등록번호
11-1471057-000514-14

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (IL-8 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인

(민원인 안내서)

2021. 9.

식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭	화장품 피부감작성 동물대체시험법(IL-8 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

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

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2021년 9월 17일

담당자 강남희

확 인(부서장) 김광진

이 안내서는 화장품 피부감작성 동물대체시험법(IL-8 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2021년 9월 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

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1149-01	2021.9.	화장품 피부감작성 동물대체시험법 (IL-8 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인 제정

목 차

Ⅰ. 개요 ····· 6

Ⅱ. 시험원리 ····· 6

Ⅲ. 제한점 및 고려사항 ····· 6

Ⅳ. 시험방법 ····· 7

Ⅴ. 인정요건 ····· 10

Ⅵ. 시험결과 및 보고 ····· 11

- 별첨 1 : 번역본 (OECD TG 442E 부속서 Ⅲ)

- 별첨 2 : 원문 (OECD TG 442E ANNEX Ⅲ)

화장품 피부감작성 동물대체시험법
(IL-8 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인

Ⅰ. 개요

IL-8 루시퍼라아제(Interleukin-8 luciferase) 시험법은 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 대비 IL-8의 발현량을 측정하여 피부감작물질을 구별하는 시험법이다.

본 시험법은 IL-8과 GAPDH의 발현량을 측정하기 위해 형질주입(transfection) 된 세포에 피부감작성 물질을 적용한 후 발광측정장치(luminometer)로 정량하여 비감작물질과 피부감작물질을 구별하는데 활용되는 시험법이다.

Ⅱ. 시험원리

본 시험법은 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)에서 세 번째 핵심 단계인 수지상 세포(Dendritic Cells, DC)의 활성화와 관련된 사이토카인(cytokine) IL-8 발현의 변화를 정량화하는 시험으로 피부감작성 물질을 적용한 후 THP-G8 세포의 SLO(Stable Luciferase Orange, SLO) 및 SLR(Stable Luciferase Red, SLR)과 반딧불이(firefly) D-루시페린이 반응하여 발생하는 주황색(SLO)과 적색(SLR)의 발현량이 대조군에 비해 증가된 정도를 측정하여 비감작물질과 피부감작물질을 구별한다.

Ⅲ. 제한점 및 고려사항

본 시험법은 화학물질의 유해성 분류와 표시를 위해 비감작성물질로부터 피부감작성 물질을 구별하기 위한 통합독성평가(IATA)의 일부로서 충분히 유용하다고 간주된다.

IL-8 루시퍼라아제 시험법은 다양한 유기작용기(organic functional group), 반응 메커니즘(reaction mechanism) 및 피부감작능을 가진 시험물질에 적용 가능한 것으로 간주된다. 반면에 계면활성제, 무수화합물 및 루시퍼라아제 간섭 물질은 본 시험법의 적용범위에서 벗어난다.

IL-8 루시퍼라아제 시험법은 높은 수준의 피부감작능(skin sensitisation potency)을 나타내는 화학물질(UN GHS subcategory 1A)에 비해 낮거나 중간 수준의 피부감작능을 나타내는 화학물질(UN GHS subcategory 1B)에서 위음성 예측 발생 가능성이 높다.

본 시험법의 결과는 피부감작성 물질의 유해성 확인에 대한 정보를 제공하며, 통합독성평가(Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA)의 맥락 내에서 OECD TG 442E의 총론(General introduction)에 따라 다른 시험 결과와 조합(별첨 1의 참고문헌[4][5][6] 참조)하여 고려되어야 한다.

IV. 시험방법

4.1. 세포 준비

본 시험법은 GPC Lab. Co. Ltd.(Tottori, Japan)에서 구매한 THP-G8 세포주를 사용한다. 세포 수령 후 계대배양(2~4 계대)하고 균일한 stock으로 냉동 보관하며, 최대 12 계대(passage) 또는 최대 6주까지 시험에 사용한다.

먼저 세포의 적격 여부를 확인하기 위해 세포를 해동하고 1~2주 또는 2~4 계대 배양한 후 양성대조물질 4-nitrobenzyl bromide(4-NBB)와 음성대조물질 젖산(Lactic Acid, LA)으로 반응성 시험을 수행한다. 4-NBB는 Ind-IL8LA*에 대해 양성 반응($\geq$ 1.4)을 LA는 Ind-IL8LA에 대해 음성 반응(< 1.4)을 나타내야 하며 그 세포만을 IL-8 루시퍼라아제 시험에 사용한다.

본 시험을 위해 THP-G8 세포는 배양 플라스크(T-75 등)에 $2\sim5\times10^5$ cells/mL 밀도로 분주(seeding)하고 48~96시간 동안 전배양(pre-culture)한다. 시험 당일에 채취한(harvest) 세포를 항생제가 함유되지 않은 10% FBS(Foetal Bovine Serum) 함유 RPMI-1640으로 세척하고 동일한 배지를 사용하여 1×10^6 cells/mL로 재현탁한 후 바닥이 평평한 검은 96-well 플레이트의 각 well에 50 µL(5×10^4 cells/well)씩 세포 현탁액을 분주한다.

4.2. 시험물질 및 대조물질의 조제

시험물질 및 대조물질은 시험 당일에 준비하며 시험물질을 X-VIVO™ 15에 최종 농도 20 mg/mL가 되도록 용해한다. 다른 용매를 사용할 경우 과학적 근거를 제시해야

* nIL8LA의 유도값(the induction of nIL8LA); 시험물질 처리 THP-G8 세포의 nIL8LA / 시험물질 미처리 세포의 nIL8LA

한다.

첫 번째 시험(run)은 세포독성 농도를 결정하고 물질의 피부감작 가능성(potential)을 확인하기 위하여 수행한다. 시험물질의 X-VIVO™ 15 저장 용액(stock solution)을 X-VIVO™ 15로 2배씩 연속 희석 하고 11개 농도(4 mg/mL부터 2배씩 연속 희석)의 시험물질 희석액(50 µL/well)을 바닥이 평평한 검은 96-well 플레이트에 담긴 50 µL의 세포 현탁액에 처리한다. 플레이트를 밀봉 및 교반한 후 37℃, 5% CO_2에서 16시간 동안 배양한다.

첫 번째 시험을 수행한 후, 두 번째, 세 번째, 네 번째 반복시험(replicate)에서 시험물질의 X-VIVO™ 15 저장 용액 농도는 첫 번째 시험의 CV05(Cell Viability 05: Inh-GAPLA*가 0.05 미만이 되는 최저 농도)보다 4배 높게 조제한다(4×CV05). 단, 첫 번째 시험에서 최고농도의 Inh-GAPLA가 0.05 이상인 경우, 시험물질의 X-VIVO™ 15 저장 용액은 첫 번째 시험의 최고 농도로 조제한다. 이후 시험물질의 X-VIVO™ 15 저장 용액을 1.5배씩 연속 희석 후 11개 농도(4XCV05부터 1.5배씩 연속 희석)의 시험물질 희석액(50 µL/well)을 각각 플레이트에 담긴 세포 현탁액에 처리한다. 플레이트를 밀봉 및 교반한 후 37℃, 5% CO_2에서 16시간 동안 배양한다.

양성대조물질은 X-VIVO™ 15로 4-NBB 20 mg/mL를 조제 한 후 원심분리하여 상층액(×1)을 X-VIVO™ 15로 4배 희석하고 희석된 상층액을 X-VIVO™ 15로 2배씩 연속 희석하여 3개 농도의 희석액(×1/4, ×1/8, ×1/16)을 준비한다. 음성대조물질은 X-VIVO™ 15로 LA 20 mg/mL를 조제한다. 조제된 LA 용액을 X-VIVO™ 15로 5배 희석(4 mg/mL) 한 후, 희석된 LA 용액을 X-VIVO™ 15로 2배씩 연속 희석하여 3개 농도의 희석액(1, 2, 4 mg/mL)을 준비한다. 준비된 4-NBB 및 LA의 각 3개 희석액과 용매대조군(X-VIVO™ 15)을 플레이트에 담긴 세포 현탁액에 처리한다. 플레이트를 밀봉 및 교반한 후 37℃, 5% CO_2에서 16시간 동안 배양한다.

4.3. 루시퍼라아제 활성 측정

루시퍼라아제의 발광은 광학 필터가 장착된 96-well 마이크로플레이트 발광측정장치(luminometer)를 사용하여 측정한다. Tripluc® Luciferase 분석 시약(Tripluc) 100 µL를 시험물질 처리 또는 미처리한 세포현탁액에 넣은 후 10분간 흔들어준다. 이를 발광측정장치에 넣고, 광학 필터를 장착하지 않은 상태(F0)와 장착한 상태(F1)에서 각 3초간 생체발광(Bioluminescence)을 측정한다.

측정된 값으로부터 각 농도에 대한 매개변수(parameter)를 구한다(예: IL8LA,

* GAPLA 억제(the inhibition of GAPLA); 시험물질 처리 THP-G8 세포의 GAPLA / 시험물질 미처리 세포의 GAPLA

GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA의 평균 ± 표준편차, GAPLA의 평균 ± 표준편차, nIL8LA의 평균 ± 표준편차, Ind-IL8LA의 평균 ± 표준편차, Inh-GAPLA의 평균 ± 표준편차 및 Ind-IL8LA의 95% 신뢰구간)(용어 설명은 표 1 참고).

표 1. IL-8 루시퍼라아제 시험법 매개변수(parameter) 용어 설명

약어	설명
GAPLA	GAPDH 프로모터 활성을 나타내는 SLR 루시퍼라아제 활성도
IL8LA	IL-8 프로모터 활성을 나타내는 SLO 루시퍼라아제 활성도
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	시험물질 처리 THP-G8 세포의 nIL8LA / 시험물질 미처리 세포의 nIL8LA
Inh-GAPLA	시험물질 처리 THP-G8 세포의 GAPLA / 시험물질 미처리 세포의 GAPLA

4.4. 데이터 평가

- 시험물질이 Ind-IL8LA ≥ 1.4 및 Ind-IL8LA의 95% 신뢰구간의 하한(lower limit) 값이 ≥ 1.0 인 경우 양성으로 판정한다.
- 시험물질이 Ind-IL8LA < 1.4 및/또는 Ind-IL8LA의 95% 신뢰구간의 하한 값이 < 1.0 인 경우 음성으로 판정한다.

4.5. 예측모델

첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 시험에서 두 번의 양성 결과를 나타내는 시험물질은 양성으로 판정하는 반면, 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 시험에서 세 번의 음성결과를 나타내는 시험물질은 음성 추정(supposed negative)으로 판정한다(표 2). 음성추정 물질 중 X-VIVO™ 15에 20 mg/mL 농도로 용해되는 물질은 음성으로 판정하나, 20 mg/mL로 용해되지 않는 물질은 음성결과를 고려하지 않는다(그림 1).

표 2. 양성 및 음성 추정 확인을 위한 기준

첫 번째 시험	두 번째 시험	세 번째 시험	네 번째 시험	최종 예측
양성	양성	-	-	양성
	음성	양성	-	양성
		음성	양성	양성
			음성	음성 추정
음성	양성	양성	-	양성
		음성	양성	양성
			음성	음성 추정
	음성	양성	양성	양성
			음성	음성 추정
		음성	-	음성 추정

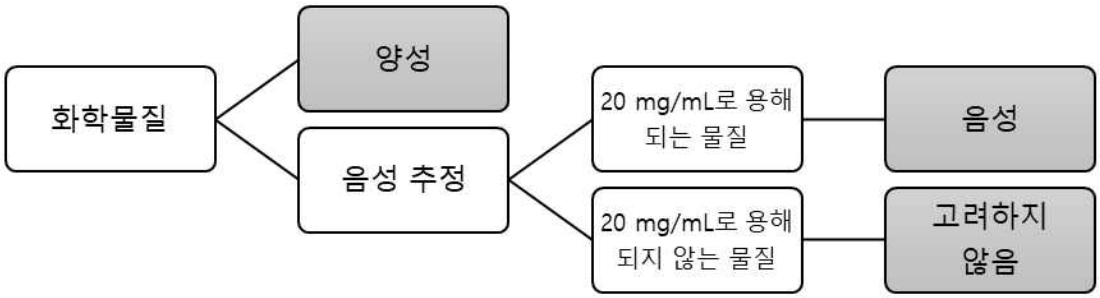


그림 1. 최종 판정을 위한 예측모델

V. 인정요건

IL-8 루시퍼라아제 시험법을 사용하는 경우 다음의 인정요건을 충족해야 한다.

- 각 시험마다 양성대조군(4-NBB)의 최소 한 개 농도에서 Ind-IL8LA는 5.0 초과이어야 한다.
- 각 시험마다 모든 농도의 음성 대조군(LA)에서 Ind-IL8LA는 1.4 미만이어야 한다.
- 시험물질 없이 세포와 Tripluc만 함유한 대조군 well의 GAPLA가 시험배지(50 µL/well의 10% FBS(Foetal Bovine Serum) 함유 RPMI-1640 및 50 µL/well의 X-VIVO^{TM} 15)만을 포함한 well의 GAPLA보다 5배 미만인 플레이트에서 얻은 데이터는 사용하지 않아야 한다.
- 시험물질 또는 대조물질 모든 농도의 Inh-GAPLA가 0.05 미만인 플레이트의 데이터는 사용하지 않아야 한다. 이러한 경우, 첫 번째 시험부터 다시 수행해야 하며 이전 시험의 최종 농도 중 가장 낮은 농도가 다시 수행되는 시험의 최종 농도 중 가장 높은 농도가 되도록 한다.

VI. 시험결과 및 보고

시험 보고서

시험 보고서는 시험의 수행과 관련된 다음의 정보를 포함해야 한다.

시험물질

단일성분 물질

- 화학물질 식별정보(IUPAC 혹은 CAS명칭, CAS번호, SMILES 혹은 InChI 코드, 구조식 및/혹은 기타 식별자 등)
- 물리적 성상, 물에 대한 용해성, 분자량 및 추가적인 물리화학적 특성(가능한 자세히)
- 순도, 불순물의 물질 정보(적절하고 가능한 경우)
- 시험 전 처리(예: 가온, 분쇄)(해당되는 경우)
- X-VIVO™ 15에서의 용해성. X-VIVO™ 15에서 불용성인 물질은 원심분리 후 물질의 침전 혹은 부유가 관찰되는지 여부
- 시험 농도
- 보관 조건 및 안정성(가능한 자세히)
- X-VIVO™ 15이 사용되지 않는 경우 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 타당성

다성분 물질, UCVB 및 혼합물

- 화학물질 정보(위의 내용 참고), 순도, 구성성분의 정량적 비율(quantitative occurrence) 및 관련된 물리화학적 특성(위의 내용 참조) 등 가능한 자세한 물질의 화학적 정보 규명
- 물리적 성상, 물에 대한 용해성, 및 관련된 물리화학적 특성(가능한 자세히)
- 조성이 알려진 혼합물/중합체의 분자량(또는 겉보기 분자량), 또는 시험 수행 관련 기타 정보
- 시험 전 처리(예: 가온, 분쇄)(해당되는 경우)
- X-VIVO™ 15에서의 용해성. X-VIVO™ 15에서 불용성인 물질은 원심분리 후 물질의 침전 혹은 부유가 관찰되는지 여부
- 시험 농도
- 보관 조건 및 안정성(가능한 자세히)
- X-VIVO™ 15이 사용되지 않는 경우 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 타당성

대조군

양성대조군

- 화학물질 식별정보(IUPAC 혹은 CAS명칭, CAS번호, SMILES 혹은 InChI 코드, 구조식 및/혹은 기타 식별자 등)
- 물리적 성상, 수용성, 분자량 및 추가적으로 관련된 물리화학적 특성(가능한 자세히)
- 순도, 불순물의 물질 정보(적절하고 가능한 경우)
- 시험 전 처리(예: 가온, 분쇄)(해당되는 경우)
- 시험 농도
- 보관 조건 및 안정성(가능한 자세히)
- 적용되는 경우, 적합한 수용기준을 입증하는 과거 양성 대조군 결과에 대한 참고 문헌

음성대조군

- 화학물질 식별정보(IUPAC 혹은 CAS명, CAS번호, SMILES 혹은 InChI 코드, 구조식 및/혹은 기타 식별자 등)
- 순도, 불순물의 물질 정보(적절하고 가능한 경우)
- 물리적 성상, 분자량 및 추가로 관련된 물리화학적 특성(본 시험가이드라인에 언급된 것과 다른 음성대조군을 사용한 경우, 가능한 자세히)
- 보관 조건 및 안정성(가능한 자세히)
- 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 타당성

시험법 조건

- 시험의뢰자, 시험시설 및 시험 담당자의 이름과 주소
- 시험법에 대한 설명
- 세포주, 보관조건 및 출처(예: 세포주 획득 시설)
- 로트 번호 및 FBS(Foetal Bovine Serum)의 출처, 공급자 명, 96-well flat-bottom black plate의 로트번호, 및 Tripluc 시약의 로트번호
- 계대번호 및 시험에 사용된 세포밀도
- 시험전 세포 분주에 사용된 세포 카운팅 방법 및 동질 세포 수 분배를 위해 사용된 방법
- 사용된 발광측정장치(예: 모델명), 기기 설정, 사용된 루시퍼라아제 기질 및 부록 II에 기술된 control test를 기반으로 하는 적합한 발광 측정 입증 등
- 실험실의 시험법 수행에 대한 숙련도 입증에 사용된 절차(예: 숙련도 물질 시험 등) 혹은 시간 경과에 따른 시험법의 재현성을 입증하는데 사용된 절차

시험절차

- 반복시료 및 수행된 시험의 수
- 시험물질 농도, 적용 절차 및 노출 시간(권장 시간과 다른 경우)
- 평가 및 결정 기준에 대한 설명
- 시험 인정요건에 대한 설명
- 시험절차의 모든 변경사항에 대한 설명

결과

- IL8LA 및 GAPLA의 측정값
- nIL8LA, Ind-IL8LA, 및 Inh-GAPLA에 대한 계산값
- Ind-IL8LA의 95% 신뢰구간
- 루시퍼라아제 활성 유도와 세포생존율에 대한 용량-반응 곡선을 보여주는 그래프
- 기타 관련된 관찰사항에 대한 설명(해당되는 경우)

결과 고찰

- IL-8 루시퍼라아제 시험 결과의 논의
- 피부감작성 통합독성평가(IATA)의 맥락에서 시험 결과 고찰

결론

별첨 1. 번역본(OECD TG 442E 부속서 III)

생체외 피부감작성: IL-8 루시퍼라아제 시험법
In Vitro Skin Sensitisation: IL-8 Luc assay

시험 전 고려사항 및 제한점

1. IL-8 루시퍼라아제 시험법(IL-8-Luc assay)은 세포 표면 표지자(cell surface markers)의 발현을 분석하는 시험법들과 달리 수지상 세포(Dendritic Cells, DC)의 활성화와 관련된 사이토카인(cytokine) IL-8 발현의 변화를 정량화 한다[1]. THP-1 유래 IL-8 리포터 세포주(THP-G8, 인체 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1로부터 확립)에 감작성 물질을 처리한 후 IL-8 발현을 측정한다[1]. 루시퍼라아제의 발현은 피부감작성 물질과 비감작성 물질을 구별하는데 사용된다.

2. IL-8 루시퍼라아제 시험법은 일본 동물대체시험법검증센터(Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods, JaCVAM), 경제산업성(Ministry of Economy, Trade and Industry, METI) 및 일본대체법학회(Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments, JSAAE)에 의해 수행된 검증연구[2]를 통해 평가되었고, 동물대체시험법국제협력(International Cooperation on Alternative Test Methods, ICATM)의 지원과 함께 일본 동물대체시험법검증센터와 일본 후생노동성(Ministry of Health, Labour and Welfare, MHLW)의 후원 하에 독립적인 전문 평가(peer review)[3]가 이루어졌다. 규제 기관과 이해 당사자들의 의견과 수집된 모든 자료를 근거할 때 IL-8 루시퍼라아제 시험법은 화학물질의 유해성 분류와 표시를 목적으로 비감작성 물질로부터 피부감작성 물질을 구별하기 위한 통합독성평가(Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA)의 일부로서 유용한 것으로 간주 된다. IL-8 루시퍼라아제 시험 데이터를 다른 시험 결과들과 조합하여 사용한 예시가 문헌으로 보고되어 있다[4][5][6].

3. IL-8 루시퍼라아제 시험법은 세포배양과 루시퍼라아제 측정 경험이 있는 실험실에 전수가 가능한 것으로 입증되었다. 실험실 내 재현성과 실험실 간 재현성은 각각 87.7%와 87.5% 였다[2]. 검증연구[2] 및 발표 논문[1][6]의 데이터에 따르면 본 시험법은 LLNA와 비교 시 143개 물질 중 118개 물질은 양성 및 음성으로 판정하였고, 25개 물질에 대해서는 예측하지 못하였으며(inconclusive) 비감작성 물질(UN GHS No Cat.)로부터 피부감작성

물질(UN GHS Cat. 1)을 구별했을 때 정확도 86%(101/118), 민감도 96%(92/96), 특이도 41%(9/22)으로 나타났다. 아래(5항)에 기술된 적용범위를 벗어나는 물질(7개 물질)을 제외하면, IL-8 루시퍼라아제 시험법은 136개 물질 중 113개 물질을 양성 및 음성으로 판정하였고 23개 물질을 예측하지 못하여 정확도 89%(101/113), 민감도 96%(92/96), 특이도 53%(9/17)를 나타낸다. Urbisch *et al.*[7]의 인체 데이터를 인용하면 IL-8 루시퍼라아제 시험법은 90개 물질 중 76개 물질을 양성 및 음성으로 판정하였고 14개 물질을 예측하지 못하여 정확도 80%(61/76), 민감도 93%(54/58), 특이도 39%(7/18)를 나타낸다. 적용범위 밖에 물질을 제외하면(6개 물질) 본 시험법은 84개 물질 중 71개 물질을 양성 및 음성으로 판정하였고, 13개 물질을 예측하지 못하여, 정확도 86%(61/71), 민감도 93%(54/58), 특이도 54%(7/13)를 나타낸다. 본 시험법에서 위음성 예측은 피부감작능이 높은 수준을 나타내는 화학물질(UN GHS subcategory 1A) 보다 피부감작능(skin sensitisation potency)이 낮거나 중간 수준을 나타내는 화학물질(UN GHS subcategory 1B)에서 발생할 가능성이 높다[6]. 종합해 볼 때, 이러한 시험 결과는 피부감작성 물질의 유해성 확인을 위한 IL-8 루시퍼라아제 시험법의 기능을 지원한다. IL-8 루시퍼라아제 시험법은 통합독성평가(IATA)의 맥락과 OECD TG 442E의 총론(General introduction) 내 7항 및 8항의 규정(provision)에 따라 다른 시험 결과 출처와 조합하여 고려되어야 하기 때문에 단독 시험법으로서 본 시험법의 정확도는 단지 참고 지침(guidance)일 뿐이다. 나아가, 피부감작성을 비(非)동물 피부감작성 시험법으로 평가하는 경우, LLNA 및 기타 동물실험도 인체의 상황을 완전히 반영하지 못할 수 있다는 점을 기억해야 한다.

4. 현재 이용 가능한 데이터를 근거할 때, IL-8 루시퍼라아제 시험법은 다양한 유기작용기(organic functional group), 반응 메커니즘(reaction mechanism), 피부 감작 정도(생체내(*in vivo*) 연구에 의해 판정) 및 물리화학적 특성을 아우르는 시험물질에 적용 가능한 것으로 나타났다[2][6].

5. IL-8 루시퍼라아제 시험법은 X-VIVO™ 15를 용매로 사용하지만, Log $K_{o/w}$ 3.5를 초과하는 화학물질과 EPI Suite™*에서 예측된 약 100 µg/mL 정도의 물에 대한 용해도를 갖는 화학물질을 정확하게 평가하였으며, 물에 대한 용해도가 낮은 감작성 물질을 감지하는 능력은 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 용매로 사용하는 IL-8 루시퍼라아제 시험법보다 우수하다[2]. 하지만 20 mg/mL로 용해되지 않는 시험물질의 음성 결과는 X-VIVO™ 15 용매에 용해되지 않기 때문에 위음성 결과를 나타낼 수 있다. 따라서 이러한 시험물질의 음성 결과는 고려하지 않는다. 검증연구에서는 무수화합물(anhydride)의 위음성율이 높게 나타났다. 또한 세포주의 낮은 대사능력[8]과 실험 여건으로 인해

* 미국 환경보호청(Environmental Protection Agency, EPA)과 Syracuse Research Corporation(SIC)이 개발한 물리화학적 특성과 환경학적 경로를 예측하는 윈도우 기반 프로그램

pro-hapten(대사활성을 필요로 하는 물질)과 pre-hapten(공기 산화에 의해 활성화된 물질)은 음성 결과를 나타낼 수 있다. 비록 pre/pro-hapten으로 간주되는 물질의 음성 결과의 해석에는 주의가 필요하지만, IL-8 루시퍼라아제 시험 데이터세트에서 11개의 pre-hapten 과 6개의 pro-hapten 모두를 정확히 예측하였으며 8개의 pre/pro-hapten 중 6개를 정확하게 예측하였다[2]. Pre-hapten과 pro-hapten를 감지해내는 3가지 비동물 시험법(DPRA, KeratinoSens™, 및 h-CLAT)에 대한 최근의 종합적인 검토와 IL-8 루시퍼라아제 시험법에 사용되는 THP-G8 세포가 h-CLAT에 사용된 THP-1 유래 세포주라는 사실에 근거할 때, IL-8 루시퍼라아제 시험법은 다른 시험법과 조합 시 비동물 시험법의 pre/pro-hapten 감지에 대한 민감도의 향상에 기여할 수 있다. 현재까지 시험된 계면활성제는 종류(예: 양이온성, 음이온성 혹은 비이온성)에 상관없이 (위)양성 결과를 나타냈다. 또한 루시퍼라아제를 간섭하는 물질은 발광(luminescence)을 명백하게 억제시키거나 증가시켜 루시퍼라아제 활성/측정을 방해할 수 있다[10]. 예를 들어, 1 μM 이상의 식물성 에스트로겐(phytoestrogen) 농도는 다른 루시퍼라아제 기반 리포터 유전자 시험법에서 루시퍼라아제 리포터 유전자의 과활성화(over-activation)에 의해 루시퍼라아제의 발광 시그널을 간섭하는 것으로 보고되었다. 결론적으로 높은 농도의 식물성 에스트로겐 또는 루시퍼라아제 리포터 유전자에 식물성 에스트로겐과 같은 활성을 나타내는 것으로 추정되는 혼합물(compounds)에서 얻은 루시퍼라아제 발현 결과는 주의 깊게 검토해야 한다[11]. 위의 내용에 근거할 때, 계면활성제, 무수화합물 및 루시퍼라아제 간섭 물질은 본 시험법의 적용범위 밖에 있다. 다른 특정 범주의 시험물질에 대해 본 시험법을 적용할 수 없다는 근거가 있는 경우, 본 시험법을 그 시험물질에 사용해서는 안 된다.

6. 위에 설명한 바와 같이 IL-8 루시퍼라아제 시험법은 비감작성 물질로부터 피부감작성 물질을 구별하는 것을 지원한다. 다른 실험 결과와 조합하여 고려할 때 IL-8 루시퍼라아제 시험 결과가 감작능(potency) 평가에 기여할 수 있는지를 결정하기 위해서는 추가 연구(인체 데이터 기반 연구 선호)가 요구된다.

7. 용어정의는 부록 I에 제공된다.

시험 원리

8. IL-8 루시퍼라아제 시험법은 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 얻은 인체 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1를 이용한다. 일본 도호쿠 의과대학 피부과(Tohoku University School of Medicine, Dept. of Dermatology)에서 이 세포주를 이용하여 IL-8과 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase, GAPDH) 프로모터에 각각 조절을 받는 안정적 루시퍼라아제 오렌지(Stable Luciferase Orange, SLO)와 안정적 루시퍼라아제 레드(Stable Luciferase Red, SLR)가 도입된 THP-1 유래 IL-8 리포터 세포주인 THP-G8 세포를 확립하였다[1]. 이는 감작성 물질에 노출된 후 IL-8 및 GAPDH의 활성 지표로서 잘 확립된 발광 루시퍼라아제 기질로부터 발광을 감지하여 루시퍼라아제 유전자 발현(induction)의 정량적 측정을 가능하게 한다.

9. 이중색(dual-color) 분석 시스템은 IL-8 프로모터(promoter)의 유전자 발현에 대한 주황색 발광 루시퍼라아제(SLO; λmax = 580 nm)[12]와 내부 대조 프로모터(internal control promoter)인 GAPDH의 유전자 발현을 나타내는 적색 발광 루시퍼라아제(SLR; λmax = 630 nm)[13]로 구성된다. 이 두 개의 루시퍼라아제는 반딧불이(firefly) D-루시페린(D-luciferin)과 반응하여 서로 다른 색을 발광하며, 이러한 발광은 광학 필터를 이용하여 두 가지 루시퍼라아제로부터 발광량(emission)을 나누어서 한 실험(one-step reaction)에서 동시에 측정된다[14](부록 II).

10. THP-G8 세포에 시험물질을 16시간 처리한 후 IL-8 프로모터 활성 및 GAPDH 프로모터 활성을 각기 반영하는 SLO 루시퍼라아제 활성(SLO-LA) 및 SLR 루시퍼라아제 활성(SLR-LA)을 측정한다. 약어의 이해를 돕기 위해 SLO-LA 및 SLR-LA는 각각 IL8LA 및 GAPLA로 나타낸다. 표 1은 IL-8 루시퍼라아제 시험법의 루시퍼라아제 활성과 관련된 용어를 설명한다. 측정된 값은 다음을 계산하는데 사용되며 세포독성의 지표로 쓰인다; i) 보정된 IL8LA(the normalised IL8LA: nIL8LA), 즉 GAPLA 대비 IL8LA의 비율(the ratio of IL8LA to GAPLA), ii) nIL8LA의 유도값(the induction of nIL8LA: Ind-IL8LA), 즉 시험물질 미처리 THP-G8 세포에서 4개 측정값의 nIL8LA 산술 평균에 대한 시험물질 처리 THP-G8 세포에서 4개 측정값의 nIL8LA 산술 평균 비율(the ratio of the arithmetic means of quadruple-measured values of the nIL8LA of THP-G8 cells treated with a test chemical and the values of the nIL8LA of untreated THP-G8 cells), iii) GAPLA 억제(the inhibition of GAPLA: Inh-GAPLA), 즉 시험물질 미처리 THP-G8 세포에서 4개 측정값의 GAPLA 산술 평균에 대한 시험물질 처리 THP-G8 세포에서 4개 측정값의 GAPLA 산술 평균 비율(the ratio of the arithmetic means of quadruple-measured values of the GAPLA of THP-G8 cells treated with a test chemical and the values of the GAPLA of untreated THP-G8 cells)

표 1. IL-8 루시퍼라아제 시험법의 루시퍼라아제 활성과 관련된 용어 설명

약어	설명
GAPLA	GAPDH 프로모터 활성을 나타내는 SLR 루시퍼라아제 활성도
IL8LA	IL-8 프로모터 활성을 나타내는 SLO 루시퍼라아제 활성도
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	시험물질 처리 THP-G8 세포의 nIL8LA / 시험물질 미처리 세포의 nIL8LA
Inh-GAPLA	시험물질 처리 THP-G8 세포의 GAPLA / 시험물질 미처리 세포의 GAPLA
CV05	Inh-GAPLA가 0.05 미만(<)이 되는 시험물질의 최저 농도

11. 유사시험평가기준(Performance standard, PS)은 IL-8 루시퍼라아제 시험법과 유사하게 변경된 생체외(*in vitro*) IL-8 루시퍼라아제 시험법의 검증을 용이하게 하고 시험법 추가를 위한 본 시험 가이드라인의 적시 개정(timely amendment)을 가능하게 한다. 데이터 상호인정(Mutual Acceptance of Data, MAD)은 PS에 따라 검증이 이루어지고 OECD에 의해 검토되어 시험 가이드라인에 포함된 시험법에 대해서만 보장된다.

숙련도 확인

12. 실험실은 본 시험 가이드라인 442E의 부속서에 기술된 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 생체외 우수 시험법(Good in vitro Method Practice)[17]을 준수하여 부록 III의 9개 숙련도물질을 가지고 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 아울러 시험 수행자는 반응성 시험(15항 참조), 양성 및 용매/부형제 대조군(21~24항 참조)으로 생성된 데이터의 과거 데이터베이스(historical database)를 보존해야 하며, 이러한 데이터는 오랜 기간에 걸쳐 실험실 내 재현성이 유지되고 있음을 확인하기 위해 사용한다.

시험 절차

13. IL-8 루시퍼라아제 시험법에 대한 표준작업지침서(Standard Operating Procedure, SOP)가 이용 가능하며 시험 수행 시 활용한다[18]. 시험을 수행하고자 하는 실험실은 OECD 탬플릿(OECD template)의 조건에 따라 물질 이전 계약서(Material Transfer Agreement, MTA)에 서명하고 GPC Lab. Co. Ltd.(Tottori, Japan)로부터 재조합(recombinant) THP-G8 세포주를 구매할 수 있다. 다음은 시험법의 주요 구성 요소와 절차에 대해 설명한다.

세포 준비

14. GPC Lab. Co. Ltd.(Tottori, Japan)에서 얻은 THP-G8 세포주를 IL-8 루시퍼라아제 시험법에 사용한다(8항 및 13항 참조). 세포를 수령하면 계대배양(2~4 계대)하고 균일한 stock으로 냉동 보관한다. 이 stock의 세포는 최대 12 계대(passage) 또는 최대 6주까지 배양할 수 있다. 세포 증식에 사용되는 배지는 10% FBS(Foetal Bovine Serum), 항생제/항진균제(antibiotic/antimycotic) 용액(100 U/mL 페니실린 G, 100 µg/mL 스트렙토마이신 및 0.25 µg/mL 암포테리신 B를 함유한 0.85% 생리식염수)(GIBCO Cat#15240-062), 0.15 µg/mL 퓨로마이신(CAS:58-58-2) 및 300 µg/mL G418(CAS:108321-42-2)을 함유한 RPMI-1640 배양 배지이다.

15. 세포를 시험에 사용하기 전, 세포 반응성 시험을 수행하여 세포의 적격 여부를 확인한다. 반응성 시험은 세포를 해동하고 1~2주 또는 2~4 계대 배양한 후에 수행하며 양성대조물질 4-nitrobenzyl bromide(4-NBB)(CAS:100-11-8, ≥ 99% 순도)와 음성대조물질 젖산(Lactic Acid, LA)(CAS:50-21-5, ≥ 85% 순도)을 사용한다. 4-NBB는 Ind-IL8LA에 대한 양성 반응(≥ 1.4)을 나타내야 하며, LA는 Ind-IL8LA에 대해 음성 반응(< 1.4)을 나타내야 한다. 반응성 시험을 통과한 세포만이 시험에 사용된다. 반응성 시험은 22~24항에 기술된 절차에 따라 수행해야 한다.

16. 시험을 위해 THP-G8 세포는 $2\sim5\times10^5$ cells/mL 밀도로 분주(seeding)하고 배양 플라스크(T-75 등)에서 48~96시간 동안 전배양(pre-culture)한다. 시험 당일에 배양 플라스크에서 채취한(harvest) 세포를 항생제가 함유되지 않은 10% FBS(Foetal Bovine Serum) 포함 RPMI-1640으로 세척한 다음 동일한 배지를 이용하여 1×10^6 cells/mL로 재현탁한다. 이후 바닥이 평평한 검은 96-well 플레이트(예: Costar Cat#3603)에 세포현탁액을 50 µL(5×10^4 cells/well)씩 분주한다.

시험물질 및 대조물질의 조제

17. 시험물질 및 대조물질은 시험 당일에 준비한다. IL-8 루시퍼라아제 시험법의 경우 시험물질을 X-VIVO™ 15(상업적으로 구매 가능한 무혈청 배지(Lonza, 04-418Q))에 최종 농도 20 mg/mL가 되도록 용해한다. 소형원심분리기 튜브에 담긴 시험물질 20 mg(물질의 용해도와 무관)에 X-VIVO™ 15 용매 1ml을 넣고 격렬하게 볼텍스(vortex) 한후 약 20℃의 실온에서 최대 8 rpm의 속도로 30분간 로터(rotor) 위에서 섞는다. 고체물질이 여전히

용해되지 않는 경우 물질이 완전히 용해되거나 안정적으로 분산될 때까지 튜브에 초음파를 가한다. X-VIVO™ 15에 용해되는 시험물질의 경우, X-VIVO™ 15를 사용하여 용액(20 mg/mL)을 5배 희석하고 이를 시험물질의 X-VIVO™ 15 저장 용액(stock solution)으로 사용한다(4 mg/mL). X-VIVO™ 15에 용해되지 않는 시험물질의 경우, 약 20℃의 실온에서 최대 8 rpm의 속도로 30분간 로터(rotor) 위에서 최소 30분간 다시 섞은 후 15,000 rpm(≈20,000 *g*)에서 5분간 원심분리하고 분리된 상층액을 시험물질의 X-VIVO™ 15 저장 용액으로 사용한다. DMSO, 물 또는 배양배지 등 기타 용매를 사용하는 경우 과학적 근거가 제시되어야 한다. 시험물질 용해에 대한 자세한 절차는 부록 V(Appendix V)에 나와 있다. 18~23항에 기술된 X-VIVO™ 15 용액은 바닥이 평평한 검은 96-well 플레이트에 준비된 세포현탁액(16항 참조)과 1:1(v/v)의 비율로 혼합한다.

18. 첫 번째 시험(run)의 목적은 세포독성 농도를 결정하고 물질의 피부감작성에 대한 가능성(potential)을 확인하는 것이다. X-VIVO™ 15를 사용하여 96-well assay block(예: Costar Cat#EW-01729-03)에서 시험물질의 X-VIVO™ 15 저장 용액을 2배 연속 희석하여 조제한다(부록 V 참조). 다음으로 시험물질 희석액(50 µL/well)을 바닥이 평평한 검은 96-well 플레이트에 담겨있는 50 µL의 세포 현탁액에 넣는다. 이에 따라 X-VIVO™ 15에 용해되는 시험물질의 최종 농도 범위는 0.002~2 mg/mL가 된다(부록 V). X-VIVO™ 15에 20 mg/mL로 용해되지 않는 시험물질의 경우 시험물질의 실제 최종 농도가 불확실하고 X-VIVO™ 15 저장 용액에서 시험물질의 포화농도에 따라 달라지지만 $2\sim2^{10}$ 범위의 희석배수로 결정한다.

19. 이어지는 시험들(예, 두 번째, 세 번째, 네 번째 반복시험(replicate))에서 X-VIVO™ 15 저장 용액은 첫 번째 시험의 CV05(Cell Viability 05: Inh-GAPLA가 0.05 미만이 되는 최저 농도)보다 4배 높게 조제한다. 첫 번째 시험의 최고농도에서 Inh-GAPLA이 0.05 미만으로 감소하지 않는 경우, X-VIVO™ 15 저장 용액은 첫 번째 시험의 최고농도로 조제한다. CV05의 농도는 첫 번째 시험에서의 저장용액의 농도를 CV05의 희석배수(X)(dilution factor CV05(X): 저장 용액을 CV05로 희석하는데 필요한 희석배수)로 나누어 계산한다(부록 V 참조). X-VIVO™ 15에 20 mg/mL로 용해되지 않는 시험물질의 경우 CV05는 저장 용액 농도 × 1/X로 결정한다. 두 번째에서 네 번째 시험(run 2 to 4)에서의 두 번째 저장 용액(a second stock solution)은 4 × CV05가 되도록 조제한다(부록 V 참조).

20. X-VIVO™ 15 두 번째 저장 용액의 연속 희석액은 96-well assay block을 사용하여 1.5배씩 연속 희석하여 조제한다. 다음으로 시험물질 희석액(50 µL/well)을 바닥이 평평한

검은 96-well 플레이트에 담겨있는 50 μL의 세포 현탁액에 넣는다. 각 시험물질의 농도 당 4개의 well을 사용하여 시험한다. 그 후 교반기를 이용하여 시험물질과 세포현탁액을 섞어 주고 37℃, 5% CO_2에서 16시간 동안 배양한 후 아래에 기술된 방법으로 루시퍼라아제 활성을 측정한다.

21. 용매대조군은 X-VIVO™ 15(50 μL/well)과 세포 현탁액(50 μL/well, 10% FBS(Foetal Bovine Serum) 함유 RPMI-1640)의 혼합물이다.

22. 권장되는 양성대조물질은 4-NBB이다. 4-NBB 20 mg를 1.5-mL 소형원심분리기 튜브에 준비하고 여기에 X-VIVO™ 15를 넣어 1 mL이 되도록 한다. 튜브를 격렬하게 섞고 로터 위에서 최대 8 rpm의 속도로 최소 30분간 용해한다. 20,000 *g*에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 X-VIVO™ 15로 4배 희석하고, 희석된 상층액 500 μL를 96-well assay block의 well에 넣는다. 희석된 상층액은 X-VIVO™ 15를 사용하여 추가로 2배와 4배 희석하며, 각 용액 50 μL를 바닥이 평평한 검은 96-well 플레이트에 담긴 THP-G8 세포 현탁액 50 μL에 넣는다(부록 VI 참조). 양성대조군의 각 농도는 4개의 well에서 시험한다. 교반기로 플레이트를 흔들어주고 16시간 동안 CO_2 배양기(37°C, 5% CO_2)에 배양한 다음, 29항에 기술된 방법으로 루시퍼라아제 활성을 측정한다.

23. 권장되는 음성대조물질은 LA이다. LA 20 mg를 1.5-mL 소형원심분리기 튜브에 준비하고 여기에 X-VIVO™ 15를 넣어 1 mL(20 mg/mL)이 되도록 한다. 20 mg/mL의 LA 용액을 X-VIVO™ 15로 5배 희석한다(4 mg/mL). 4 mg/mL의 LA 용액 500 μL를 96-well assay block의 well에 넣는다. 이 용액을 X-VIVO™ 15로 2배 희석한 다음 다시 2배 희석하여 2 mg/mL 용액과 1 mg/mL 용액을 만든다. 이 3개의 용액들과 용매대조군(X-VIVO™ 15) 50 μL를 바닥이 평평한 검은 96-well 플레이트 각 well에 담겨있는 THP-G8 세포 현탁액 50 μL에 넣는다. 음성대조군의 각 농도는 4개의 well에서 시험한다. 교반기로 플레이트를 흔들어 주고 16시간 동안 CO_2 배양기(37°C, 5% CO_2)에 배양한 다음, 29항에 기술된 방법으로 루시퍼라아제 활성을 측정한다.

24. 유사 시험 인정요건(run acceptable criteria)을 도출하는 과거 데이터(historical data)가 있는 경우, 다른 적절한 양성대조군 또는 음성대조군을 사용할 수 있다.

25. 휘발성 시험물질의 증발과 시험물질로 인한 well 간의 교차오염을 피하기 위해

주의가 필요하다(예: 시험물질과 배양하기 전 플레이트의 밀봉).

26. 시험물질과 용매대조군에 대한 음성 또는 양성 예측을 얻기 위해 두 번에서 네 번의 시험이 필요하다(표 2 참조). 각 시험은 시험물질의 새로운 X-VIVO™ 15 저장 용액을 사용하여 다른 날에 수행하며 각각 따로 세포를 채취한다. 세포는 동일한 계대에서 채취할 수 있다.

루시퍼라아제 활성 측정

27. 발광(luminescence)은 광학 필터(예: Phelios(ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941(Berthold, Bad Wildbad, Germany) 및 ARVO 시리즈(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)가 장착된 96-well 마이크로플레이트 발광측정장치(luminometer)를 사용하여 측정한다. 발광측정장치는 재현성을 위해 매 시험마다 교정되어야 한다[19]. 이러한 교정(calibration)에는 주황색 및 적색 발광의 재조합 루시퍼라아제가 이용 가능하다.

28. 사전에 가온한 Tripluc® Luciferase 분석 시약(Tripluc) 100 µL를 시험물질을 처리한 또는 미처리한 세포 현탁액이 담긴 플레이트의 각 well에 넣은 다음 플레이트를 약 20℃의 실온에서 10분간 흔들어 준다. 루시퍼라아제 활성을 측정하기 위해 플레이트를 발광측정장치에 넣는다. 광학 필터를 장착하지 않은 상태(F0)와 장착한 상태(F1)에서 각 3초간 생체발광(Bioluminescence)을 측정한다. 다른 설정(예: 사용된 발광측정장치에 따라)이 사용되는 경우 타당성이 제시되어야 한다.

29. 측정된 값으로부터 각 농도에 대한 매개변수(parameter)를 구한다(예: IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, IL8LA의 평균 ± 표준편차, GAPLA의 평균 ± 표준편차, nIL8L의 평균 ± 표준편차, Ind-IL8LA의 평균 ± 표준편차, Inh-GAPLA의 평균 ± 표준편차 및 Ind-IL8LA의 95% 신뢰구간). 각 매개변수의 정의는 부록 I와 IV에 나와 있다.

30. 다색(multi-colour) 리포터 시험(assay)에서 색 구별(color discrimination)은 일반적으로 sharp-cut(long-pass 또는 short-pass) 필터 또는 band-pass 필터와 같은 광학 필터와 함께 장착된 검출기(detector)(발광측정장치 및 플레이트 판독기)를 사용하여 이루어진다. 각 생체발광 신호 색(bioluminescence signal colour)에 대한 필터의 투과계수(transmission coefficient)는 부록 II에 따라 시험 전에 교정되어야 한다.

시험자료 및 보고

데이터 평가

31. 각 시험에서 양성/음성 결정을 위한 기준은 다음과 같다.

- IL-8 루시퍼라아제 시험 예측은 시험물질이 Ind-IL8LA ≥ 1.4 및 Ind-IL8LA의 95% 신뢰구간의 하한(lower limit) 값이 ≥ 1.0 인 경우 양성으로 판정한다.
- IL-8 루시퍼라아제 시험 예측은 시험물질이 Ind-IL8LA < 1.4 및/또는 Ind-IL8LA의 95% 신뢰구간의 하한 값이 < 1.0 인 경우 음성으로 판정한다.

예측모델

32. 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 시험에서 두 번의 양성 결과를 나타내는 시험물질은 양성으로 판정하는 반면, 첫 번째, 두 번째, 세 번째 또는 네 번째 시험에서 세번의 음성 결과를 나타내는 시험물질은 음성 추정(supposed negative)으로 판정한다(표 2). 음성추정 물질 중 20 mg/mL X-VIVO™ 15에 용해되는 물질은 음성으로 판정되는 반면, 20 mg/mL X-VIVO™ 15에 용해되지 않은 물질은 고려하지 않는다(그림 1).

표 2. 양성 및 음성 추정 확인을 위한 기준

첫 번째 시험	두 번째 시험	세 번째 시험	네 번째 시험	최종 예측
양성	양성	-	-	양성
	음성	양성	-	양성
		음성	양성	양성
			음성	음성 추정
음성	양성	양성	-	양성
		음성	양성	양성
			음성	음성 추정
	음성	양성	양성	양성
			음성	음성 추정
		음성	-	음성 추정

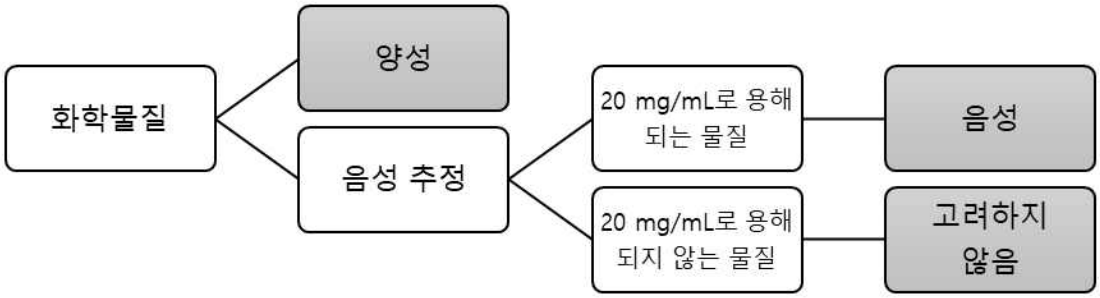


그림 1. 최종 판정을 위한 예측모델

인정요건

33. IL-8 루시퍼라아제 시험법을 사용하는 경우 다음의 인정요건을 충족해야 한다.

- 각 시험마다 양성대조군(4-NBB)의 최소 한 개 농도에서 Ind-IL8LA는 5.0 초과이어야 한다.
- 각 시험마다 모든 농도의 음성 대조군(LA)에서 Ind-IL8LA는 1.4 미만이어야 한다.
- 시험물질 없이 세포와 Tripluc만 함유한 대조군 well의 GAPLA가 시험배지(50 µL/well의 10% FBS(Foetal Bovine Serum) 함유 RPMI-1640 및 50 µL/well의 X-VIVO™ 15)만을 포함한 well의 GAPLA보다 5배 미만인 플레이트에서 얻은 데이터는 사용하지 않아야 한다.
- 시험물질 또는 대조물질 모든 농도의 Inh-GAPLA가 0.05 미만인 플레이트의 데이터는 사용하지 않아야 한다. 이러한 경우, 첫 번째 시험부터 다시 수행해야 하며 이전 시험의 최종 농도 중 가장 낮은 농도가 다시 수행되는 시험의 최종 농도 중 가장 높은 농도가 되도록 한다.

시험 보고서

59. 시험 보고서는 시험의 수행과 관련된 다음의 정보를 포함해야 한다.

시험물질

단일성분 물질

- 화학물질 식별정보(IUPAC 혹은 CAS명칭, CAS번호, SMILES 혹은 InChI 코드, 구조식 및/혹은 기타 식별자 등)
- 물리적 성상, 물에 대한 용해성, 분자량 및 추가적인 물리화학적 특성(가능한 자세히)
- 순도, 불순물의 물질 정보(적절하고 가능한 경우)

- 시험 전 처리(예: 가온, 분쇄)(해당되는 경우)
- X-VIVO™ 15에서의 용해성. X-VIVO™ 15에서 불용성인 물질은 원심분리 후 물질의 침전 혹은 부유가 관찰되는지 여부
- 시험 농도
- 보관 조건 및 안정성(가능한 자세히)
- X-VIVO™ 15이 사용되지 않는 경우 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 타당성

다성분 물질, UCVB 및 혼합물

- 화학물질 정보(위의 내용 참고), 순도, 구성성분의 정량적 비율(quantitative occurrence) 및 관련된 물리화학적 특성(위의 내용 참조) 등 가능한 자세한 물질의 화학적 정보 규명
- 물리적 성상, 물에 대한 용해성, 및 관련된 물리화학적 특성(가능한 자세히)
- 조성이 알려진 혼합물/중합체의 분자량(또는 겉보기 분자량), 또는 시험 수행 관련 기타 정보
- 시험 전 처리(예: 가온, 분쇄)(해당되는 경우)
- X-VIVO™ 15에서의 용해성. X-VIVO™ 15에서 불용성인 물질은 원심분리 후 물질의 침전 혹은 부유가 관찰되는지 여부
- 시험 농도
- 보관 조건 및 안정성(가능한 자세히)
- X-VIVO™ 15이 사용되지 않는 경우 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 타당성

대조군

양성대조군

- 화학물질 식별정보(IUPAC 혹은 CAS명칭, CAS번호, SMILES 혹은 InChI 코드, 구조식 및/혹은 기타 식별자 등)
- 물리적 성상, 수용성, 분자량 및 추가적으로 관련된 물리화학적 특성(가능한 자세히)
- 순도, 불순물의 물질 정보(적절하고 가능한 경우)
- 시험 전 처리(예: 가온, 분쇄)(해당되는 경우)
- 시험 농도
- 보관 조건 및 안정성(가능한 자세히)
- 적용되는 경우, 적합한 수용기준을 입증하는 과거 양성 대조군 결과에 대한 참고 문헌

음성대조군

- 화학물질 식별정보(IUPAC 혹은 CAS명, CAS번호, SMILES 혹은 InChI 코드, 구조식

및/혹은 기타 식별자 등)
- 순도, 불순물의 물질 정보(적절하고 가능한 경우)
- 물리적 성상, 분자량 및 추가로 관련된 물리화학적 특성(본 시험가이드라인에 언급된 것과 다른 음성대조군을 사용한 경우, 가능한 자세히)
- 보관 조건 및 안정성(가능한 자세히)
- 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택의 타당성

시험법 조건

- 시험의뢰자, 시험시설 및 시험 담당자의 이름과 주소
- 시험법에 대한 설명
- 세포주, 보관조건 및 출처(예: 세포주 획득 시설)
- 로트 번호 및 FBS(Foetal Bovine Serum)의 출처, 공급자 명, 96-well flat-bottom black plate의 로트번호, 및 Tripluc 시약의 로트번호
- 계대번호 및 시험에 사용된 세포밀도
- 시험전 세포 분주에 사용된 세포 카운팅 방법 및 동질 세포 수 분배를 위해 사용된 방법
- 사용된 발광측정장치(예: 모델명), 기기 설정, 사용된 루시퍼라아제 기질 및 부록 II에 기술된 control test를 기반으로 하는 적합한 발광 측정 입증 등
- 실험실의 시험법 수행에 대한 숙련도 입증에 사용된 절차(예: 숙련도 물질 시험 등) 혹은 시간 경과에 따른 시험법의 재현성을 입증하는데 사용된 절차

시험절차

- 반복시료 및 수행된 시험의 수
- 시험물질 농도, 적용 절차 및 노출 시간(권장 시간과 다른 경우)
- 평가 및 결정 기준에 대한 설명
- 시험 인정요건에 대한 설명
- 시험절차의 모든 변경사항에 대한 설명

결과

- IL8LA 및 GAPLA의 측정값
- nIL8LA, Ind-IL8LA, 및 Inh-GAPLA에 대한 계산값
- Ind-IL8LA의 95% 신뢰구간
- 루시퍼라아제 활성 유도와 세포생존율에 대한 용량-반응 곡선을 보여주는 그래프
- 기타 관련된 관찰사항에 대한 설명(해당되는 경우)

결과 고찰

- IL-8 루시퍼라아제 시험 결과의 논의
- 피부감작성 통합독성평가(IATA)의 맥락에서 시험 결과 고찰

결론

참고문헌

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. 2011. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OECD (2017), Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at:

[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm]

(3) OECD (2017), Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at:

[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm]

(4) OECD (2016), Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No. 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at:

[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm]

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. 2014. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. Toxicol In Vitro 29:1816-30.

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. 2010. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals : ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, online.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. 2010. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OECD (2016), Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Publishing, Paris.

http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. 2001. Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. 1999. Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. 2005. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OECD (2017), To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France.

(16) OECD (2005), Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

(17) OECD (2017), Draft Guidance document: Good In Vitro Method Practices

(GIVIMP) for the Development and Implementation of In Vitro Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at:

[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Draft%20GIVIMP_v05%20-%20clean.pdf]

(18) JaCVAM (2016), IL-8 Luc assay protocol, Available at.

http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. 2010. Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

(20) OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris, France.

(21) United Nations (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

부록 Ⅰ. 용어 정의

정확도(Accuracy): 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 "상관성(relevance)"의 한 측면이다. 정확도는 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 "일치도(concordance)"와 흔히 같은 의미로 쓰임[16].

독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP): 분자 수준의 시작 단계를 거쳐 생체내(*in vivo*) 결과에 이르는 표적 화학물질 또는 유사한 화학물질 그룹으로부터 일어나는 일련의 현상[20].

CV05: 세포생존율(Cell Viability) 05. 화학물질이 0.05 미만의 Inh-GAPLA을 나타내는 최소 농도

FInSLO-LA: IL-8 Luc 시험법 관련 검증연구보고서와 이전의 논문에서 Ind-IL8LA를 지칭하기 위해 사용된 약어. Ind-IL8LA의 정의 참고.

GAPLA: 안정적 루시퍼라아제 레드(Stable Luciferase Red, SLR)의 루시퍼라아제 활성(λ max = 630 nm)으로 GAPDH에 의해 조절되며 세포생존율과 살아있는 세포수를 입증한다.

유해성(Hazard): 해당 물질에 생명체, 생태계, 또는 특정 인구집단에 노출되었을 때 위해한 영향을 줄 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적인 특성

통합독성평가(Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA): 화학물질 또는 화학물질 그룹의 유해성 확인(가능성), 유해성 특성규명(효력) 및/혹은 안전성 평가(가능성/효력 및 노출)를 위해 사용되는 구조적 접근방식으로 잠재적 유해성 및/또는 위해성(risk) 및/또는 추가 시험(표적시험으로 시험을 최소화 함)의 필요성과 관련한 규제 결정에 정보를 제공하기 위해 모든 관련 정보를 전략적으로 통합하고 가중치를 측정한다.

II-SLR-LA: IL-8 루시퍼라아제 시험법 관련 검증연구보고서와 이전의 논문에서 Inh-GAPLA를 지칭하기 위해 사용된 약어. Inh-GAPLA의 정의 참고.

IL-8(Interleukin-8): 호중구(neutrophils) 및 T-세포 림프구의 화학주성(chemotaxis)을 유발하는 내피세포, 섬유아세포, 각질세포, 대식세포(macrophage)와 단핵구로부터 유래한 사이토카인(cytokine)

IL8LA: IL-8 프로모터에 의해 조절되는 안정적 루시퍼라아제 오렌지(Stable Luciferase Orange, SLO)의 루시퍼라아제 활성(λmax = 580 nm)

Ind-IL8LA: IL8LA의 유도배수. 시험물질을 처리한 THP-G8 세포의 nIL8LA를 비활성화 THP-G8 세포의 nIL8LA로 나누어 계산하며 시험물질의 IL-8 프로모터 활성의 유도를 나타낸다.

Inh-GAPLA: GAPLA의 억제. 시험물질을 처리한 THP-G8 세포의 GAPLA를 처리하지 않은 THP-G8 세포의 GAPLA로 나누어 계산하며 시험물질의 세포독성을 나타낸다.

최소유도한계(Minimum induction threshold, MIT): 물질이 양성기준을 충족하는 최소 농도

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

단일성분물질(Mono-constituent substance): 한 개의 주요 구성성분이 최소 80%(w/w) 이상이며, 정략적인 구성(composition)으로 정의되는 물질.

다성분물질(Multi-constituent substance): 한 개 이상의 주요 구성성분이 ≥ 10% (w/w) 및 < 80% (w/w)이며 정략적인 구성으로 정의되는 물질. 다성분 물질은 제조과정의 산물이다. 혼합물과 다성분물질의 차이는 혼합물의 경우 화학반응 없이 두 개 이상의 물질을 혼합하여 얻고 다성분물질은 화학반응의 산물이다.

nIL8LA: GAPDH 프로모터 활성을 반영하는 SLR 루시퍼라아제 활성에 의해 정상화된 IL-8 프로모터 활성(IL8LA)을 나타내는 SLO 루시퍼라아제 활성으로 세포생존율 또는 세포 수를 감안한 후의 IL-8 프로모터 활성을 나타낸다.

nSLO-LA: IL-8 루시퍼라아제 시험법 관련 검증연구보고서와 이전의 논문에서 nIL8LA를 지칭하기위해 사용된 약어. nIL8LA의 정의 참고.

양성대조군(Positive control): 시험계의 모든 요소를 포함하며 양성반응을 유도하는 것으로 알려진 물질로 처리한 군(replicate). 시간 경과에 따른 양성대조군 반응의 변동성 평가를 보장하기 위해 양성반응의 정도는 과도하지 않아야 한다.

Pre-haptens: 비생물전환(abiotic transformation)을 통해 감작성 물질이 되는 화학물질.

Pro-haptens: 피부감작성 가능성 발현을 위해 효소 활성화를 필요로 하는 화학물질.

상관성(Relevance): 시험과 원하는 영향(effect of interest)의 관계 및 이 같은 관계가 특정

목적에 유의미하고 유용한지 여부에 대한 설명. 상관성은 시험이 원하는 생물학적 영향을 올바르게 측정 혹은 예측하는 정도를 나타낸다. 상관성에는 시험법의 정확도(일치도)에 대한 고려를 포함한다[16].

신뢰도(Reliability): 시험법이 동일한 프로토콜을 사용하여 수행되었을 때 시간이 지남에 따라 실험실 내/실험실 간 재현성을 나타낼 수 있는 정도의 척도. 신뢰도는 실험실 내/실험실 간 재현성(reproducibility)과 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가된다[16].

시험(Run): 용매/부형제 대조군 및 양성대조군과 동시에 시험된 하나 이상의 시험물질로 구성된다.

민감도(Sensitivity): 시험에 의해 정확하게 분류되는 모든 양성/활성 화학물질의 비율. 민감도는 카테고리 결과를 산출하는 시험법의 정확도에 대한 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 요소이다[16].

SLO-LA: IL-8 루시퍼라아제 시험법 관련 검증연구보고서와 이전의 논문에서 IL8LA를 지칭하기 위해 사용된 약어. IL8LA의 정의 참고.

SLR-LA: IL-8 루시퍼라아제 시험법 관련 검증연구보고서와 이전의 논문에서 GAPLA를 지칭하기 위해 사용된 약어. GAPLA의 정의 참고.

용매/부형제 대조군(Solvent/vehicle control): 시험물질을 제외한(단, 사용된 용매/부형제는 포함) 시험계의 모든 성분을 포함하는 처리하지 않는 시료. 용매/부형제 대조군은 동일한 용매/부형제에서 용해되거나 안정적으로 분산되는 시험물질로 처리한 시료에 대한 기준 반응(baseline response) 확립에 사용된다. 또한 동시 배지대조군과 함께 시험하는 경우 용매/부형제가 시험계와 상호작용하는지 여부를 보여준다.

특이도(Specificity): 시험으로 정확하게 분류되는 모든 음성/비활성 물질의 비율. 특이도는 카테고리 결과를 산출하는 시험법의 정확도에 대한 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는데 중요한 요소이다.

물질(Substance): 자연 상태 또는 기타 생산과정을 통해 얻은 화학적 성분 및 이들의 혼합물. 생산품의 안정성을 유지시키기 위해 필요한 첨가물 및 사용된 제조과정으로부터 발생하는 불순물을 포함하지만 물질의 안정성에 영향을 주거나 구성을 바꾸지 않고 분리되는 용매는 제외된다.

계면활성제(Surfactant): 표면활성제(surface-active agent)라고도 불리며 액체의 표면 장력

을 낮춰 거품을 일으키거나 고체를 뚫고 들어간다. 계면활성제는 습윤제(wetting agent)라고도 알려져 있다(TG 437).

시험물질(Test chemical): "시험물질"이라는 용어는 시험되는 것을 일컫기 위해 사용된다.

THP-G8: IL-8 루시퍼라아제 시험법에 사용되는 IL-8 리포터 세포주. 인체 대식세포 유사 세포주인 THP-1은 IL-8 및 GAPDH 프로모터 각각의 조절 하에 SLO와 SLR 루시퍼라아제 유전자를 형질주입되었다.

UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): 물리적, 보건적 및 환경적 유해성의 표준화된 유형과 정도에 따른 화학물질(물질 및 혼합물)의 분류체계로, 그림문자(pictogram), 신호어(signal words), 유해성문구(hazard statement), 예방조치문구(precautional statement) 및 안전성 데이터 시트(safety data sheet)와 같이 대응하는 커뮤니케이션 요소를 다루어 사람(직원, 근로자, 운송업자, 소비자 및 응급처치자 포함) 및 환경 보호라는 관점에서 이 같은 화학물질의 부작용에 대한 정보를 전달하는 체계[21]

UVCB: 알려지지 않거나 가변적인 조성, 복잡한 반응 결과물 또는 생물학적 재료를 가진 물질

검증된 시험법(Validated test method): 특정 목적에 충분한 상관성과 신뢰성이 있다고 간주되고 과학적으로 타당한 원리에 근거한 시험법. 시험법은 절대적인 의미에서 검증된 것은 결코 아니며 정의된 목적과 관련되어 있다.

부록 II. 루시퍼라아제 활성 측정의 원리 및 SLO와 SLR에 대한 광학 필터의 투과계수(transmisson coefficient)의 결정

MultiReporter Assay System(Tripluc)이 다색 감지 시스템을 가진 마이크로플레이트 유형의 발광측정장치와 함께 사용될 수 있으며, 다색 감지 시스템에 광학필터(예: Phelios AB-2350(ATTO), ARVO(PerkinElmer), Tristar LB941(Berthold))가 장착될 수 있다. 측정에 사용되는 광학필터는 600 – 620 nm long/short pass 필터 또는 600 – 700 nm band pass 필터이다.

(1) 광학 필터를 통한 이중색 루시퍼라아제 측정

본 예시는 Phelios AB-2350(ATTO)를 사용한다. 이 발광측정장치는 SLO(λmax = 580 nm) 및 SLR(λmax = 630 nm) 발광을 분리하기 위해 600 nm long pass 필터(R60 HOYA Co.)(600 nm LP, Filter 1)가 장착되어 있다.

600 nm LP의 전달계수를 결정하기 위해 먼저 정제된 SLO와 SLR 루시퍼라아제 효소를 사용하여 i) 필터 없이(F0) SLO와 SLR의 생물발광 강도, ii) 600 nm LP (Filter 1)를 통과하는 SLO와 SLR의 생물발광 강도를 측정하고, iii) 아래와 같이 SLO 및 SLR에 대한 600 nm LP의 전달 계수를 계산한다.

전달 계수		약어	정의
SLO	Filter 1 투과계수	κO_{R60}	SLO에 대한 필터의 전달계수
SLR	Filter 1 투과계수	κR_{R60}	SLR에 대한 필터의 전달계수

시험 샘플에서 SLO 및 SLR의 강도가 각각 O와 R로 정의되는 경우, i) (모든 광학) 필터 없이 측정한 빛의 강도인 F0 및 ii) 600 nm LP(Filter 1)를 통해 전달되는 빛의 강도인 F1이 아래에 기술되어 있다.

$$F0 = O+R$$
$$F1 = \kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

이 공식들은 아래와 같이 바꿀 수 있다.

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

그런 다음 계산된 투과지수(transmittance factor)(κO_{R60} 및 κR_{R60})과 측정된 F0 및 F1을 사용하여 아래와 같이 O 값과 R 값을 계산할 수 있다.

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

투과지수 결정을 위한 재료 및 방법

(1) 시약

· 단일 정제된 루시퍼라아제 효소
- 동결건조한 정제된 SLO 효소
- 동결건조한 정제된 SLR 효소
(검증연구를 위해 GPC Lab. Co. Ltd.(일본, 돗토리)에서 THP-G8 세포주와 함께 얻음)

· 시험 시약
- Tripluc® 루시퍼라아제 시험 시약(예: TOYOBO Cat#MRA-301)

· 배지
- 루시퍼라아제 시험용 배지(30 mL, 2~8℃에서 보관)

시약	농도	배지에서의 최종 농도	필요 용량
RPMI-1640	-	-	27 mL
FBS(Foetal Bovine Serum)	-	10%	3 mL

(2) 효소 용액의 준비

동결건조한 정제된 루시퍼라아제 효소에 10%(w/v) 글리세롤 함유 10 ~ 100 mM Tris/HCl 또는 Hepes/HCl(pH 7.5~8.0) 200 µL를 넣어 튜브에서 용해하고, 효소 용액을 10 µL씩 1.5 mL 일회용 튜브에 분주한 후 영하 80℃ 냉동고에 보관한다. 냉동 보관한 효소 용액은 최대 6개월까지 사용 가능하다. 사용 시에는 효소 용액이 담긴 각 튜브에 루시퍼라아제 시험용 배지 1 mL[10% FBS(Foetal Bovine Serum) 함유 RPMI-1640]을 넣고, 불활성화를 방지하기 위해 얼음 위에 보관한다.

(3) 생물발광 측정

Tripluc® 루시퍼라아제 시험 시약(Tripluc)을 해동하고 항온수조 또는 주변 공기 온도에서 실온 보관한다. 광전자증배관(photomultiplier)의 안정화를 위해 측정 시작 30분 전에 발광측정장치의 전원을 켠다. 희석한 효소 용액 100 µL를 검은 96-well 플레이트(바닥이 평평한 형태)로 옮긴다(SLO 참조 샘플은 #B1, #B2, #B3, SLR 참조 샘플은 #D1, #D2, #D3). 그런 다음 사전에 가온한 Tripluc 100 µL를 파이펫을 사용하여 희석한 효소 용액이 담긴 플레이트의 각 well로 옮긴다. 쉐이커로 플레이트를 실온(약 25℃)에서 10분간 흔들어 준다. Well 속 용액에 기포가 생긴 경우 제거한다. 루시퍼라아제 활성 측정을 위해 발광측정장치에 플레이트를 놓는다. 생물발광은 광학필터를 장착하지 않은 상태(F0)와 장착한 상태(F1)에서 각 3초간 측정한다.

투과 계수는 다음과 같이 계산된다.

- 투과 계수(SLO(κO_{R60})) = (F1의 #B1 + F1의 #B2 + F1의 #B3) / (F0의 #B1 + F0의 #B2 + F0의 #B3)
- 투과 계수(SLR(κR_{R60})) = (F1의 #D1 + F1의 #D2 + F1의 #D3) / (F0의 #D1 + F0의 #D2 + F0의 #D3)

계산된 투과지수는 동일한 발광측정장치를 사용하여 수행된 모든 측정에 사용된다.

장비의 품질 관리

IL-8 루시퍼라아제 프로토콜에 기술된 절차가 사용되어야 한다[18].

부록 III. 숙련도 물질

시험가이드라인 442E의 본 부속서에 기술된 시험법의 정기적 사용에 앞서 실험실은 표 1에서 권고하는 9개 물질에 대해 예상되는 IL-8 루시퍼라아제 시험 예측을 얻고, 9개 (피부감작성 유해성의 반응 범위를 대표하기 위해 선정됨) 중 최소 8개 숙련도 물질에 대해 각각의 참조 범위 내에 들어가는 값을 얻음으로써 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 다른 선정 기준으로는 물질이 상업적으로 구매 가능하며, 고품질의 생체내(*in vivo*) 참조 데이터와 IL-8 루시퍼라아제 시험법으로 생산한 고품질의 생체외(*in vitro*) 데이터가 있어야 한다. 또한 IL-8 루시퍼라아제 시험법에 대해 출간된 참조 문헌 데이터가 있다[(1)(6)].

표 1. IL-8 루시퍼라아제 시험법의 기술적 숙련도 입증을 위해 권장되는 물질

숙련도물질	CAS no.	성상	20 mg/mL의 X-VIVO15 에서의 용해성	생체내 (*in vivo*) 예측[1]	IL-8 루시퍼라아제 예측[2]	참조 범위 (µg/mL)[3]	
						CV05[4]	IL-8 루시퍼라아제 MIT[5]
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	고체	불용성	감작성 (매우 강함)	양성	2.3-3.9	0.5-2.3
Formaldehyde	50-00-0	액체	용해성	감작성 (강함)	양성	9-30	4-9
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	고체	불용성	감작성 (보통)	양성	250-290	60-250
Ethylenediamine	107-15-3	액체	용해성	감작성 (보통)	양성	500-700	0.1-0.4
Ethyleneglycol dimethacrylate	97-90-5	액체	불용성	감작성 (약함)	양성	> 2000	0.04-0.1
4-Allylanisole (Estragol)	140-67-0	액체	불용성	감작성 (약함)	양성	> 2000	0.01-0.07
Streptomycin sulphate	3810-74-0	고체	용해성	비감작성	음성	> 2000	> 2000
Glycerol	56-81-5	액체	용해성	비감작성 물질	음성	> 2000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	액체	용해성	비감작성	음성	> 2000	> 2000

약어: CAS no. = Chemical Abstracts Service Registry Number

[1] 생체내(*in vivo*) 예측력(potency)은 ECETOC[(19)]가 제안한 기준을 사용하여 산출된다.

[2] 과거 관찰된 값에 근거[(1)(6)]

[3] CV05 및 IL-8 루시퍼라아제 MIT는 Epi Suite™이 제시한 물에 대한 용해성을 사용하여 계산되었다.

[4] CV05: 화학물질이 0.05 미만의 Inh-GAPLA을 보이는 최소 농도

[5] MIT: 화학물질이 양성 기준을 충족시키는 최소 농도

부록 IV. 지표(index) 및 판정 기준

nIL8LA (nSLO-LA)

i 농도(i = 0-11)의 j차 반복(j = 1-4)은 IL8LA(SLO-LA)와 GAPLA(SLR-LA)에 대해 각각 측정된다. 정상화된 IL8LA는 nIL8LA(nSLO-LA)라고도 하며, 다음과 같이 정의된다.

nIL8LA ij = IL8LA ij / GAPLA ij.

이는 본 시험법의 기본 측정 단위이다.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

0 농도 대비 I 농도의 반복에 대한 평균 nIL8LA(nSLO-LA)의 증가를 나타내는 Ind-IL8LA는 본 시험법의 주요 평가항목이다. 이 비율은 다음의 공식으로 쓰여 진다.

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{(1/4)\times\sum\nolimits_j \text{nIL8LA}_{ij}\right\} / \left\{(1/4)\times\sum\nolimits_j \text{nIL8LA}_{0j}\right\}.$$

선도 실험실은 1.4의 값이 시험된 물질에 대한 양성 결과와 일치한다고 제안하였다. 이 값은 선도 실험실의 과거 데이터(historical data) 조사에 기반한다. 그 후 데이터 관리팀은 모든 검증연구 단계에서 이 값을 사용하였다. 주요 평가항목인 Ind-IL8LA는 아래의 방정식과 같이 2배 산술평균의 비율이다.

95% 신뢰구간(95% Confidence interval, 95% CI)

이 주요 평가항목의 정확성을 보여주기 위해 2배 산술평균의 비율에 기반한 95% 신뢰구간(95% CI)을 추산할 수 있다. 95% CI $\geq$ 1의 하한(lower limit)은 i 농도의 nIL8LA이 용매대조군의 nIL8LA보다 훨씬 더 크다는 것을 나타낸다. 95% CI를 구성하기 위해 다양한 방법이 있다. 우리는 본 연구에서 피엘러의 정리(Fieller's theorem)라고 알려진 방법을 사용하였다. 이 95% 신뢰구간 정리는 다음의 공식으로 얻어진다.

$$\left[\frac{-B-\sqrt{B^2-4AC}}{2A},\frac{-B+\sqrt{B^2-4AC}}{2A}\right],$$

$$A=\bar{x}_0^2-t^2_{0.975(v)}\times\frac{sd_0^2}{n_0},\ B=-2\times\bar{x}\times\bar{y},\ C=\bar{y}_i^2-t^2_{0.975(v)}\times\frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}},\ n_0=4,$$

$$\bar{x}_0=(1/n_0)\times\sum_j nIL8LA_{0j},\ sd_0^2=\{1/(n_0-1)\}\times\sum_j(nIL8LA_{0j}-\bar{x}_0)^2,$$

$$n_{y_i}=4,\ \bar{y}_i=(1/n_{y_i})\times\sum_j(nIL8LA_{ij}),\ sd_{y_i}^2=\{1/(n_{y_j}-1)\}\times\sum_j(nIL8LA_{ij}-\bar{y}_i)^2.$$

$t_{0.975(v)}$: 자유도(degree of freedom)의 v와 중앙 t 분배의 97.5 백분위.

$$v=\left(\frac{sd_0^2}{n_0}+\frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}}\right)^2/\left\{\left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2/(n_0-1)+\left(\frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}}\right)^2/(n_{y_i}-1)\right\}.$$

Inh-GAPLA(II-SLR-LA)

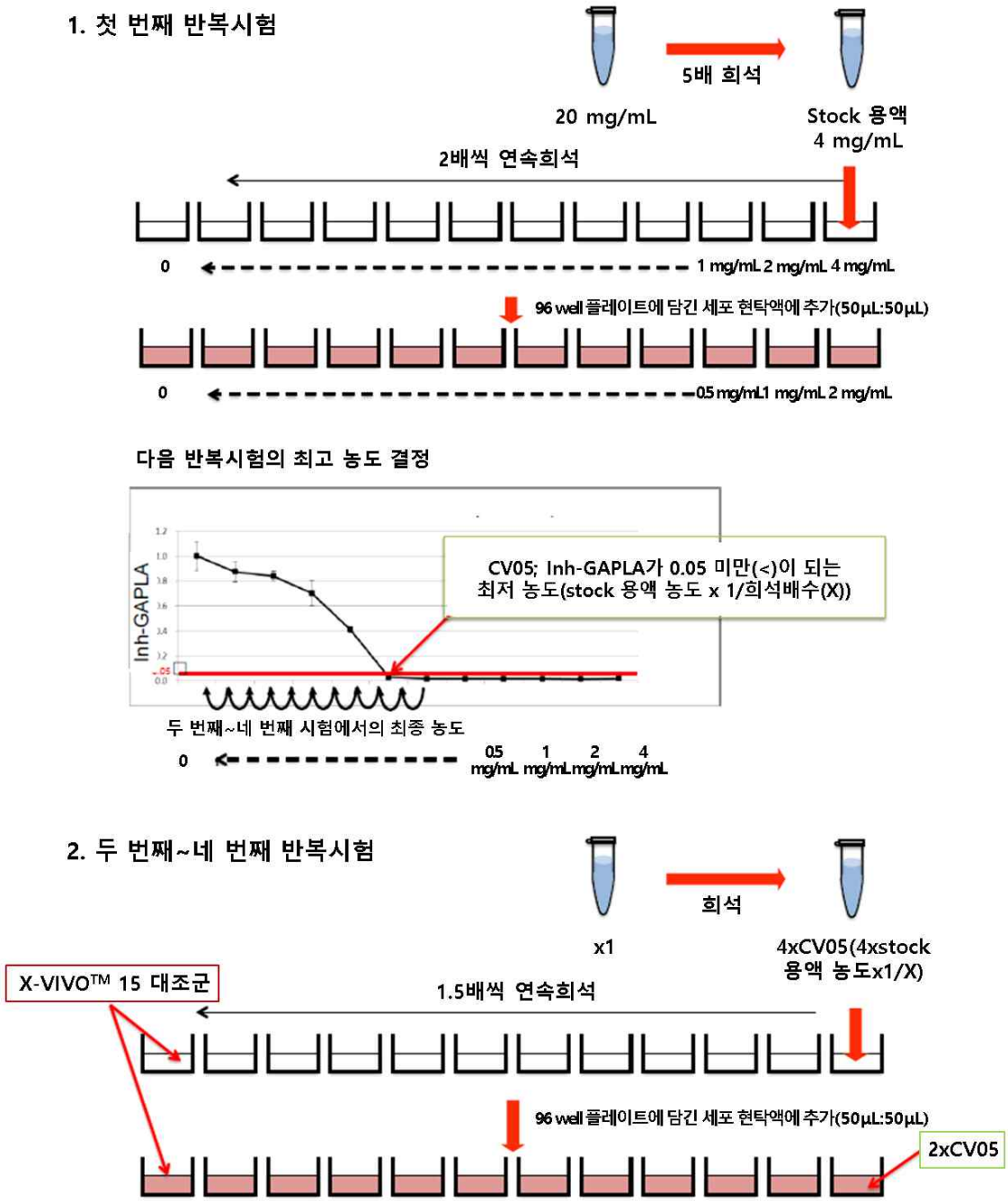
Inh-GAPLA는 용매대조군 대비 i 농도의 반복에 대한 평균 GAPLA(SLR-LA)의 비율이며, 다음과 같이 쓰인다.

$$\text{Inh-GAPLA}_i=\{(1/4)\times\sum_j GAPLA_{ij}\}/\{(1/4)\times\sum_j GAPLA_{0j}\}.$$

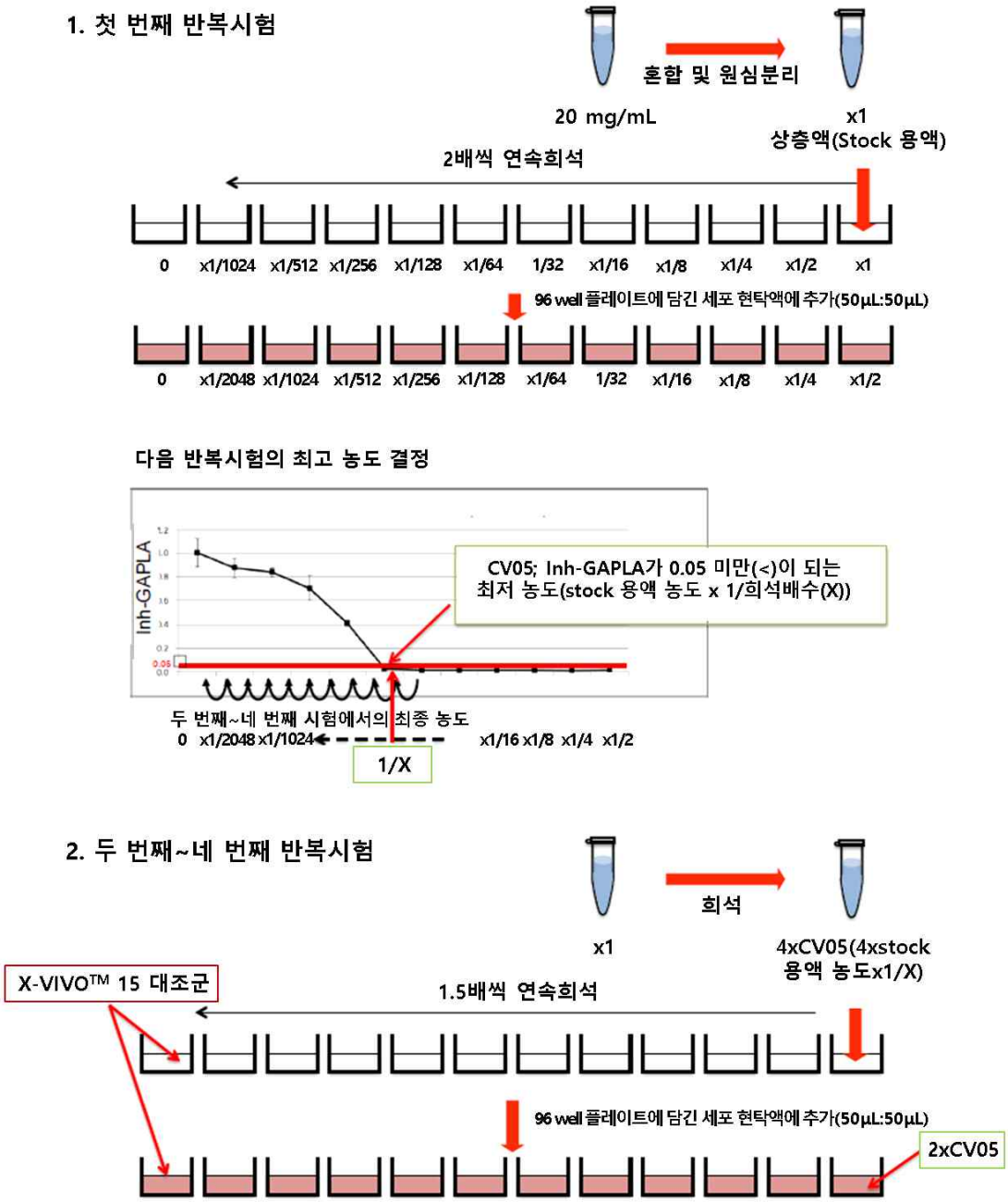
GAPLA는 nIL8LA의 분모이므로 극소값(extremely small value)은 nIL8LA에서 큰 변동성을 유발한다. 그러므로 Inh-GAPLA(0.05 미만)의 극소값을 가진 Ind-IL8LA 값은 정확성이 낮은 것으로 간주될 수 있다.

부록 Ⅴ. IL-8 루시퍼라아제 시험법 관련 물질 용해 방법에 대한 도식(scheme)

(a) X-VIVO™ 15에 20 mg/mL로 용해되는 물질의 경우

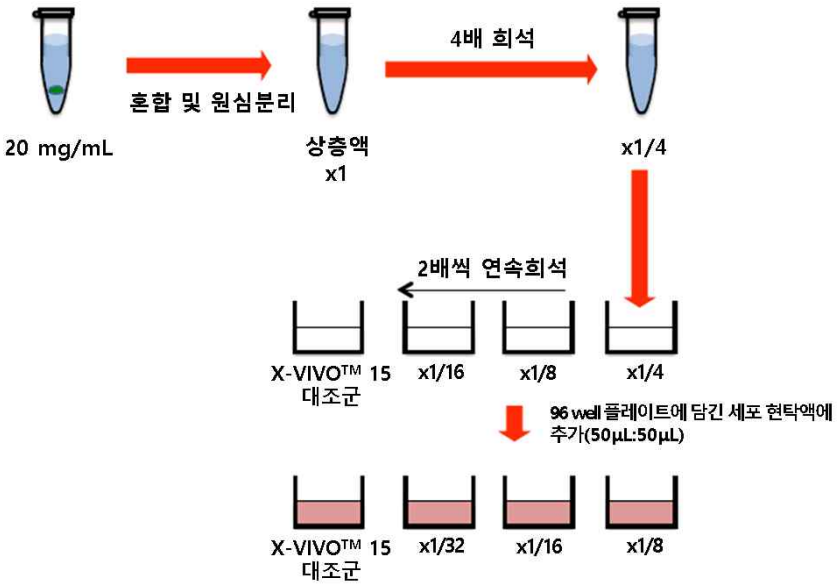


(b) X-VIVO™ 15에 20 mg/mL로 용해되지 않는 물질의 경우



부록 Ⅵ. IL-8 루시퍼라아제 시험법의 양성대조군인 4-NBB 용해 방법에 대한 도식(scheme)

양성대조군 : 4-NBB(X-VIVO™ 15에 용해되지 않음)



별첨 2. 원문(OECD TG 442E ANNEX Ⅲ)

ANNEX III: IN VITRO SKIN SENSITISATION: IL-8 LUC ASSAY

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

1. In contrast to assays analysing the expression of cell surface markers, the IL8-Luc assay quantifies changes in IL-8 expression, a cytokine associated with the activation of dendritic cells (DC). In the THP-1-derived IL-8 reporter cell line (THP-G8, established from the human acute monocytic leukemia cell line THP-1), IL-8 expression is measured following exposure to sensitisers (1). The expression of luciferase is then used to aid discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers.

2. The IL-8 Luc method has been evaluated in a validation study (2) conducted by the Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods (JaCVAM), the **Ministry of Economy, Trade and Industry** (METI), and the Japanese Society **for Alternatives to Animal Experiments (JSAAE**) and subsequently subjected to independent peer review (3) under the auspices of JaCVAM and the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) with the support of the **International Cooperation on Alternative Test** Methods (ICATM). Considering all available evidence and input from regulators and stakeholders, the IL-8 Luc assay is considered useful as part of IATA to discriminate sensitisers from non-sensitisers for the purpose of hazard classification and labelling. Examples of the use of IL-8 Luc assay data in combination with other information are reported in the literature (4) (5) (6).

3. The IL-8 Luc assay proved to be transferable to laboratories experienced in cell culture and luciferase measurement. Within and between laboratory reproducibilities were 87.7% and 87.5%, respectively (2). Data generated in the validation study (2) and other published work (1) (6) show that versus the LLNA, the IL-8 Luc assay judged 118 out of 143 chemicals as positive or negative and judged 25 chemicals as inconclusive and the accuracy of the IL-8 Luc assay in distinguishing skin sensitisers (UN GHS Cat. 1) from non-sensitisers (UN GHS No Cat.) is 86% (101/118) with a sensitivity of 96% (92/96) and specificity of 41% (9/22). Excluding substances outside the applicability domain described below (paragraph 5), the IL-8 Luc assay judged 113 out of 136 chemicals as positive or negative and judged 23 chemicals as inconclusive and the accuracy of the IL-8 Luc assay is 89% (101/113) with sensitivity of 96% (92/96) and specificity of 53% (9/17). Using human data cited in Urbisch et al. (7), the IL-8 Luc assay judged 76 out of 90 chemicals as positive or negative and judged 14 chemicals as inconclusive and the accuracy is 80% (61/76), sensitivity is 93% (54/58) and specificity is 39% (7/18). Excluding substances outside the applicability domain, the IL-8 Luc assay judged 71 out of 84 chemicals as positive or negative and judged 13 chemicals as inconclusive and the accuracy is 86% (61/71) with sensitivity of 93% (54/58) and specificity of 54% (7/13). False negative predictions with the IL-8 Luc assay are more likely to occur with chemicals showing low/moderate skin sensitisation potency (UN GHS subcategory 1B) than those with high potency (UN GHS subcategory 1A) (6). Together, the information supports a role for the IL-8 Luc assay in the identification of skin sensitisation hazards. The accuracy given for the IL-8 Luc assay as a standalone test method is only for guidance, as the method should be considered in combination with other sources of information in the context of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 7 and 8 in the General introduction. Furthermore, when evaluating non-animal methods for skin sensitisation, it should be remembered that the LLNA and other animal tests may not fully reflect the situation in humans.

© OECD 2018

4. On the basis of the data currently available, the IL-8 Luc assay was shown to be applicable to test chemicals covering a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potency (as determined in *in vivo* studies) and physicochemical properties (2) (6).

5. Although the IL-8 Luc assay uses X-VIVO™ 15 as a solvent, it correctly evaluated chemicals with a Log $K_{o/w}$ >3.5 and those with a water solubility of around 100 µg/ mL as calculated by EPI Suite™ and its performance to detect sensitisers with poor water solubility is better than that of the IL-8 Luc assay using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a solvent (2). However, negative results for test chemicals that are not dissolved at 20 mg/ml may produce false negative results due to their inability to dissolve in X-VIVO™ 15. Therefore, negative results for these chemicals should not be considered. A high false negative rate for anhydrides was seen in the validation study. Furthermore, because of the limited metabolic capability of the cell line (8) and the experimental conditions, pro-haptens (substances requiring metabolic activation) and pre-haptens (substances activated by air oxidation) might give negative results in the assay. However, although negative results for suspected pre/prohaptens should be interpreted with caution, the IL-8 Luc assay correctly judged 11 out of 11 pre-haptens, 6/6 pro-haptens, and 6/8 pre/pro-haptens in the IL-8 Luc assay data set (2). Based on the recent comprehensive review on three non-animal methods (the DPRA, the KeratinoSens™ and the h-CLAT) to detect pre and prohaptens (9), and based on the fact that THP-G8 cells used in the IL-8 Luc assay is a cell line derived from THP-1 that is used in the h-CLAT, the IL-8 Luc assay may also contribute to increase the sensitivity of non-animal methods to detect pre and pro-haptens in the combination of other methods. Surfactants tested so far gave (false) positive results irrespective of their type (e.g. cationic, anionic or on-ionic). Finally, chemicals that interfere with luciferase can confound its activity/measurement, causing apparent inhibition or increased luminescence (10). For example, phytoestrogen concentrations higher than 1µM were reported to interfere with luminescence signals in other luciferase-based reporter gene assays due to over-activation of the luciferase reporter gene. Consequently, luciferase expression obtained at high concentrations of phytoestrogens or compounds suspected of producing phytoestrogen-like activation of the luciferase reporter gene needs to be examined carefully (11). Based on the above, surfactants, anhydrides and chemicals interfering with luciferase are outside the applicability domain of this assay. In cases where there is evidence demonstrating the non-applicability of the IL-8 Luc assay to other specific categories of test chemicals, the method should not be used for those specific categories.

6. As described above, the IL-8 Luc assay supports discrimination of skin sensitisers from non-sensitisers. Further work, preferably based on human data, is required to determine whether IL-8 Luc results can contribute to potency assessment when considered in combination with other information sources.

7. Definitions are provided in Appendix I.

PRINCIPLE OF THE TEST

8. The IL-8 Luc assay makes use of a human monocytic leukemia cell line THP-1 that was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Using this cell line, the Dept. of Dermatology, Tohoku University School of Medicine, established a THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8, that harbours the Stable Luciferase Orange (SLO) and Stable Luciferase Red (SLR) luciferase genes under the control of the IL-8 and **glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase** (GAPDH) promoters, respectively (1). This allows quantitative measurement of luciferase gene induction by detecting luminescence from well-established light producing luciferase substrates as an indicator of the activity of the IL-8 and GAPDH in cells following exposure to sensitising chemicals.

© OECD 2018

9. The dual-colour assay system comprises an orange-emitting luciferase (SLO; λmax = 580 nm) (12) for the gene expression of the IL-8 promoter as well as a red-emitting luciferase (SLR; λmax = 630 nm) (13) for the gene expression of the internal control promoter, GAPDH. The two luciferases emit different colours upon reacting with firefly D-luciferin and their luminescence is measured simultaneously in a one-step reaction by dividing the emission from the assay mixture using an optical filter (14) (Appendix II).

10. THP-G8 cells are treated for 16 hours with the test chemical, after which SLO luciferase activity (SLO-LA) reflecting IL-8 promoter activity and SLR luciferase activity (SLR-LA) reflecting GAPDH promoter activity are measured. To make the abbreviations easy to understand, SLO-LA and SLR-LA are designated as IL8LA and GAPLA, respectively. Table 1 gives a description of the terms associated with luciferase activity in the IL-8 Luc assay. The measured values are used to calculate the normalised IL8LA (nIL8LA), which is the ratio of IL8LA to GAPLA; the induction of nIL8LA (Ind-IL8LA), which is the ratio of the arithmetic means of quadruple-measured values of the nIL8LA of THP-G8 cells treated with a test chemical and the values of the nIL8LA of untreated THP-G8 cells; and the inhibition of GAPLA (Inh-GAPLA), which is the ratio of the arithmetic means of quadruple-measured values of the GAPLA of THP-G8 cells treated with a test chemical and the values of the GAPLA of untreated THP-G8 cells, and used as an indicator for cytotoxicity.

Table 1. Description of terms associated with the luciferase activity in the IL-8 Luc assay

Abbreviations	Definition
GAPLA	SLR luciferase activity reflecting GAPDH promoter activity
IL8LA	SLO luciferase activity reflecting IL-8 promoter activity
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA of THP-G8 cells treated with chemicals / nIL8LA of untreated cells
Inh-GAPLA	GAPLA of THP-G8 treated with chemicals / GAPLA of untreated cells
CV05	The lowest concentration of the chemical at which Inh-GAPLA becomes < 0.05.

11. Performance standards (PS) (15) are available to facilitate the validation of modified *in vitro* IL-8 luciferase test methods similar to the IL-8 Luc assay and allow for timely amendment of this Test Guideline for their inclusion. Mutual Acceptance of Data (MAD) will only be guaranteed for test methods validated according to the PS, if these test methods have been reviewed and included in this Test Guideline by the OECD (16).

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

12. Prior to routine use of the test method described in this Annex to Test Guideline 442E, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the 9 Proficiency Substances listed in Appendix III in compliance with the Good in vitro Method Practices (17). Moreover, test method users should maintain a historical database of data generated with the reactivity checks (see paragraph 15) and with the positive and solvent/vehicle controls (see paragraphs 21-24), and use these data to confirm the reproducibility of the test method in their laboratory is maintained over time.

© OECD 2018

PROCEDURE

13. The Standard Operating Procedure (SOP) for the IL-8 Luc assay is available and should be employed when performing the test (18). Laboratories willing to perform the test can obtain the recombinant THP-G8 cell line from GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, upon signing a Material Transfer Agreement (MTA) in line with the conditions of the OECD template. The following paragraphs provide a description of the main components and procedures of the assay.

Preparation of cells

14. The THP-G8 cell line from GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan, should be used for performing the IL-8 Luc assay (see paragraphs 8 and 13). On receipt, cells are propagated (2-4 passages) and stored frozen as a homogeneous stock. Cells from this stock can be propagated up to a maximum of 12 passages or a maximum of 6 weeks. The medium used for propagation is the RPMI-1640 culture medium containing 10% foetal bovine serum (FBS), antibiotic/antimycotic solution (100U/mL of penicillin G, 100µg/mL of streptomycin and 0.25µg/mL of amphotericin B in 0.85% saline) (e.g. GIBCO Cat#15240-062), 0.15µg/mL Puromycin (e.g. CAS:58-58-2) and 300µg/mL G418 (e.g. CAS:108321-42-2).

15. Prior to use for testing, the cells should be qualified by conducting a reactivity check. This check should be performed 1-2 weeks or 2-4 passages after thawing, using the positive control, 4-nitrobenzyl bromide (4-NBB) (CAS:100-11-8, ≥ 99% purity) and the negative control, lactic acid (LA) (CAS:50-21-5, ≥85% purity). 4-NBB should produce a positive response to Ind-IL8LA (≥1.4), while LA should produce a negative response to Ind-IL8LA (<1.4). Only cells that pass the reactivity check are used for the assay. The check should be performed according to the procedures described in paragraphs 22-24.

16. For testing, THP-G8 cells are seeded at a density of 2 to 5 × 10^5 cells/mL, and pre-cultured in culture flasks for 48 to 96 hours. On the day of the test, cells harvested from the culture flask are washed with RPMI-1640 containing 10% FBS without any antibiotics, and then, resuspended with RPMI-1640 containing 10% FBS without any antibiotics at 1 × 10^6 cells/mL. Then, cells are distributed into a 96-well flat-bottom black plate (e.g. Costar Cat#3603) with 50µL (5 × 10^4 cells/well).

Preparation of the test chemical and control substances

17. The test chemical and control substances are prepared on the day of testing. For the IL-8 Luc assay, test chemicals are dissolved in X-VIVO™ 15, a commercially available serum-free medium (Lonza, 04-418Q), to the final concentration of 20 mg/mL. X-VIVO™ 15 is added to 20 mg of test chemical (regardless of the chemical's solubility) in a microcentrifuge tube and brought to a volume of 1mL and then vortexed vigorously and shaken on a rotor at a maximum speed of 8 rpm for 30 min at an ambient temperature of about 20°C. Furthermore, if solid chemicals are still insoluble, the tube is sonicated until the chemical is dissolved completely or stably dispersed. For test chemicals soluble in X-VIVO™ 15, the solution is diluted by a factor of 5 with X-VIVO™ 15 and used as an X-VIVO™ 15 stock solution of the test chemical (4 mg/mL). For test chemicals not soluble in X-VIVO™ 15, the mixture is rotated again for at least 30 min, then centrifuged at 15,000 rpm (≈20,000*g*) for 5 min; the resulting supernatant is used as an X-VIVO™ 15 stock solution of the test chemical. A scientific rationale should be provided for the use of other solvents, such as DMSO, water, or the culture medium. The detailed procedure for dissolving chemicals is shown in Appendix V. The X-VIVO™ 15 solutions described in paragraphs 18-23 are mixed 1:1 (v/v) with the cell suspensions prepared in a 96-well flat-bottom black plate (see paragraph 16).

© OECD 2018

18. The first test run is aimed to determine the cytotoxic concentration and to examine the skin sensitising potential of chemicals. Using X-VIVO™ 15, serial dilutions of the X-VIVO™ 15 stock solutions of the test chemicals are made at a dilution factor of two (see Appendix V) using a 96-well assay block (e.g. Costar Cat#EW-01729-03). Next, 50 µl/well of diluted solution is added to 50 µl of the cell suspension in a 96-well flat-bottom black plate. Thus for test chemicals that are soluble in X-VIVO ™ 15, the final concentrations of the test chemicals range from 0.002 to 2 mg/mL (Appendix V). For test chemicals that are not soluble in X-VIVO ™ 15 at 20 mg/mL, only dilution factors that range from 2 to 2^{10}, are determined, although the actual final concentrations of the test chemicals remain uncertain and are dependent on the saturated concentration of the test chemicals in the X-VIVO ™ 15 stock solution.

19. In subsequent test runs (i.e. the second, third, and fourth replicates), the X-VIVO™ 15 stock solution is made at the concentration 4 times higher than the concentration of cell viability 05 (CV05; the lowest concentration at which the Inh-GAPLA becomes <0.05) in the first experiment. If Inh-GAPLA does not decrease below 0.05 at the highest concentration in the first run, the X-VIVO™ 15 stock solution is made at the first run highest concentration. The concentration of CV05 is calculated by dividing the concentration of the stock solution in the first run by dilution factor for CV05 (X) (dilution factor CV05 (X); the dilution factor required to dilute stock solution to CV05) (see Appendix V). For test substances not soluble in X-VIVO at 20 mg/ml, CV05 is determined by the concentration of the stock solution x 1/X. For run 2 to 4, a second stock solution is prepared as 4 x CV50 (Appendix V).

20. Serial dilutions of the X-VIVO™ 15 second stock solutions are made at a dilution factor of 1.5 using a 96-well assay block. Next, 50 µl/well of diluted solution is added to 50 µl of the cell suspension in the wells of a 96-well flat-bottom black plate. Each concentration of each test chemical should be tested in 4 wells. The samples are then mixed on a plate shaker and incubated for 16 hours at 37°C and 5% CO_2, after which the luciferase activity is measured as described below.

21. The solvent control is the mixture of 50 µL/well of X-VIVO™ 15 and 50 µL/well of cell suspension in RPMI-1640 containing 10% FBS.

22. The recommended positive control is 4-NBB. 20 mg of 4-NBB is prepared in a 1.5-mL microfuge tube, to which X-VIVO™ 15 is added up to 1 mL. The tube is vortexed vigorously and shaken on a rotor at a maximum speed of 8 rpm for at least 30 min. After centrifugation at 20,000g for 5 min, the supernatant is diluted by a factor of 4 with X-VIVO™ 15, and 500 µl of the diluted supernatant is transferred to a well in a 96-well assay block. The diluted supernatant is further diluted with X-VIVO™ 15 at factors of 2 and 4, and 50 µl of the solution is added to 50 µl of THP-G8 cell suspension in the wells of a 96-well flat-bottom black plate (Appendix VI). Each concentration of the positive control should be tested in 4 wells. The plate is agitated on a plateshaker, and incubated in a CO_2 incubator for 16 hours (37°C, 5% CO_2), after which the luciferase activity is measured as described in paragraph 29.

23. The recommended negative control is LA. 20 mg of LA prepared in a 1.5-mL microfuge tube, to which X-VIVO™ 15 is added up to 1 mL (20 mg/ mL). Twenty mg/mL of LA solution is diluted by a factor of 5 with X-VIVO™ 15 (4 mg/mL); 500 µl of this 4 mg/mL LA solution is transferred to a well of a 96-well assay block. This solution is diluted by a factor of 2 with X-VIVO™ 15 and then diluted again by a factor of 2 to produce 2 mg/mL and 1 mg/mL solutions. 50 µl of these 3 solutions and vehicle control (X-VIVO™ 15) are added to 50 µl of THP-G8 cell suspension in the wells of a 96-well flat-bottom black plate. Each concentration of the negative control is tested in 4 wells. The plate is agitated on a plateshaker and incubated in a CO_2 incubator for 16 hours (37°C, 5% CO_2), after which the luciferase activity is measured as described in paragraph 29.

© OECD 2018

24. Other suitable positive or negative controls may be used if historical data are available to derive comparable run acceptance criteria.

25. Care should be taken to avoid evaporation of volatile test chemicals and cross-contamination between wells by test chemicals, e.g. by sealing the plate prior to the incubation with the test chemicals.

26. The test chemicals and solvent control require 2 to 4 runs to derive a positive or negative prediction (see Table 2). Each run is performed on a different day with fresh X-VIVO™ 15 stock solution of test chemicals and independently harvested cells. Cells may come from the same passage.

Luciferase activity measurements

27. Luminescence is measured using a 96-well microplate luminometer equipped with optical filters, e.g. Phelios (ATTO, Tokyo, Japan), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Germany) and the ARVO series (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The luminometer must be calibrated for each test to ensure reproducibility (19). Recombinant orange and red emitting luciferases are available for this calibration.

28. 100µL of pre-warmed Tripluc® Luciferase assay reagent (Tripluc) is transferred to each well of the plate containing the cell suspension treated with or without chemical. The plate is shaken for 10 min at an ambient temperature of about 20°C. The plate is placed in the luminometer to measure the luciferase activity. Bioluminescence is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F1) of the optical filter. Justification should be provided for the use of alternative settings, e.g. depending on the model of luminometer used.

29. Parameters for each concentration are calculated from the measured values, e.g. IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, the mean ±SD of IL8LA, the mean ±SD of GAPLA, the mean ±SD of nIL8LA, the mean ±SD of Ind-IL8LA, the mean ±SD of Inh-GAPLA, and the 95% confidence interval of Ind-IL8LA. Definitions of the parameters used in this paragraph are provided in Appendices I and IV, respectively.

30. Prior to measurement, colour discrimination in multi-colour reporter assays is generally achieved using detectors (luminometer and plate reader) equipped with optical filters, such as sharp-cut (long-pass or short-pass) filters or band-pass filters. The transmission coefficients of the filters for each bioluminescence signal colour should be calibrated prior to testing, per Appendix II.

© OECD 2018

DATA AND REPORTING

Data evaluation

31. Criteria for a positive/negative decision require that in each run:

- an IL-8 Luc assay prediction is judged positive if a test chemical has a Ind-IL8LA ≥ 1.4 and the lower limit of the 95% confidence interval of Ind-IL8LA ≥ 1.0
- an IL-8 Luc assay prediction is judged negative if a test chemical has a Ind-IL8LA < 1.4 and/or the lower limit of the 95% confidence interval of Ind-IL8LA < 1.0

Prediction model

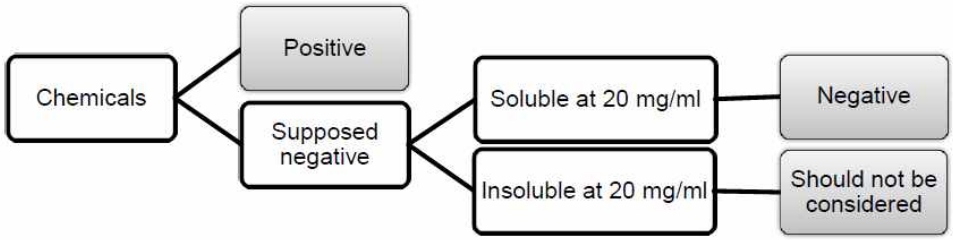
32. Test chemicals that provide two positive results from among the 1st, 2nd, 3rd or 4th runs are identified as positives whereas those that give three negative results from among the 1st, 2nd, 3rd or 4th runs are identified as supposed negative (Table 2). Among supposed negative chemicals, chemicals that are dissolved at 20 mg/ml of X-VOVO™ 15 are judged as negative, while chemicals that are not dissolved at 20 mg/ml of X-VOVO™ 15 should not be considered (Figure 1).

Table 2. Criteria for identifying positive and supposed negative

1st run	2nd run	3rd run	4th run	Final prediction
Positive	Positive	-	-	Positive
	Negative	Positive	-	Positive
		Negative	Positive	Positive
			Negative	Supposed negative
Negative	Positive	Positive	-	Positive
		Negative	Positive	Positive
			Negative	Supposed negative
	Negative	Positive	Positive	Positive
			Negative	Supposed negative
		Negative	-	Supposed negative

© OECD 2018

Figure 1. Prediction model for final judgment



Acceptance criteria

33. The following acceptance criteria should be met when using the IL-8 Luc assay:

- Ind-IL8LA should be more than 5.0 at least in one concentration of the positive control, 4-NBB, in each run.
- Ind-IL8LA should be less than 1.4 at any concentration of the negative control, lactic acid, in each run.
- Data from plates for which the GAPLA of control wells with cells and Tripluc but without chemicals is less than 5 times of that of well containing test medium only (50 µL/well of RPMI-1640 containing 10% FBS and 50 µL/well of X-VIVO™ 15) should be rejected.
- Data from plates for which the Inh-GAPLA of all concentrations of the test or control chemicals is less than 0.05 should be rejected. In this case, the first test should be repeated so the highest final concentration of the repeated test is the lowest final concentration of the previous test.

TEST REPORT

34. The test report should include the following information:

Test chemicals

- Mono-constituent substance:
  - Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
  - Physical appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
  - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;

© OECD 2018

- Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
- Solubility in X-VIVO™ 15. For chemicals that are insoluble in X-VIVO™ 15, whether precipitation or flotation are observed after centrifugation;
- Concentration(s) tested;
- Storage conditions and stability to the extent available;
- Justification for choice of solvent/vehicle for each test chemical if X-VIVO™ 15 has not been used.

- Multi-constituent substance, UVCB and mixture:

- Characterisation as far as possible by e.g. chemical identity (see above), purity, quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available;
- Physical appearance, water solubility, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
- Molecular weight or apparent molecular weight in case of mixtures/polymers of known compositions or other information relevant relevant for the conduct of the study;
- Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
- Solubility in X-VIVO™ 15. For chemicals that are insoluble in X-VIVO™ 15, whether precipitation or flotation are observed after centrifugation;
- Concentration(s) tested;
- Storage conditions and stability to the extent available.
- Justification for choice of solvent/vehicle for each test chemical, if X-VIVO™ 15 has not been used.

Controls

- Positive control:

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

© OECD 2018

- Negative control:

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

Test method conditions

- Name and address of the sponsor, test facility and study director;
- Description of test method used;
- Cell line used, its storage conditions, and source (e.g. the facility from which it was obtained);
- Lot number and origin of FBC, supplier name, lot number of 96-well flat-bottom black plate, and lot number of Tripluc reagent;
- Passage number and cell density used for testing;
- Cell counting method used for seeding prior to testing and measures taken to ensure homogeneous cell number distribution;
- Luminometer used (e.g. model), including instrument settings, luciferase substrate used, and demonstration of appropriate luminescence measurements based on the control test described in Appendix II;
- The procedure used to demonstrate proficiency of the laboratory in performing the test method (e.g. by testing of proficiency substances) or to demonstrate reproducible performance of the test method over time.

Test procedure

- Number of replicates and runs performed;
- Test chemical concentrations, application procedure and exposure time (if different from those recommended);
- Description of evaluation and decision criteria used;
- Description of study acceptance criteria used;
- Description of any modifications of the test procedure.

Results

© OECD 2018

- Measurements of IL8LA and GAPLA;
- Calculations for nIL8LA, Ind-IL8LA, and Inh-GAPLA;
- The 95% confidence interval of Ind-IL8LA;
- A graph depicting dose-response curves for induction of luciferase activity and viability;
- Description of any other relevant observations, if applicable.

Discussion of the results

- Discussion of the results obtained with the IL-8 Luc assay;
- Consideration of the assay results in the context of an IATA, if other relevant information is available.

Conclusion

© OECD 2018

LITERATURE

1. Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. 2011. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

2. OECD (2017), Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No. 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

3. OECD (2017), Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for in vitro skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No. 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

2. OECD (2016), Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No. 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm].

3. van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. 2014. Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

4. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an in vitro test for skin sensitization. Toxicol In Vitro 29:1816-30.

5. Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

6. Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. 2010. A comparative evaluation of in vitro skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals : ATLA 38:275-84.

7. Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, online.

8. Thorne N, Inglese J, and Auld DS. 2010. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

9. OECD (2016), *Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists*, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

© OECD 2018

10. Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. 2001. Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

11. Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. 1999. Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

12. Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. 2005. Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

13. OECD (2017), To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OECD, Paris, France.

14. OECD (2005), Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, France.

15. OECD (2017), Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD%20Draft%20GIVIMP_v05%20-%20clean.pdf].

16. JaCVAM (2016), IL-8 Luc assay protocol, Available at. http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

17. Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. 2010. Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

18. OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris, France.

19. United Nations (2015), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Sixth revised edition. New York & Geneva: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

© OECD 2018

APPENDIX I

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 (16).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sequence of events from the chemical structure of a target chemical or group of similar chemicals through the molecular initiating event to an *in vivo* outcome of interest (20).

CV05: Cell viability 05. Minimum concentration at which chemicals show less than 0.05 of Inh-GAPLA.

FInSLO-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to Ind-IL8LA. See Ind-IL8LA for definition.

GAPLA: Luciferase Activity of Stable Luciferase Red (SLR) (λmax = 630 nm), regulated by GAPDH promoter and demonstrates cell viability and viable cell number.

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

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

II-SLR-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to Inh-GAPLA. See Inh-GAPLA for definition

IL-8 (Interleukin-8): A cytokine derived from endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, macrophages, and monocytes that causes chemotaxis of neutrophils and T-cell lymphocytes.

IL8LA: Luciferase Activity of Stable Luciferase Orange (SLO) (λmax = 580 nm), regulated by IL-8 promoter.

Ind-IL8LA: Fold induction of IL8LA. It is obtained by dividing the nIL8LA of THP-G8 cells treated with chemicals by that of non-stimulated THP-G8 cells and represents the induction of IL-8 promoter activity by chemicals.

Inh-GAPLA: Inhibition of GAPLA. It is obtained by dividing GAPLA of THP-G8 treated with chemicals with GAPLA of non-treated THP-G8 and represents cytotoxicity of chemicals.

Minimum induction threshold (MIT): the lowest concentration at which a chemical satisfies the positive criteria

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

© OECD 2018

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

Multi-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which more than one of the main constituents is present in a concentration ≥ 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.

nIL8LA: The SLO luciferase activity reflecting IL-8 promoter activity (IL8LA) normalised by the SLR luciferase activity reflecting GAPDH promoter activity (GALPA). It represents IL-8 promoter activity after considering cell viability or cell number.

nSLO-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to nIL8LA. See nIL8LA for definition

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

Pre-haptens: Chemicals which become sensitisers through abiotic transformation.

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

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 (16).

Reliability: Measures of the extent that a test method can be performed reproducibly within and between laboratories over time, when performed using the same protocol. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility and intra-laboratory repeatability (16).

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

Sensitivity: The proportion of all positive/active chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (16).

SLO-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to IL8LA. See IL8LA for definition.

SLR-LA: Abbreviation used in the validation report and in previous publications regarding the IL-8 Luc assay to refer to GAPLA. See GAPLA for definition.

Solvent/vehicle control: An untreated sample containing all components of a test system except of the test chemical, but including the solvent/vehicle that is used. It is used to establish the baseline response

© OECD 2018

for the samples treated with the test chemical dissolved or stably dispersed in the same solvent/vehicle. When tested with a concurrent medium control, this sample also demonstrates whether the solvent/vehicle interacts with the test system.

Specificity: The proportion of all negative/inactive chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (16).

Substance: Chemical elements and their compounds in the natural state or obtained by any production process, inducing 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 it composition.

Surfactant: Also called surface-active agent, this is a substance, such as a detergent, that can reduce the surface tension of a liquid and thus allow it to foam or penetrate solids; it is also known as a wetting agent. (TG437)

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

THP-G8: An IL-8 reporter cell line used in IL-8 Luc assay. The human macrophage-like cell line THP-1 was transfected the SLO and SLR luciferase genes under the control of the IL-8 and GAPDH promoters, respectively.

United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (UN GHS): A system proposing the classification of chemicals (substances and mixtures) according to standardised types and levels of physical, health and environmental hazards, and addressing corresponding communication elements, such as pictograms, signal words, hazard statements, precautionary statements and safety data sheets, so that to convey information on their adverse effects with a view to protect people (including employers, workers, transporters, consumers and emergency responders) and the environment (21).

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

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

© OECD 2018

APPENDIX II

PRINCIPLE OF MEASUREMENT OF LUCIFERASE ACTIVITY AND DETERMINATION OF THE TRANSMISSION COEFFICIENTS OF OPTICAL FILTER FOR SLO AND SLR

MultiReporter Assay System -Tripluc- can be used with a microplate-type luminometer with a multi-colour detection system, which can equip an optical filter (e.g. Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)). The optical filter used in measurement is 600–620 nm long or short pass filter, or 600–700 nm band pass filter.

(1) Measurement of two-colour luciferases with an optical filter.
This is an example using Phelios AB-2350 (ATTO). This luminometer is equipped with a 600 nm long pass filter (R60 HOYA Co.), 600 nm LP, Filter 1) for splitting SLO (λmax = 580 nm) and SLR (λmax = 630 nm) luminescence.

To determine transmission coefficients of the 600 nm LP, first, using purified SLO and SLR luciferase enzymes, measure i) the intensity of SLO and SLR bioluminescence intensity without filter (F0), ii) the SLO and SLR bioluminescence intensity that passed through 600 nm LP (Filter 1), and iii) calculate the transmission coefficients of 600 nm LP for SLO and SLR listed below.

Transmission coefficients		Abbreviation	Definition
SLO	Filter 1 Transmission coefficients	$\square O_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLO
SLR	Filter 1 Transmission coefficients	$\square R_{R60}$	The filter's transmission coefficient for the SLR

When the intensity of SLO and SLR in test sample are defined as O and R, respectively, i) the intensity of light without filter (all optical) F0 and ii) the intensity of light that transmits through 600 nm LP (Filter 1) F1 are described as below.

$$F0=O+R$$

$$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$$

These formulas can be rephrased as follows:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Then using calculated transmittance factors (κO_{R60} and κR_{R60}) and measured F0 and F1, you can calculate O and R-value as follows:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

Materials and methods for determining transmittance factor

© OECD 2018

(1) Reagents
· Single purified luciferase enzymes:
Lyophilised purified SLO enzyme
Lyophilised purified SLR enzyme
(which for the validation work were obtained from GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japan with THP-G8 cell line)
· Assay reagent:
Tripluc® Luciferase assay reagent (for example from TOYOBO Cat#MRA-301)
· Medium: for luciferase assay (30 ml, stored at 2 – 8°C)

Reagent	Conc.	Final conc. in medium	Required amount
RPMI-1640	-	-	27 ml
FBS	-	10 %	3 ml

(2) Preparation of enzyme solution
Dissolve lyophilised purified luciferase enzyme in tube by adding 200 µl of 10 ~ 100 mM Tris/HCl or Hepes/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) supplemented with 10% (w/v) glycerol, divide the enzyme solution into 10 µl aliquots in 1.5 ml disposable tubes and store them in a freezer at -80°C. The frozen enzyme solution can be used for up to 6 months. When used, add 1 ml of medium for luciferase assay (RPMI-1640 with 10% FBS) to each tube containing the enzyme solutions (diluted enzyme solution) and keep them on ice to prevent deactivation.

(3) Bioluminescence measurement
Thaw Tripluc® Luciferase assay reagent (Tripluc) and keep it at room temperature either in a water bath or at ambient air temperature. Power on the luminometer 30 min before starting the measurement to allow the photomultiplier to stabilise. Transfer 100 µl of the diluted enzyme solution to a black 96 well plate (flat bottom) (the SLO reference sample to #B1, #B2, #B3, the SLR reference sample to #D1, #D2, #D3). Then, transfer 100 µl of pre-warmed Tripluc to each well of the plate containing the diluted enzyme solution using a pipetman. Shake the plate for 10 min at room temperature (about 25°C) using a plate shaker. Remove bubbles from the solutions in wells if they appear. Place the plate in the luminometer to measure the luciferase activity. Bioluminescence is measured for 3 sec each in the absence (F0) and presence (F1) of the optical filter.

Transmission coefficient of the optical filter was calculated as follows:

Transmission coefficient (SLO (κO_{R60}))= (#B1 of F1+ #B2 of F1+ #B3 of F1) / (#B1 of F0+ #B2 of F0+ #B3 of F0)

Transmission coefficient (SLR (κR_{R60}))= (#D1 of F1+ #D2 of F1+ #D3 of F1) / (#D1 of F0+ #D2 of F0+ #D3 of F0)

Calculated transmittance factors are used for all the measurements executed using the same luminometer.

Quality control of equipment

The procedures described in the IL-8 Luc protocol should be used (18).

.

© OECD 2018

APPENDIX III

PROFICIENCY SUBSTANCES

Prior to routine use of the test method described in this Annex to Test Guideline 442E, laboratories should demonstrate technical proficiency by obtaining the expected IL-8 Luc assay prediction for the 9 substances recommended in Table 1 and by obtaining values that fall within the respective reference range for at least 8 out of the 9 proficiency substances (selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazards). Other selection criteria were that the substances are commercially available, and that high-quality *in vivo* reference data as well as high quality *in vitro* data generated with the IL-8 Luc assay are available. Also, published reference data are available for the IL-8 Luc assay (6) (1).

Table 1: Recommended substances for demonstrating technical proficiency with the IL-8 Luc assay

Proficiency substances	CAS no.	State	Solubility in X-VIVO15 at 20 mg/mL	*In vivo* prediction[1]	IL-8 Luc prediction[2]	Reference range (µg/mL)[3]	
						CV05[4]	IL-8 Luc MIT[5]
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Insoluble	Sensitiser (Extreme)	Positive	2.3-3.9	0.5-2.3
Formaldehyde	50-00-0	Liquid	Soluble	Sensitiser (Strong)	Positive	9-30	4-9
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Solid	Insoluble	Sensitiser (Moderate)	Positive	250-290	60-250
Ethylenediamine	107-15-3	Liquid	Soluble	Sensitiser (Moderate)	Positive	500-700	0.1-0.4
Ethyleneglycol dimethacrylate	97-90-5	Liquid	Insoluble	Sensitiser (Weak)	Positive	>2000	0.04-0.1
4-Allylanisole (Estragol)	140-67-0	Liquid	Insoluble	Sensitiser (Weak)	Positive	>2000	0.01-0.07
Streptomycin sulphate	3810-74-0	Solid	Soluble	Non-sensitiser	Negative	>2000	>2000
Glycerol	56-81-5	Liquid	Soluble	Non-sensitiser	Negative	>2000	>2000
Isopropanol	67-63-0	Liquid	Soluble	Non-sensitiser	Negative	>2000	>2000

Abbreviations: CAS no. = Chemical Abstracts Service Registry Number

[1] The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (19).

[2] Based on historical observed values (1) (6).

[3] CV05 and IL-8 Luc MIT were calculated using water solubility given by EPI Suite™.

[4] CV05: the minimum concentration at which chemicals show less than 0.05 of Inh-GAPLA.

[5] MIT: the lowest concentrations at which a chemical satisfies the positive criteria.

© OECD 2018

APPENDIX IV

INDEXES AND JUDGMENT CRITERIA

nIL8LA (nSLO-LA)

The j-th repetition (j = 1-4) of the i-th concentration (i = 0-11) is measured for IL8LA (SLO-LA) and GAPLA (SLR-LA) respectively. The normalised IL8LA, referred to as nIL8LA (nSLO-LA), and is defined as:

$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij} / GAPLA_{ij}$.

This is the basic unit of measurement in this assay.

Ind-IL8LA (FInSLO-LA)

The fold increase of the averaged nIL8LA (nSLO-LA) for the repetition on the i-th concentration compared with it at the 0 concentration, Ind-IL8LA, is the primary measure of this assay. This ratio is written by the following formula:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{(1/4)\times\sum_j nIL8LA_{ij}\right\} / \left\{(1/4)\times\sum_j nIL8LA_{0j}\right\}.$$

The lead laboratory has proposed that a value of 1.4 corresponds to a positive result for the tested chemical. This value is based on the investigation of the historical data of the lead laboratory. Data management team then used this value through all the phases of validation study. The primary outcome, Ind-IL8LA, is the ratio of 2 arithmetic means as shown in equation.

95% confidence interval (95% CI)

The 95% confidence interval (95% CI) based on the ratio can be estimated to show the precision of this primary outcome measure. The lower limit of the 95% CI ≥ 1 indicates that the nIL8LA with the i-th concentration is significantly greater than that with solvent control. There are several ways to construct the 95% CI. We used the method known as Fieller's theorem in this study. This 95% confidence interval theorem is obtained from the following formula:

$$\left[\frac{-B-\sqrt{B^2-4AC}}{2A}, \frac{-B+\sqrt{B^2-4AC}}{2A}\right],$$

where $A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$, $B = -2\times\bar{x}\times\bar{y}$, $C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(\nu)}^2 \times \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}}$, and $n_0 = 4$,

$\bar{x}_0 = (1/n_0)\times\sum_j nIL8LA_{0j}$, $sd_0^2 = \{1/(n_0-1)\}\times\sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2$,

$n_{y_i} = 4$, $\bar{y}_i = (1/n_{y_i})\times\sum_j (nIL8LA_{ij})$, $sd_{y_i}^2 = \{1/(n_{y_j}-1)\}\times\sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2$.

$t_{0.975(\nu)}$ is 97.5 percentile of the central t distribution with the ν of the degree of freedom, where

© OECD 2018

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}} \right)^2 / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{y_i}^2}{n_{y_i}} \right)^2 / (n_{y_i} - 1) \right\}.$$

Inh-GAPLA (II-SLR-LA)

The Inh-GAPLA is a ratio of the averaged GAPLA (SLR-LA) for the repetition of the i-th concentration compared with that with solvent control, and this is written by

$$\text{Inh-GAPLA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j \text{GAPLA}_{0j} \right\}.$$

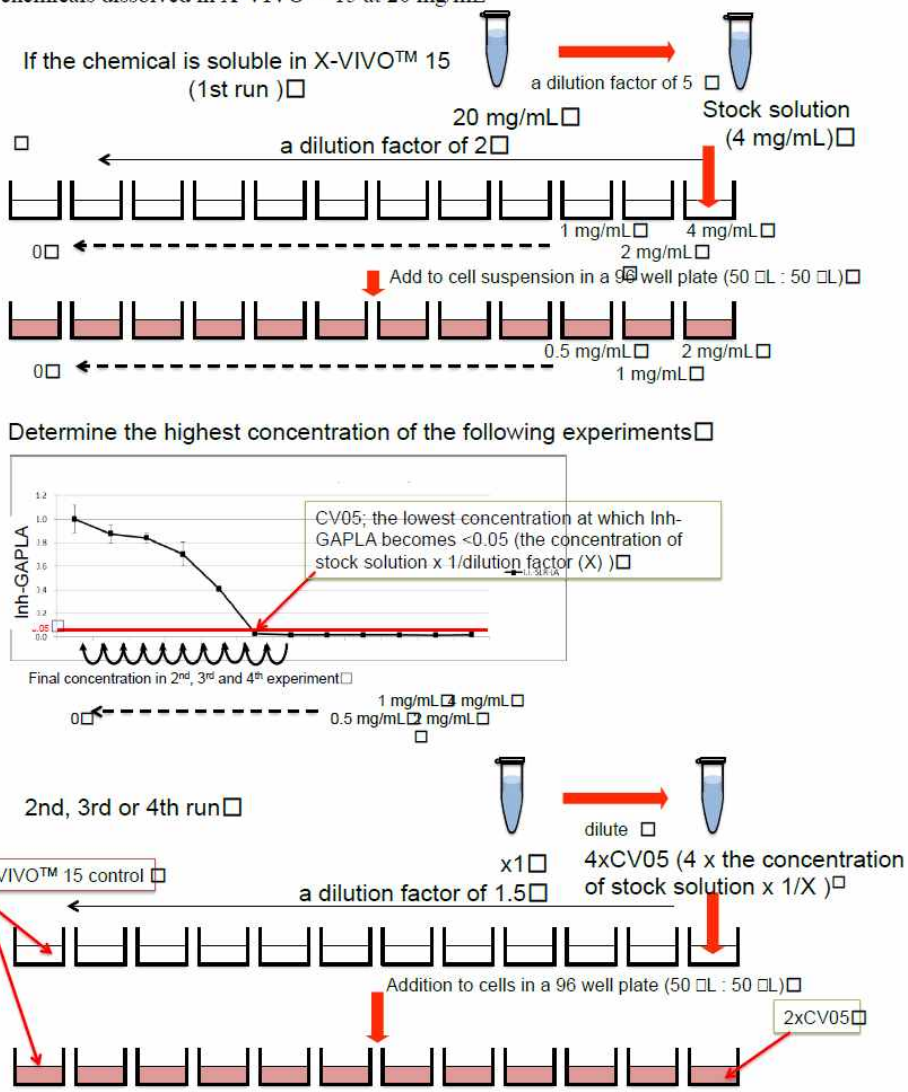
Since the GAPLA is the denominator of the nIL8LA, an extremely small value causes large variation in the nIL8LA. Therefore, Ind-IL8LA values with an extremely small value of Inh-GAPLA (less than 0.05) might be considered poor precision.

© OECD 2018

APPENDIX V

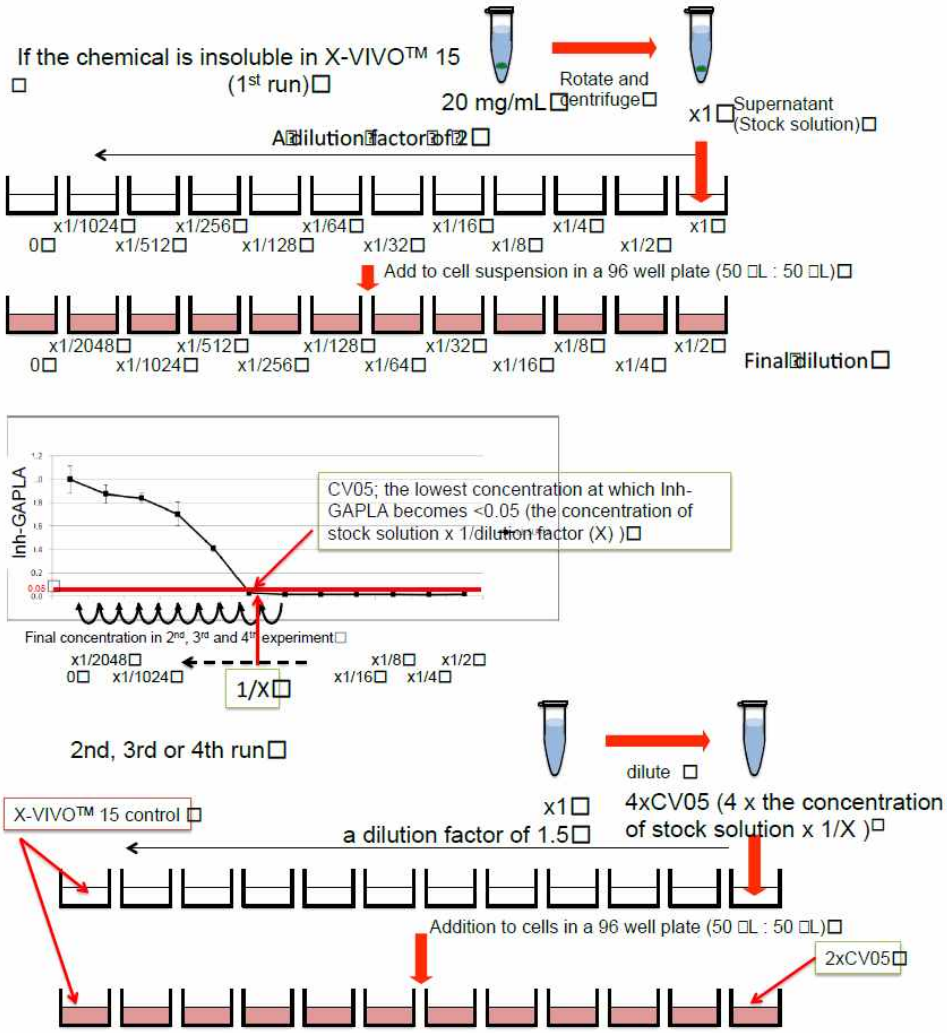
THE SCHEME OF THE METHODS TO DISSOLVE CHEMICALS FOR THE IL-8 LUC ASSAY.

(a) For chemicals dissolved in X-VIVO™ 15 at 20 mg/mL



© OECD 2018

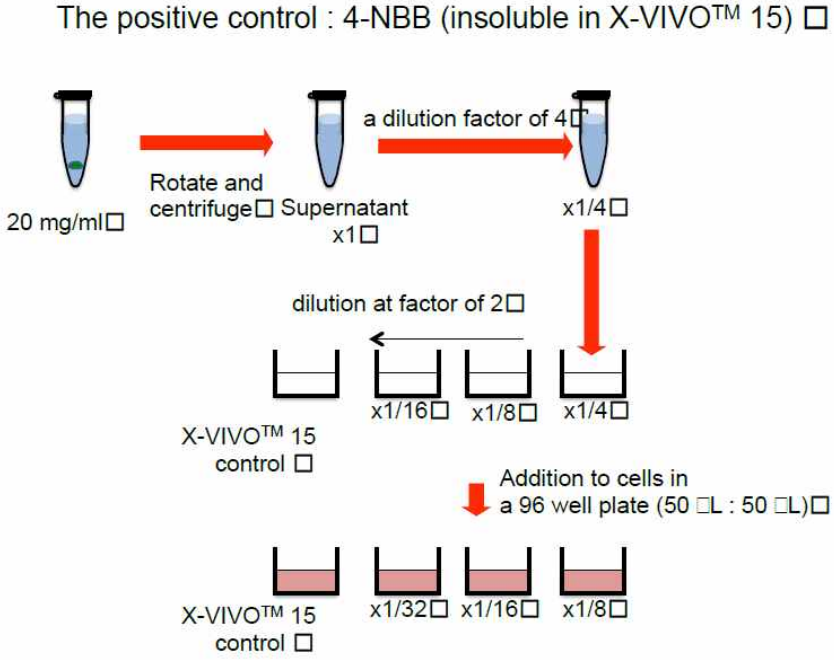
(b) For chemicals insoluble in X-VIVO™ 15 at 20 mg/mL



© OECD 2018

APPENDIX VI

THE SCHEME OF THE METHOD TO DISSOLVE 4-NBB FOR THE POSITIVE CONTROL OF THE IL-8 LUC ASSAY.



© OECD 2018

“화장품 피부감작성 동물대체시험법(IL-8 루시퍼라아제 시험법) 가이드라인(민원인 안내서)”

발 행 일 2021년 9월

발 행 인 식품의약품안전평가원장 서경원

편집위원장 독성평가연구부장 정자영

편 집 위 원 윤혜성, 김광진, 윤소영, 강남희, 이정선, 전혜련, 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, 신변보호조치** 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