD of the tissue replicates treated with the negative control (water or DPBS)	≥ 0.6 and ≤ 1.5	≥ 0.8 and ≤ 2.8	≥ 0.8 and ≤ 3	≥ 0.7 and ≤ 2.5	≥ 0.8 and ≤ 2.8	≥ 0.8 and ≤ 2.5	≥ 0.7 and ≤ 1.6
Mean viability of the tissue replicates treated with the positive control (SDS 5%), expressed as % of the negative control	< 40%	< 20%	< 40%	< 40%	< 20 %	< 40%	$\leq 40\%$
Standard deviation between tissue replicates	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$	SD $\leq 18\%$

RT: Room temperature (18 – 25°C)

DW: distilled water

DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffer Saline

*Quantity is measured with a calibrated spoon, as described in the SOP

Table 3- Indicative ranges of cell viability values (%) obtained for each test method and proficiency substance

These values are provided for information purposes and reflect the ranges obtained by laboratories participating in the validation study of individual methods. These ranges are not part of the TG, but can be useful for a laboratory setting up the method for the first time before routine use for regulatory purposes.

	EpiSkin™ (SM) (23)	EpiDerm™ SIT (EPI-200) (23)	SkinEthic RHE™ (23)	LabCyte EPI- MODEL24 SIT (26)	epiCS® (43)(44)	Skin+® (42)(43)	KeraSkin™ SIT (51)
NON-CLASSIFIED SUBSTANCES (UN GHS No Category)							
naphthalene acetic acid	92.3 +/- 5.2	100.7 +/-8.4	104.0 +/- 12.9	100.4 +/-7.6	99.3 +/- 10.4	94.6 +/- 17.9	81.8 +/-15.0
isopropanol	88.1 +/- 8.7	65.6 +/-16.5	101.0 +/-11.3	76.7 +/-7.0	97 +/-6.8	90.7 +/- 27.5	76.6 +/-9.4
methyl stearate	98.5 +/- 11.3	107.7 +/-4.9	104.4 +/-15.8	99.3 +/-10.4	101 +/-8.0	101.7 +/- 6.5	93.4 +/-11.3
heptyl butyrate	102 +/-4.2	104.1 +/-4.2	92.1 +/-17.5	105.4 +/-11.1	100.3 +/- 5.1	79 +/-17.8	87.3 +/-11.9
hexyl salicylate	89 +/-1.8	106.9 +/-5.2	95.9 +/-12.5	100.9 +/-8.2	95 +/-8.0	89.1 +/- 16.3	88.3 +/-10.4
CLASSIFIED SUBSTANCES (UN GHS Category 2)							
cyclamen aldehyde	25.4 +/- 12.1	18.5 +/-16.2	1.7 +/- 0.9	9.1 +/-2.9	12.8 +/- 26.4	3 +/-0.4	1.7 +/-3.0
1-bromohexane	24.4 +/- 15.9	16.9 +/-2.5	1.3 +/-3.9	15.7 +/-3.4	10.4 +/-4.8	5.6 +/-0.7	18.9 +/-12.9
potassium hydroxide (5% aq.)	9.3+/-10.0	4.3 +/-1	16,7 +/-17	3.3 +/-3.1	2.6 +/-3.6	5.2 +/-1.5	-1.2 +/-2.0 ¹

¹ The negative value indicates mean cell viability close to the detection limit and variation in the data.

1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	23.8+/-17.8	7.35 +/-2.7	8,2 +/-7.1	5.8 +/-3.7	38.8 +/-37.9	4.5 +/-0.7	5.4 +/-9.5
heptanal	16.6+/-13.6	5.1 +/-0.3	1.3 +/-0.9	9.9 +/-1.3	4.4 +/-4.9	9.3 +/-0.2	2.8 +/-2.8

Table 4. Acceptability ranges for negative control OD values in the MTT assay of the test methods included in this TG

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	≥ 0.7	≤ 2.5
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8
Skin+®	≥ 0.8	≤ 2.5
KeraSkin™ SIT	≥ 0.7	≤ 1.6

Table 5. QC batch release criteria of the test methods included in this TG

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiSkin™ (SM) (18 hours treatment with SDS) (32)	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100) (33)	ET ₅₀ = 4.0 hr	ET ₅₀ = 8.7 hr
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (34)	ET ₅₀ = 4.0 hr	ET ₅₀ = 10.0 hr
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 hours treatment with SDS) (35)	IC ₅₀ = 1.4 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL
epiCS® (1% Triton X-100) (44)	ET ₅₀ = 2.0 hr	ET ₅₀ = 7.0 hr
Skin+® (1% Triton X-100) (42)	ET ₅₀ = 4.0 hr	ET ₅₀ = 9.0 hr
KeraSkin™ SIT (18 hours treatment with SDS) (48)	IC ₅₀ = 1.5 mg/mL	IC ₅₀ = 4.8 mg/mL

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) (37)	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)	$Area_{interference} = 20\% \text{ of } Area_{LLOQ}^1$
Precision	Quality Controls (i.e., MTT formazan at 1.6 µg/mL, 16 µg/mL and 160 µg/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	$Area_{interference} = 20\% \text{ of } Area_{LLOQ}$
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 µg/mL); Quality Controls in isopropanol (n=5)	Calibration Curves: %Dev = 15% or = 20% for LLOQ
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)	Quality Controls: %Dev = 15% and CV = 15%
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 (18 – 25°C)	%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%

Notes:

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 등 피부자극 동물대체시험법(인체피부모델을 이용한 피부자극 시험법) 가이드라인(민원인 안내서) ”

발 행 일	2021년 8월
발 행 인	식품의약품안전평가원장 서경원
편집위원장	독성평가연구부장 정자영
편 집 위 원	윤혜성, 김광진, 윤소영, 강남희, 이정선, 홍미혜, 차민희
도움주신분	임경민(이화여자대학교), 배옥남(한양대학교), 안수선(아모레퍼시픽)
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

공익신고자 보호제도란?

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

[공직자 부조리 및 공직신고안내]

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

♣ 보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과.

전화 044-200-7773