

국민 안전이 기준입니다
YOUR SAFETY IS OUR STANDARD

화장품 등 동물대체시험법 가이드라인

ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법(KeratinoSens™)

2024. 3.



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원



Korean Center for the
Validation of Alternative Methods
한국동물대체시험법검증센터

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

| | |
|-----------|--|
| 명칭 | 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법(KeratinoSens™)) 가이드라인(민원인 안내서) |
|-----------|--|

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

| | | |
|---|---|---|
| 등록대상 여부 | <input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까? | <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| | ☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :) | |
| | <input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까? | <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| | <input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까? | <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| | <input type="checkbox"/> 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까? | <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| | <input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까? | <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| | <input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까? | <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| ☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다. | | |
| 지침서 · 안내서 구분 | <input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용) | <input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| | <input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용) | <input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오 |
| 기타 확인 사항 | <input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까? | <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
| | ☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다. | |

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2024년 3월 25일

담당자
 확 인(부서장)

강 남 희
 이 종 권

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

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2024년 3월 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 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서 등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 비임상자원연구과 및 한국동물대체시험법검증센터(KoCVAM)에 문의하시기 바랍니다.
전화번호: 043-719-5502, 5506

제·개정 이력

| 연번 | 제·개정번호 | 승인일자 | 주요내용 |
|----|-------------|----------|---|
| 1 | 안내서-0787-01 | 2017. 9. | 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법(KeratinoSens™)) 가이드라인(민원인 안내서) 제정 |
| 2 | 안내서-1351-01 | 2024. 3. | 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법(KeratinoSens™)) 가이드라인(민원인 안내서) 개정 - 시험법 명칭 일부 수정 및 참고문헌 등 변경 |

목 차

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법(KeratinoSens™))
가이드라인(민원인 안내서)



| | |
|----------------------|-----------|
| I. 요약문 | 1 |
| 1. 개요 | 1 |
| 2. 시험원리 | 2 |
| 3. 제한점 및 고려사항 | 2 |
| 4. 시험방법 | 3 |
| 5. 인정요건 | 6 |
| 6. 시험결과 및 보고 | 7 |
| | |
| II. 번역문 | 11 |
| | |
| III. 원문 | 49 |

I

요약문

1 ▶ 개요

본 시험법은 UN GHS 기준에 따른 피부감작성물질과 비감작성물질을 구별하는 데 사용되는 시험법(ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법(KeratinoSensTM))으로 피부감작성 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 두 번째 핵심 단계(Key Event 2, KE 2)인 각질세포의 활성화에 대한 생체외(*in vitro*) 시험에 해당된다.

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

본 시험법을 일상적으로 사용하는 실험실은 가이드라인(부록 IA의 부속서 1)에서 제시된 10개의 숙련도 물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고, 가이드라인에서 제시하고 있는 시험방법은 크게 두 단계로 나누어져 있다. 첫 번째 단계는 루시퍼라아제 활성을 구하기 위한 단계이며, 두 번째 단계는 세포독성을 평가하는 단계이다. 시험 결과값은 I_{max} 값(시험물질과 양성대조군의 모든 농도에서 측정된 루시퍼라아제 활성 중 최대 유도 배수 평균값), EC_{15} 값(루시퍼라아제 활성이 용매대조군 발광측정값 대비 1.5배 초과하는 시험물질의 농도), 세포생존율이다.

시험 결과는 1) 음성대조군과 통계적으로 유의한 차이가 있는 I_{max} 값이 1.5배 초과, 2) $EC_{1.5}$ 값에서 세포생존율은 70% 이상, 3) $EC_{1.5}$ 값 1,000 μM 미만, 4) 시험물질에 대한 루시퍼라아제 활성화도가 명확한 용량-반응성을 가졌을 때 양성으로 판정한다. 결과 판정은 두 번의 독립적인 반복시험에서 두 번 모두가 양성이면 양성으로 판정하며, 두 번의 반복시험 결과가 일치하지 않을 경우 세 번째 시험을 수행하여 세 번 중 두 번이 양성일 때 양성으로 판정한다.

2 ▶ 시험원리

피부감작성은 각질세포에서 일어나며 염증반응과 항산화/전자친화성 반응요소-의존성 경로 [Antioxidant/electrophile Response Element(ARE)-dependent pathways]와 같이 특정한 세포 신호전달경로와 관련된 유전자 발현의 변화와 생물학적 상관성이 있다고 알려져 있다. 피부감작성물질과 같은 작은 전자친화성 물질은 센서 단백질인 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)에 작용하여 전사인자인 Nrf2를 해리시킨다. 해리된 Nrf2는 핵 내 phase II 해독효소를 코딩하는 유전자와 같은 ARE-의존성 유전자를 활성화시킨다. KeratinoSens™ 시험법은 시험물질을 인체피부각질세포주(HaCaT)에 48시간 동안 노출시킨 후 루시퍼라아제 유전자 발현 변화를 관찰하는 생체외(*in vitro*) 시험법이다. 루시퍼라아제 유전자 발현 수준을 루시퍼라아제 기질을 이용하여 발광측정기(luminometer)로 측정한다. 결과 평가는 감작성물질과 비감작성물질을 구별하기 위해 용매/부형제 대조군과 비교한 시험물질의 루시퍼라아제 유전자 발현의 상대적인 변화를 이용한다.

3 ▶ 제한점 및 고려사항

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

ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법의 실험실 내 및 실험실 간 재현성은 대략 85% 수준이다. 국소립프절시험(LLNA) 결과와 비교하였을 때 피부감작성과 비감작성을 구분하는 정확도는 77% (155/201), 민감도는 78%(71/91), 특이도는 76%(84/110)를 나타낸다. 그리고 본 시험법에서는 Category 1A(강감작성)에 비해 Category 1B(약중감작성)의 경우에는 피부감작성이 낮게 예측되는 경향이 있다. 결론적으로 본 시험법은 피부감작 유해성을 식별하는 데 유용하며, 단일 시험법보다 다른 정보와의 조합을 고려해야 한다.

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

4 ▶ 시험방법

4.1. 세포배양

KeratiNoSens™ 세포는 우태아 혈청과 항생제를 포함한 배양배지를 사용하여 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% CO₂ 배양기에서 배양된다. 세포주를 수령하여 2-4 계대(2-4)하고 균일한 저장용액(stock solution)으로 저장하며, 계대 수는 25 계대를 초과할 수 없다. KeratiNoSens™ 세포는 플레이트에 80~90% 정도 채워지면 세포와 배지를 1:3 - 1:12 (1:3은 2일, 1:6은 3일, 1:12는 4일 정도 소요)비율로 재계대한다. 채취한(harvested) 세포는 시험 전날 4개의 96-well 플레이트에 well 당 10,000 세포를 분주한다.

4.2. 시험물질 및 대조군 조제

시험물질은 DMSO(Dimethyl sulfoxide, CAS No. 67-68-5)에 최종 농도 200 mM로 녹인다. 시험물질이 DMSO에 용해되지 않는 경우 멸균수 또는 배양배지를 사용한다. 분자량(MW)이 정의되지 않은 시험물질의 경우 저장용액(stock solution)을 40 mg/mL 또는 4% (w/v) 농도로 준비한다. 시험물질의 저장용액(stock solution)을 DMSO로 연속 희석하여 0.098~200 mM까지 12개의 초기 희석단계(master) 농도를 만든다. 사용한 용매와 상관없이 초기 희석단계 농도는 혈청을 함유한 배양배지로 25배 더 희석하고, 최종적으로 4배 더 희석됨으로써 시험물질의 최종 농도는 0.98~2,000 μM이 된다. 시험법에 사용된 용매대조군은 DMSO로 플레이트 당 6개의 well을 준비하며, 초기 희석단계 농도와 동일한 희석과정을 거친 최종 용매대조군의 DMSO 농도는 1%이다. 양성대조군 cinnamic aldehyde(CAS No. 14371-10-9)는 DMSO에 녹여 6.4 mM의 저장용액 (stock solution)을 만들고 연속적으로 희석하여 0.4~6.4 mM까지 5개의 초기 희석단계 농도를 제조한다. 마스터 농도는 시험물질과 동일하게 희석하여 양성대조군의 최종 농도가 4~64 μM이 된다. (그림 1, 2)

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

그림 1. 100 x DMSO 마스터 플레이트(mM)

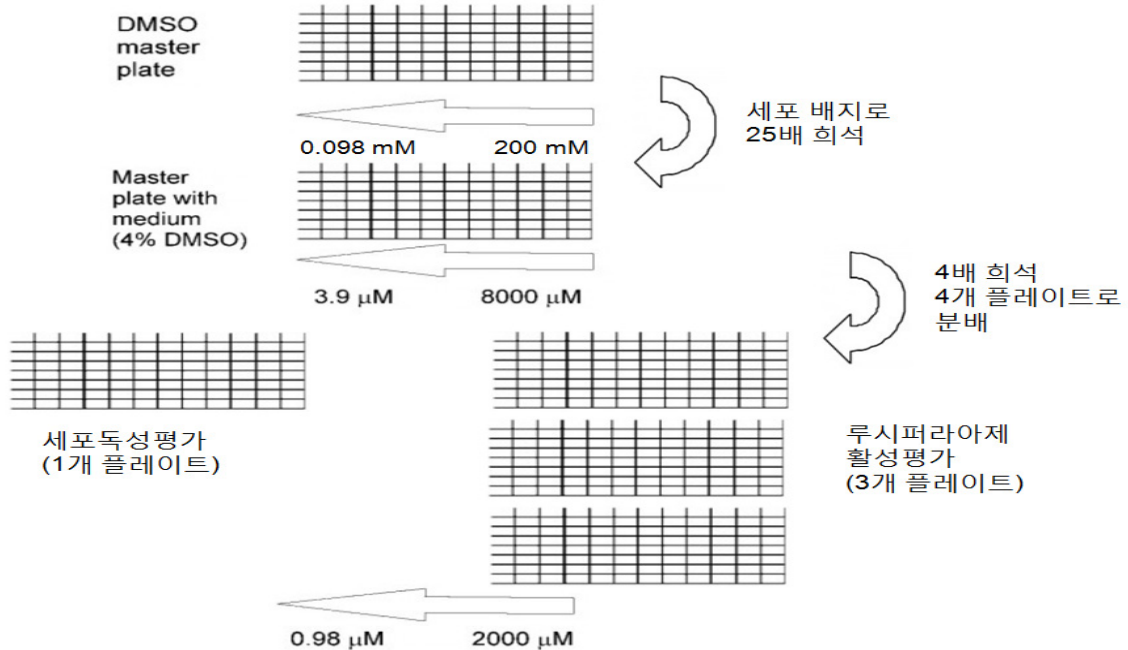


그림 2. 루시퍼라아제 활성 및 세포독성평가 플레이트 모식도
(마스터 플레이트 준비 및 희석 과정)

4.3. 시험물질 및 대조물질 적용

각 시험물질과 양성대조물질의 예측(양성 또는 음성)을 위해 한 번의 시험이 필요하며, 매회 3개의 반복시료(three replicate)를 포함한 최소한 두 번의 독립적인 반복시험이 필요하다($n=6$). 두 번의 독립적인 반복시험의 결과가 불일치하면 3개의 반복시료(triplicate)를 포함한 세 번째 반복시험을 해야 한다($n=9$). 각각의 독립적인 반복시험은 다른 날에 수행하고 그때마다 시험물질의 저장용액(stock solution)을 새로 만들고 세포도 새로 채취해야 한다. 그러나 같은 계대수의 세포를 사용할 수 있다.

세포를 96-well 플레이트에 분주한 다음 24시간 배양한다. 배지를 제거하고 새로운 배양매지 (KeratinoSens™ 시험법에서 항생제를 포함하지 않고 혈청을 포함하는 배양매지 150 μL)로 교환 후 25배 희석한 시험물질 또는 대조물질 50 μL를 첨가한다. 플레이트 당 배경값(background values)을 평가하기 위해 적어도 1개의 플레이트 당 1개의 well은 비워둔다(무세포이며 시험물질 무처리). KeratinoSens™ 시험법에서 처리한 플레이트는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양한다. 시험물질을 배양하기 전에 휘발성 시험물질의 증발과 well 간 교차오염이 일어나지 않도록 주의한다.

4.4. 루시퍼라아제 활성 측정

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

4.5. 세포독성 측정

세포생존율(cell viability, CV) 분석을 위해 시험물질과 대조군을 포함한 배지에 48시간 노출시킨 후, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1)를 포함한 새 배지로 교환하고, 세포를 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 4시간 배양한다. MTT 배지를 제거하고 각 well에 10% SDS 용액을 첨가하여 세포를 하루 동안 용해한다. 교반한 후 광도계로 600 nm에서 흡광도를 측정한다.

5 ▶ 인정요건

KeratinoSens™ 시험법은 다음의 인정요건을 충족하여야 한다.

- 5.1. 양성대조군의 루시퍼라아제 활성 유도는 최소한 시험농도(4~64 μM) 중 하나에서 루시퍼라아제 활성이 용매대조군 발광 측정값 대비 1.5배 높은 값을 보이며, 통계적으로 유의성이 있어야 한다.
- 5.2. 양성대조군의 $\text{EC}_{1.5}$ 값은 시험기관이 과거로부터 수행해온 데이터 평균값 기준으로 표준편차 2배 이내(2SD)에 들어야 한다. 또한 64 μM 농도의 cinnamic aldehyde에 대한 3번의 동일시료 측정의 평균 루시퍼라아제 활성 유도 비율은 2~8이어야 한다. 후자의 조건이 충족되지 않는 경우, cinnamic aldehyde의 농도 증가에 따라 루시퍼라아제 활성 유도의 상승을 볼 수 있다는 명확한 용량반응이 인정되는 경우에 한하여, 시험결과를 수용할 수 있다.
- 5.3. 각각 6개의 well로 구성된 3번의 시험에서 용매대조군의 발광 측정값 변동계수 평균은 20% 미만이어야 한다.

6 ▶ 시험결과 및 보고

6.1. 결과의 처리

KeratinoSens™ 시험법의 결과값 계산은 I_{\max} 값, $EC_{1.5}$ 값, IC_{50} 및 IC_{30} 을 이용하며 다음 등식에 따라 계산할 수 있다.

6.1.1. 루시퍼라아제 활성의 유도배수

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

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

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

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

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

6.1.2. 루시퍼라아제 활성을 용매대조군 발광 측정값보다 1.5배 초과하는 시험물질의 농도 : $EC_{1.5}$ 값

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

C_a : 1.5배 초과하는 유도를 가진 최저 농도 (μM)

C_b : 1.5배 미만의 유도를 가진 최고 농도 (μM)

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

I_b : 1.5배 미만의 유도를 가진 최고 농도에서 측정한 유도 배수 (3개 well의 평균)

6.1.3. 세포생존율

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.2. 결과의 해석 및 예측 모델

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

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

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

6.2.3. $EC_{1.5}$ 값이 1,000 μM 보다 적다.

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

※ 참고문헌

KeratinoSens™ 시험법의 결과는 DB 프로토콜 155번에 제시된 엑셀 템플릿을 사용하여 계산이 가능하다.

- DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™, 17pp.
 웹주소: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/]

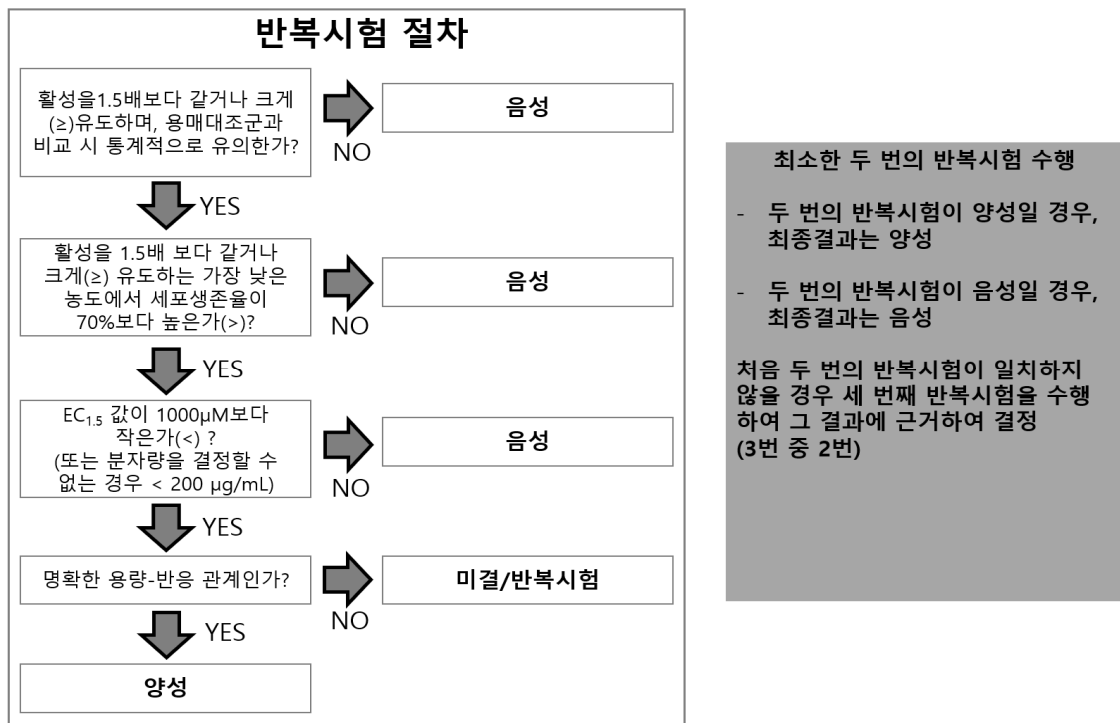


그림 3. KeratinoSens™ 시험법 예측 모델

II

번역문(OECD TG442D 서론)

생체의 피부감작성 : ARE-Nrf2 루시퍼라아제 KeratinoSens™*In Vitro* Skin Sensitisation: The ARE-Nrf2 Luciferase
KeratinoSens™ Test

핵심단계 기반 각질세포 활성화

1. 피부감작성물질이란 UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템 (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS)⁽¹⁾에 정의된 바와 같이 반복적 피부 접촉 후 알레르기 반응을 유도하는 물질을 일컫는다. 피부감작에 관여하는 주요한 생물학적 기전에 대해서 합의된 견해가 있다. 피부감작과 관련된 화학적/생물학적 기전은 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)⁽²⁾를 통해 설명될 수 있으며 AOP는 분자 수준의 시작 단계에서 중간 단계를 거쳐 알레르기성 접촉 피부염을 유발하는 건강유해영향 과정으로 이루어진다. 이러한 AOP는 유기화학물질과 같은 티올(thiol, 시스테인) 및 1차 아민(amine, 라이신)과 반응하는 화학물질에 초점을 맞추고 있다. 이와 관련하여, 분자 수준의 시작 단계인 첫 번째 핵심 단계(Key Event 1, KE 1)는 피부 단백질의 친핵성 중심(nucleophilic centres)에 전자친화성 물질(small electrophilic substances)들이 공유 결합을 하는 것이다. 두 번째 핵심 단계(Key Event 2, KE 2)는 각질세포에서 염증반응과 항산화/전자친화성 반응요소-의존성 경로(antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways)와 같은 세포 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화를 포함한다. 세 번째 핵심 단계(Key event 3, KE 3)는 일반적으로 특정 세포 표면 표지자(surface markers), 케모카인(chemokines), 싸이토카인(cytokines)의 발현을 확인하는 수지상세포(Dendritic Cells, DC)의 활성화이다. 네 번째 핵심 단계(Key event 4, KE 4)는 T-세포 증식이다⁽³⁾.

2. 본 시험법은 피부 감작성 AOP의 KE 2인 각질세포 활성화(keratinocyte activation)⁽²⁾에 대한 생체외(*in vitro*) 시험에 해당된다. 본 시험법은 UN GHS⁽¹⁾에 따라 피부감작성물질과 비감작성물질을 구별하는 데 사용되는 두 개의 시험법으로 이루어진다.
 - ARE-Nrf2 루시퍼라아제 KeratinoSens™ 시험법 (부록 IA)
 - ARE-Nrf2 루시퍼라아제 LuSens 시험법 (부록 IB).
3. 이 두 개의 ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법은 과학적으로 검증되었다. KeratinoSens™ 시험법은 검증연구를 거쳐 EURL ECVAM 과학 자문위원회(ESAC)의 독립적인 전문평가와 EURL ECVAM의 긍정적인 추천을 받았으며, 검증된 참고 시험법(VRM)으로 승인되었다⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾. LuSens 시험법은 유사시험법평가기준(Performance Standards, PS) 기반 검증연구를 거친 후 KeratinoSens™와 마찬가지로 ESAC⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾의 전문평가와 긍정적인 의견을 받았다.
4. 본 가이드라인의 시험법은 데이터 생산 과정과 결과 양식은 다를 수 있지만, 피부감작성 AOP의 핵심단계인 각질세포 활성화는 각 국가의 필요한 부분을 기술하기 위해 구분 없이 사용할 수 있기 때문에 데이터 상호인정(Mutual Acceptance of Data, MAD)이 가능하다.

핵심 단계 기반 시험법 가이드라인에 포함된 시험법의 배경 및 원리

5. 피부감작성의 평가는 일반적으로 동물 실험을 수반한다. 기니픽을 사용하는 고전적 방법인 Magnuson, Kligman의 기니픽 극대화 시험(Guinea Pig Maximisation Test, GPMT) 및 Buehler 시험(OECD TG406)⁽¹¹⁾은 피부감작성의 유도기(induction phase) 및 유발기(elicitation phase)를 평가한다. 마우스를 이용한 시험법인 LLNA(OECD TG429)⁽¹²⁾와 세 개의 비방사능 시험법인 LLNA: DA(OECD TG442A)⁽¹³⁾, BrdU-ELISA 및 BrdU-FCM (OECD TG442B)⁽¹⁴⁾은 모두 유도 반응만을 평가하며 피부감작성 유도기에 대해 객관적으로 측정할 수 있으며 동물 복지 측면에서도 기니픽 시험에 비해 장점이 있기 때문에 받아들여졌다.
6. 피부감작성 AOP의 세 가지 핵심 단계를 다루는 기전에 근거한 화학적(*in chemico*) 시험법과 생체외(*in vitro*) 시험법은 화학 물질의 피부감작성 위험성 평가를 위해 채택되었다: OECD TG442C는 KE 1을 다루는 「펩타이드 반응성 시험법」(Direct Peptide Reactivity Assay)⁽¹⁵⁾이며, 본 시험법 가이드라인은 KE 2를 다루는 각질세포 활성화를 평가하는 시험법이고, OECD TG442E는 KE 3인 수지상 세포의 활성화를 다루고 있다⁽¹⁶⁾. 마지막으로, T-세포 증식을

나타내는 KE 4는 마우스를 이용한 국소 림프절 시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)⁽¹²⁾을 통해 간접적으로 평가된다.

7. 각질세포 활성화는 피부감작성 AOP⁽²⁾⁽¹⁷⁾의 여러 핵심 단계 중 하나의 단계이기 때문에 화학물질의 피부감작성 여부를 결론 내리기에 충분하지 않을 수 있다. 따라서 본 가이드라인에 설명된 시험법의 결과는 다른 보완적인 정보들, 예를 들어 다른 핵심 단계들을 다루는 생체외(*in vitro*) 시험법과 비시험법(non-testing methods)(유사한 화학물질과의 상관성방식(Read-across)을 포함)으로 얻은 결과들과 조합하여 통합시험평가접근법(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) 내에서 사용될 때 피부감작성(UN GHS Category 1)과 비감작성을 구별할 수 있다⁽¹⁷⁾. Defined Approach(DA) 정보소스와 예측 절차에 있어 표준화된 접근법 내에서 이러한 방법에 의해 생성된 결과들의 활용 예가 보고되었으며⁽¹⁷⁾, 이는 IATA 내 유용한 요소로 활용될 수 있다.
8. 본 가이드라인에서 설명된 시험법만으로는 피부감작성물질을 UN GHS⁽¹⁾ 규정에 의한 1A와 1B로 하위 분류할 수 없으며, 안전성 평가에 필요한 감작성을 예측하는 용도로 사용할 수 없다. 그러나 규제 체계에 따라, 본 시험법의 양성결과 자체만으로 UN GHS category 1로 분류할 수 있다.
9. 본 가이드라인에서 "시험물질(test chemical)" 용어는 시험대상을 의미하며¹⁾, 단일성분물질, 다성분물질 및/또는 혼합물 시험에 대한 시험법의 적용 가능성과는 관련이 없다. 시험을 수행할 때는 시험물질이 배지에 용해되거나 적어도 안정한 현탁액(예: 육안으로 볼 때, 배지에 최대 시험 농도로 용해 시 용해/조제된 시험물질의 잔류물이 남아 있지 않고 시험용액을 수 시간 방치하였을 때 침전 또는 층 분리가 일어나지 않는 상태)을 형성하는지 확인해야 한다.
10. 현재 다성분물질/혼합물⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾에 대한 시험법 적용 가능성에 대한 정보는 제한적이다. 비록 검증연구에서 평가되지는 않았지만, 본 시험법은 기술적인 면에서 다성분물질 및 혼합물을 시험하는 데 적용될 수 있을 것이다. 한편 혼합물, 시험이 어려운 화학 물질(예: 불안정) 또는 본 가이드라인에서 설명된 적용 범위 내에 명확히 해당되지 않는 시험물질로

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

시험을 수행할 때는 해당 시험 결과가 과학적으로 의미 있는 결과를 줄 수 있는지에 대한 여부를 사전에 검토해야 한다. 또한, 다성분물질 또는 혼합물을 시험할 경우 시험물질 내 세포독성 성분의 간섭영향 가능성을 고려해야 한다(예: 비감작성 성분의 함량이 높으면, 약한 감작성 성분 또는 저농도의 감작성 성분의 세포독성 반응이 가려질 수도 있음). 특정 경우에 따라, 주요 단일성분이 분획을 주로 구성하거나 혼합물이 여러 분획을 구성하는 경우 복합 혼합물(complex mixture)의 감작성을 평가하는 것이 과학적으로 타당할 수 있다.

참고문헌

1. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
2. United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
3. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
4. Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
5. Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
6. Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.
7. EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation].

8. Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eltze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro* 28, 1482-1497.
9. Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burleson F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* 32, 278-286.
10. ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf].
11. OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-NrF2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
12. OECD (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
13. OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitization: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
14. OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
15. OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].

16. OECD (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
17. OECD (2017). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on Activation of Dendritic Cells. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
18. OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: 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, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].
19. Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSensTM assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
20. Kolle, S.N., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2013). Alternative method in practice: Post-validation experience of the skin sensitization in vitro test strategy. *Toxicology Letters* 221, S204.
21. Settivari RS, Gehen SC, Amado RA, Visconti NR, Boverhof DR, Carney EW (2015). Application of the KeratinoSensTM assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. *Regul Toxicol Pharmacol*: 72(2):350-60.

부속서 1. 용어 정의

정확도(Accuracy): 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도로, 시험법 성과를 측정하는 기준이자 상관성(relevance)의 요소에 해당됨. 시험결과의 정확도를 의미하는 “일치성(concordance)”과 같은 의미로 혼용되어 사용⁽³⁾

독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway): 표적 화학물질 또는 유사한 그룹의 화학구조로부터 분자 수준의 시작 단계를 거쳐 생체외(*in vitro*) 유해 반응을 일으키기까지 일련의 과정⁽²⁾

항산화 반응요소(ARE, Antioxidant Response Element): 전자친화 반응요소(EpRE, electrophile response element)로도 불리며, 세포보호 및 phase II 유전자 상류 프로모터 부위(upstream promoter region)에 있는 반응요소. Nrf2에 의하여 활성화되면 항산화 반응요소(ARE)는 이들 유전자의 전사 유도를 일으킴

CV(Cell viability): 세포생존율

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

CV₇₅: 75%의 세포생존율을 나타내는 추정 농도

EC_{1.5} 값: 1.5배 루시퍼라아제 활성 유도를 나타내는 추정 농도

Fold luciferase activity induction: 시험물질의 용매/부형제 대조군에 노출된 세포 발광도에 대하여 시험물질을 처리한 세포의 발광도 비율

IC₃₀: 세포생존율을 30% 감소시키는 농도

IC₅₀: 세포생존율을 50% 감소시키는 농도

유해성(Hazard): 생체, 생태계, 특정 집단이 화학물질에 노출되었을 때, 유해한 영향을 일으킬 가능성이 있는 물질 또는 환경의 내재적 특성

통합시험평가접근법(IATA, Integrated Approach to Testing and Assessment): 화학물질 또는 화학물질 그룹의 위험성 확인(유해 가능 여부), 위험성 결정(효력 정도) 및/또는 안전성 평가(가능 여부/효력 정도, 노출)에 사용하는 구조적 접근 방법. 잠재적인 유해성(hazard) 또는 위해성(risk) 또는 심화 추적 필요성에 관한 규제결정을 위하여 모든 관련 데이터들을 전략적으로 통합하고 경증을 가림으로써 최소한의 시험만 수행하도록 함

I_{max} 값: 특정 시험물질 농도에서 용매 대조군과 비교하여 루시퍼라아제 활성 유도 최대치

Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1): Nrf2 활성을 조절하는 감지 단백질(sensor protein). 활성 유도가 되지 않은 상태에서 Keap1 감지 단백질(sensor protein)은 Nrf2 전사인자에 ubiquitin 표지를 매개하고 proteasome에서 단백 분해함. Keap1의 반응성 시스테인 잔기가 저분자 물질에 의해 공유결합 변형되어 Nrf2가 Keap1으로부터 분리됨⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

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

단일성분물질(Mono-constituent substance): 정량적 구성에 따라 하나의 주요성분이 최소 80%(w/w) 이상으로 존재하는 물질

다성분물질(Multi-constituent substance): 정량적 구성에 따라 두 가지 이상의 주요성분이 10%(w/w) 이상, 80%(w/w) 미만의 농도로 존재하는 물질. 다성분 물질은 제조 과정의 산물임. 혼합물과 다성분 물질의 차이는 혼합물의 경우 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 혼합하여 얻게 되며, 다성분 물질은 화학반응의 산물임

음성대조군(Negative control): 시험계의 모든 구성 요소를 포함하고 양성반응을 유도하지 않는 것으로 알려진 물질로 처리된 시료. 이 시료는 시험물질 처리 시료 및 기타 대조군 시료와 함께 사용됨

Nrf2(nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2): nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2는 항산화 반응 경로에 관여하는 전사 인자. Nrf2가 ubiquitin 표지되지 않으면 세포질에 많아지고, 핵으로 이동하여 많은 세포보호 유전자의 상류 프로모터 부위(upstream promoter region)의 ARE에 결합하고 이들 유전자의 전사를 유도함⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

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

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

양성대조군(Positive control): 시험계의 모든 구성성분을 포함하며 시험계에서 양성반응을 일으킨다고 알려진 물질로 처리한 샘플. 시험물질 및 다른 대조물질과 같이 시험됨. 시간에 따른 양성대조군 반응의 변동성을 평가할 수 있도록 양성 반응의 정도가 과하지 않아야 함

숙련도 물질(Proficiency chemicals or substances): 표준화된 시험법으로 기술적인 능력을 입증하기 위해 실험실에서 사용할 수 있는 유사 시험법 평가 기준에 포함된 참고물질. 이 물질의 선택 기준은 일반적으로 반응 범위를 대표한다는 것과 시중에서 구할 수 있는 것, 그리고 고품질의 유용한 시험자료가 있는 것

참고물질(Reference chemicals or substances): 새로운 시험법이 검증된 참고 시험법으로 증명된 허용 기준 충족 여부를 입증하는 데 사용되는 화학물질 집합. 이 화학물질은 시험법이 사용될 것으로 예상되는 화학물질의 부류를 대표해야 하며 화학물질이 일으킬 것으로 예상되는 반응의 모든 범위(강, 약, 음성)를 나타내야 함

상관성(Relevance): 시험법과 원하는 결과 사이의 관계 및 해당 시험법이 특정 목적에 있어 유의미하며 유용한지에 관한 설명. 상관성은 시험법이 원하는 생물학적 영향을 올바르게 측정하고 예측하는 정도를 나타냄. 상관성은 시험법의 정확성(일치도)을 내포함⁽³⁾

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 시행하였을 때 시간이 지나도 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험법을 재현할 수 있는 정도의 측정값. 신뢰도는 실험실 내/실험실 간 재현성(reproducibility) 및 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가됨⁽³⁾

재현성(Reproducibility): 동일한 시험방법에 따라 동일한 시험물질에 대한 반복 시험으로 얻은 결과 간의 일치도(“신뢰도”에 대한 정의 참고)⁽³⁾

민감도(Sensitivity): 시험법으로 모든 양성/활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 시험법 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항⁽³⁾

용매/부형제 대조군 (Solvent/vehicle control): 용매 등 시험계의 모든 구성요소를 포함하지만 시험물질은 처리하지 않는 군을 말하며 동일한 용매에 녹인 시험물질로 처리한 시료의 기본반응(baseline response)을 평가하기 위해 사용

특이도(Specificity): 시험법으로 모든 음성/비활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 특이도는 범주 결정에 대한 시험법 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항⁽³⁾

물질(Substance): 생산 과정을 통해 얻어지거나 또는 자연 상태로 얻어진 화학원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는 데 필요한 첨가제와 생산 과정에서 유래하는 불순물을 포함하지만, 해당 물질의 안정성이나 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외함⁽¹⁾

시험물질(Test chemical): “시험물질”이라는 용어는 시험법에서 평가되는 화학물질을 지칭하는 데 사용됨

UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템 (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS): 표준화된 물리적, 보건적, 환경적 유해성의 유형 및 수준에 따라 화학물질(단일물질 및 혼합물)의 분류를 제안하고, 그림문자(pictogram), 신호어(signal word), 유해위험문구(hazard statement), 예방조치문구(precautionary statement) 및 안전보건자료(safety data sheet) 등과 같은 화학물질의 유해성에 상응하는 소통 방식을 다루는 체계임. 이를 통해 사람(고용주, 근로자, 운송자, 소비자, 응급처치자 등)과 환경을 보호하는 관점에서 화학물질의 독성(adverse effect)에 대한 정보를 전달할 수 있음⁽¹⁾

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

검증된 참고 시험법(Validated Reference Method, VRM): 과학적으로 유효한 것으로 승인되고 유사 시험법으로 검증연구를 위한 참고 자료로 사용되는 첫 번째 시험법

검증된 시험법(Validated test method): 특정 목적에 대한 상관성(정확도 포함) 및 신뢰성 결정을 위한 검증연구가 완료된 시험법. 검증된 시험법이 제안된 목적에서 허용되는 것으로 간주되는 정확도와 신뢰성 측면에서 충분한 성능(performance)를 보이지 않을 수 있다는 것에 주의해야 함⁽³⁾

Xeno-free: 사용된 세포와 동일한 종(이 경우에는 인간)에서 유래하지 않은 어떤 물질도 포함하지 않음

참고문헌

1. United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
2. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
3. OECD (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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
5. Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
6. Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.

부록 IA: 생체의 피부감작성 : ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법

In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method

초기 고려사항, 적용 및 제한점

1. 시험법 가이드라인 442D의 본 부록에서 설명하는 시험법은 피부감작성 AOP⁽¹⁾의 KE 2, 즉 각질세포에서 Nrf2 매개 항산화 반응 요소(Antioxidant Response Element, ARE) 의존성 유전자의 활성화를 루시퍼라아제 발현으로 평가하는 시험법이다. 피부감작성물질은 ARE에 의해 조절되는 유전자를 유도한다고 보고되었다⁽²⁾⁽³⁾. 피부감작성물질과 같은 저분자 전자친화성 물질(small electrophilic substances)은 감지 단백질(sensor protein)인 Keap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)에 작용하여(예를 들어 시스테인 잔기의 공유결합적 변형) 전사인자인 Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2)로부터 해리시킨다. 해리된 Nrf2는 핵 내 phase II 해독효소를 코딩하는 유전자와 같은 ARE-의존성 유전자를 활성화시킨다⁽²⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾.
2. 현재, 본 시험법 가이드라인에서 다룬 생체의(*in vitro*) ARE-Nrf2 루시퍼라아제 KeratinoSens™ 시험법(이하 KeratinoSens™ 시험법이라고 부름)은 유럽 동물대체시험법 검증센터(European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, EURL ECVAM)의 독립적인 전문평가⁽⁸⁾를 거쳤으며, 그 후 검증연구⁽³⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾도 수행되었다. KeratinoSens™ 시험법은 IATA의 한 요소로 활용되어 과학적 타당성을 보여주었으며, 이에 따라 본 시험법은 유해성 확인을 위한 목적으로 피부감작성물질과 비감작성물질을 분류하는 데 활용 가능하다⁽⁸⁾.
3. 본 시험법의 독립적인 전문평가에 사용된 검증연구 및 본 시험법을 개발한 실험실에서 얻어진 데이터세트에 근거하면, KeratinoSens™ 시험법은 세포 배양 기술을 갖춘 실험실에 전수 가능하다고 확인되었다⁽⁸⁾. 본 시험법으로 예측할 수 있는 실험실 내 재현가능성과 실험실 간의 재현가능성은 대략 85% 수준이다⁽⁸⁾. 본 시험의 평가 및 독립적인 전문평가로 EURL ECVAM에 제출된 모든 데이터에 따르면, LLNA 결과와 비교 시 KeratinoSens™에 의한 피부감작성물질(UN GHS Category 1)과 비감작성물질을 식별하는 정확도는 77%(155/201), 민감도는 78%(71/91), 특이도는 76%(84/110)이었다⁽⁸⁾. 이 수치는 145개의 시험물질을 대상으로 한 실험실 내 시험 결과(정확도 77%, 민감도 79%, 특이도 72%)와 유사하였다⁽⁷⁾. 이러한 정보는 KeratinoSens™ 시험법이 피부감작성 유해성을 식별하는 데 기여할 수 있음을

나타낸다. 그러나 본 시험법은 일반적 개요의 7, 8항에 따라서 DA 또는 IATA 맥락에서 다른 정보와 조합되어 사용되어야 하기 때문에, 독립적(stand-alone) 시험법인 KeratinoSens™ 시험법의 정확도 값은 단순 지표에 불과하다. 또한, 피부감작성을 비동물 시험법으로 평가할 때, 다른 동물 시험뿐만 아니라 LLNA 시험법도 인체에 미치는 영향을 완전히 반영하지 못한다는 것을 염두에 두어야 한다.

4. 현재 이용 가능한 데이터에 따르면 KeratinoSens™ 시험법은 다양한 유기 작용기, 반응기전, 피부감작능(생체내(*in vivo*) 시험에서 확인한 바와 같이), 물리화학적 성질을 가지는 시험물질에 적용할 수 있다⁽³⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾. 본 시험법은 가용성이거나 배지에서 안정하게 현탁(용매로부터 시험물질이 침전되거나 층이 분리되지 않는 콜로이드 또는 현탁액)되는 시험물질에 적용할 수 있다. 최종 최고 농도 2,000 μM 에서 이러한 조건을 충족하지 못하는 시험물질은 더 낮은 농도에서 시험할 수 있다. 그러한 경우, 양성 기준을 충족하는 결과는 시험물질을 피부감작성물질로 구별하는 데 이용할 수 있다. 해당 시험에서 최대 농도 1,000 μM 미만에서 시험을 실시하고 그 최대 농도에서 세포독성이 없는 음성결과는 미결로 간주한다(32항의 예측 모델 참조). 만약 시험물질 1,000 μM 미만의 최대 용해성 농도에서 세포독성(< 70% 생존율)이 관찰되면 음성 기준을 적용할 수 있다. 일반적으로 7 이상의 LogP를 갖는 단일 성분 물질은 배지에서 불용성일 수 있으나 가용성 또는 안정한 현탁 상태를 확인할 수 있는 자료가 있다면 시험을 계속 수행할 수 있다.
5. Keap1-Nrf2-ARE 경로의 활성화를 유도하는 주요 기전이 Keap1의 친핵성 티올(cysteine sulfhydryl 그룹)과 관련된 스트레스 인자의 전자친화성 반응인 것으로 나타나기 때문에 라이신-잔기에만 반응성을 보이는 물질은 본 시험법에서 음성으로 나올 수 있으므로 음성 결과는 주의깊게 해석해야 한다. 펩타이드 반응성 분석에서 얻은 정보는 이러한 불확실성(특히 시스테인과 라이신 반응성을 구별할 수 있음)을 해결하는 데 도움이 될 수 있다. 또한, 사용된 세포주의 제한된 대사 능력⁽¹⁰⁾ 및 시험조건 때문에 특히, 산화속도가 느린 프로하펜텐(pro-haptens, P450 효소를 통해 효소 활성화가 필요한 화학물질)과 프리하펜텐(pre-hapten, 자가산화에 의해 활성화된 화학물질)의 경우도 음성 결과를 생성할 수 있다. 그러나, 일반적으로 음성결과들은 분류하는 데 있어 잘 사용될 수 있기 때문에 대부분 프로하펜텐과 프리하펜텐은 AOP의 KE 1, KE 2 및 KE 3 시험법의 조합으로 충분히 잘 구별될 수 있다⁽¹²⁾⁽²⁰⁾⁽³⁴⁾. 반면에 감작성물질은 아니지만 화학적 스트레스 인자인 시험물질은 위양성 결과를 초래할 수 있다⁽⁸⁾.

마지막으로 루시퍼라아제(luciferase) 효소 활성을 간접하는 시험물질은 세포 기반 시험에서 루시퍼라아제의 활성을 교란시켜 발광(luminescence)을 확연히 증가시키거나 감소시킬 수 있다⁽¹³⁾. 예를 들어, 1 μ M 보다 높은 농도의 식물에스트로젠은 다른 루시퍼라아제-기반 리포터 유전자(reporter gene)를 과활성시켜 발광 신호를 간접한다고 알려져 있다⁽¹⁴⁾. 따라서 고농도의 식물에스트로젠 또는 식물에스트로젠과 같이 루시퍼라아제 리포터 유전자를 과활성시키는 유사 화합물에서 얻어진 루시퍼라아제 발현 결과는 신중하게 검토되어야 한다⁽¹⁴⁾. 특정 범주의 시험물질에 대하여 KeratinoSens™을 적용할 수 없다는 증거가 제시되는 경우 본 시험법을 사용하지 말아야 한다.

6. 게다가 KeratinoSens™ 시험법은 피부감작성물질과 비감작성물질을 구별하는 것 외에도 IATA와 같은 통합적 접근 방식 내에서 사용되는 경우 감작성 평가에 도움될 수 있는 용량-반응 정보를 제공해 준다⁽¹¹⁾⁽¹⁵⁾. 다른 정보와의 조합에 있어 KeratinoSens™ 시험법이 어떻게 사용되는지에 대한 예가 보고되어있다⁽⁷⁾⁽¹¹⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾. 특히, LLNA와 인체시험에서 감작성(potency)을 평가하기 위해 정량 펩타이드 반응성 결과와 KeratinoSens™ 시험의 용량-반응 결과가 설명되어있으며⁽²¹⁾ LLNA 감작성에 대한 Bayesian 통합 시험 전략이 사용되었다⁽¹¹⁾⁽²²⁾. 게다가 인체에서 감작성(potency)에 대하여 구체적으로 다루는 방법에 대한 평가가 수행되었다⁽²³⁾. 결론적으로, 화학물질 분류의 감작성(potency)을 구체적으로 평가하기 위한 KeratinoSens™ 시험법의 사용에 대해 설명되어있다⁽²¹⁾⁽²⁴⁾.

7. 본 가이드라인에서 사용된 용어의 정의는 서론의 부속서 1에 기술되어 있다.

시험의 원리

8. KeratinoSens™ 시험법은 인간 AKR1C2 유전자의 항산화 반응 요소의 조절을 받는 루시퍼라아제 리포터 유전자를 안정적으로 도입한 인체피부각질세포주(HaCaT)로 부터 유래된 부착성 불멸화 세포주를 사용한다⁽²⁵⁾. 해당 유전자는 피부감작성물질에 의해 발현이 증가(up-regulation)되는 것으로 알려져있다⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾. 세포주는 ARE와 결합된 프로모터(promoter fused with the ARE element)의 전사조절을 받는 루시퍼라아제 유전자를 포함하고 있다. 루시퍼라아제 신호는 감작성물질에 의해 내인성 Nrf2 의존성 유전자가 활성화되는 것을 뜻하며, 재조합 세포주에서 루시퍼라아제 신호의 Nrf2에 대한 의존성이 입증되었다⁽²⁸⁾. 이에 따라 루시퍼라아제 기질(substrate)을 사용하여 루시퍼라아제 유전자 발현 유도의 정량적 측정(발광

검출)이 가능하며 전자친화성 시험물질에 노출된 후 Nrf2 전사인자의 활성을 나타내는 지표로서 활용된다.

9. KeratinoSens™ 시험법에서 세포생존율에 영향을 주지 않는 농도(1,000 μ M 미만 및 세포생존율이 70% 이상인 농도⁽³⁾⁽⁶⁾)에서 역치 이상(1.5배 이상 또는 50% 증가)의 루시퍼라아제 활성 유도를 통계적으로 유의하게 증가시키는 경우 양성으로 판정한다. 이를 위하여 용매(음성)대조군과 비교한 루시퍼라아제 활성의 최대 유도 배수(maximal fold induction of the luciferase activity over negative control, I_{max} 값)를 결정한다. 또한 세포가 일련의 시험물질 농도에 노출되기 때문에, 통계적으로 유의한 역치($EC_{1.5}$ 값) 이상의 루시퍼라아제 활성 유도에 필요한 농도는 시험물질이 일련의 시험농도로부터 얻은 용량-반응 곡선(26항의 계산방법 참조)에 대입하여 구한다. 마지막으로 루시퍼라아제 활성 유도가 세포독성을 나타내는 농도보다 낮은 농도에서 일어나는지 판단하기 위하여 세포독성시험을 병행하여 측정한다.
10. 본 가이드라인에서 설명한 KeratinoSens™ 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 실험실은 부록 IA의 부속서 1에 수록된 숙련도 물질을 이용하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다.
11. KeratinoSens™ VRM과 유사한 생체외(*in vitro*) ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법을 이용한 신규 또는 변형된 시험법의 검증을 돕고 이들 시험법 추가를 위한 시험 가이드라인의 적절한 개정이 가능하도록 유사시험평가기준(Performance Standards, PS)을 마련하였다. MAD는 PS에 따라 검증되어 OECD가 검토하고 시험 가이드라인에 포함된 시험법에만 보장된다.

시험절차

12. KeratinoSens™ 시험법에 대한 DataBase on ALternative Methods (DB-ALM) 프로토콜을 이용할 수 있으며, 실험실에서 본 시험법 수행 시 사용되어야 한다⁽¹⁵⁾. 본 시험법을 수행하고자 하는 실험실은 루시퍼라아제 유전자의 일상적 사용에 대한 라이선스와 함께 KeratinoSens™ 시험법 개발자²⁾와 사용권 계약을 체결하여 본 시험법에 사용되는 재조합 세포주를 구할 수 있다. 루시퍼라아제 리포터 유전자 분석 또한 Promega 사용에 제한적인 라이선스 적용에 따라 Promega에서 구입한 발광도 분석 시약을 사용해야 한다. 다음 항에서 KeratinoSens™ 시험법의 주요 구성과 절차를 설명한다. 또한, human reagent를 사용하는

²⁾ Givaudan Schweiz AG, CH-8310 Kemptthal

xeno-free 배양을 위한 KeratinoSens™ 시험법의 적용은 본 부록 IA의 부속서 2에 설명되어 있다⁽³³⁾. 그러나 KeratinoSens™ 시험법에서 혈청의 유형을 결정하기 전에 관련 규제 기관과 상의하는 것을 추천한다.

각질세포 배양 준비

13. ARE-요소에 의해 조절되는 루시퍼라아제 리포터 유전자가 안정적으로 삽입된 KeratinoSens™ 형질전환 세포주를 사용해야 한다. KeratinoSens™ 세포주를 수령한 후 해당 시험법 프로토콜에 따라 계대(2~4 계대)하고 균질한 조건으로 세포(stock)를 냉동 저장한다. 수령한 세포(original stock)는 최대 계대수(KeratinoSens™의 경우 25 계대)까지 증식시킬 수 있고, DB-ALM 프로토콜의 시험법⁽⁹⁾에 설명된 바와 같이 유지 및 성장 배지(혈청 및 Geneticin을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM))를 사용하여 일상적인 시험에 사용된다.
14. 시험에 사용하기 위해서 세포 포화도(confluent)가 80~90%정도 되어야 하며, 100%가 되지 않도록 주의한다. 시험 전날 세포를 채취하여 96well 플레이트에 well당 10,000 세포를 분주한다. Well의 균일한 분산을 위해 세포 분주(seeding) 과정에서 세포가 침전되지 않도록 주의한다. 그렇지 않은 경우, well 간 변동성이 커진다. 매 시험(repetition)마다 3개의 반복시료(three replicate)를 루시퍼라아제 활성 측정에 사용하고 최소 1개의 동일한 시료를 세포생존을 시험에 사용한다.

시험물질 및 대조군 조제

15. 시험물질 및 대조군은 시험 당일에 준비한다. KeratinoSens™ 시험법에서 시험물질은 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 최종 농도(예: 200 mM)까지 용해한다. DMSO 용액은 자체 멸균된 것으로 간주되므로 멸균여과 처리가 필요하지 않다. DMSO에 용해되지 않는 시험물질은 멸균수 또는 배양배지에 용해한 다음 여과 멸균시킨다. 분자량(MW)이 정의되지 않은 시험물질의 경우 저장용액(stock solution)을 40 mg/mL 또는 4% (w/v) 농도로 준비한다. DMSO, 물, 배양배지 이외의 용매가 사용되는 경우 적절한 과학적 근거가 제시되어야 한다.

16. 저장용액(stock solution)을 DMSO 또는 적절한 용매(예: 멸균수 또는 배양배지)로 연속 희석하여 12개의 초기 희석단계(master) 농도를 만든다(0.098 mM~200 mM). 사용한 용매와 상관없이 초기 희석단계 농도는 혈청을 포함한 배양배지로 25배 더 희석하고, 최종적으로 4배 더 희석하여 사용한다. 따라서 KeratinoSens™ 시험법에서 시험물질의 최종 농도가 0.98~2,000 μ M이 되게 한다(희석 배수 2 기준). 타당한 이유가 있을 경우 다른 농도를 사용할 수 있다(예: 세포독성 또는 용해도가 낮은 경우). 분자량이 명확하지 않는 시험물질의 경우 최종 농도(예: 0.196~400 μ g/mL 범위의 12가지 농도)를 얻기 위해 DMSO 또는 적절한 용매를 사용하여 연속 희석한다.
17. 동시에 수행되는 용매/부형제 대조군은 DMSO이며, 각 반복시험마다 플레이트 당 충분한 수량의 well(6개의 well)을 이용하여 수행해야 한다. 용매/부형제 대조군은 16항에서 설명한 초기 희석단계 농도와 동일한 희석과정을 거치므로 세포생존율에 영향을 주지 않는 것으로 알려지고, 시험물질 및 양성 대조군에서 사용한 DMSO와 동일한 농도인 1%여야 한다. DMSO에 용해되지 않고 물에 희석되는 시험물질의 경우, 다른 시험물질 및 대조물질과 같이 최종 시험용액의 DMSO 농도는 1%여야 한다. 이 용매/부형제 대조군(예: DMSO)은 KeratinoSens™ 시험법에 대한 음성대조군으로도 사용한다.
18. 동시에 수행되는 양성대조군 또한 시험계의 적절한 반응을 입증하기 위해 DB-ALM 프로토콜⁽⁹⁾에 기재된 바와 같이 각 반복시험마다 충분한 수량의 well을 이용하여 시험해야 한다. 예를들면 KeratinoSens™ 시험법에서는 cinnamic aldehyde(CAS No. 14371-10-9)의 5가지 농도, 즉 DMSO에 0.4~6.4 mM 범위(6.4 mM의 저장용액(stock solution) 농도로부터)로 조제된 일련의 5가지 초기 희석 단계 농도가 각 반복시험에 사용되며 16항의 초기 희석 단계 농도 부분을 참고하여 양성대조군의 최종 농도가 4~64 μ M이 되게 희석한다. 만일 인정요건을 충족하는 과거 데이터가 있다면 되도록 중간 범위의 EC_{1.5} 값을 갖는 다른 적절한 양성대조군을 사용할 수 있다.

시험물질 및 대조군물질의 적용

19. 각 시험물질과 양성대조물질의 예측(양성 또는 음성)을 위해 한 번의 시험이 필요하며, 이 시험은 각 3개의 반복시료를 포함한 최소한 두 번의 독립적인 반복시험(repetitions)이 필요하다(n=6). 두 번의 독립적인 반복시험의 결과가 불일치한 경우 3개의 동일시료가 포함된

세 번째 반복시험을 수행해야 한다($n=9$). 독립적인 개별 반복시험은 새로운 저장용액(stock solution)으로 다른 날 수행하며 별도로 세포를 채취한다. 하지만 같은 계대수의 세포를 사용할 수 있다.

20. 14항에 설명된 바와 같이 96-well 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)에 세포를 분주하여 24시간 배양한다. 이때, 배지를 제거하고 새로운 배양배지(DB-ALM 프로토콜⁹)에서 설명된 바와 같이 Geneticin은 없고 혈청을 포함한 배양배지 $150 \mu\text{L}$ 로 교환 후, 25배 희석한 시험물질 또는 대조군 $50 \mu\text{L}$ 를 첨가한다. 발광도 배경값(background values)을 측정하기 위해, 플레이트 당 최소 well 하나씩은 비워두어야 한다(세포 및 물질 처리가 없는 상태).
21. 시험물질이 처리된 플레이트는 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양한다. 시험물질을 배양하기 전에 휘발성 시험물질의 증발과 well간 교차오염이 일어나지 않도록 주의한다(예: 호일로 플레이트를 덮음).

루시퍼라아제 활성 측정

22. 적절한 발광도 측정을 위해 다음 요소가 중요하다.
 - 감도가 좋은 발광측정기(luminometer) 선택
 - 빛의 교차오염(light-cross-contamination)을 막을 수 있도록 충분한 높이의 플레이트 사용
 - 충분한 감도(sensitivity)와 낮은 변동성(variability)을 위해 충분한 빛을 발산하는 루시퍼라아제 기질(substrate) 사용
 - 적절하고 안정적인 배경(background) 수준

시험을 시작하기 전에 부록 IA의 부속서 3에 설명한 대조시험 설정을 수행하며 이러한 사항을 충족해야 한다.

23. 세포를 48시간 동안 시험물질과 대조물질에 노출시킨 뒤 인산 완충 생리식염수(Phosphate Buffered Saline, PBS)로 세척하고 발광 측정을 위하여 적절한 용해 완충액을 각 well에 첨가하여 충분한 시간(예: 실온에서 20분) 동안 반응시킨다.

24. 세포 용해물을 포함한 플레이트를 발광측정기에 장착시키고 다음 절차를 따른다. (i) 각 well에 루시퍼라아제 기질(예: 50 μL)을 첨가한다. (ii) 1초간 기다린다. (iii) 2초간 루시퍼라아제 활성을 측정한다. 발광측정기 모델 등에 따라 다르게 설정할 경우 적절한 사유를 밝혀야 한다. 또한 부록 IA의 부속서 3의 품질 관리 시험을 충분히 충족하는 경우, 글로우형 기질(glow substrate)을 사용할 수도 있다.

세포독성 측정

25. KeratinoSens™ 시험법의 세포생존율(cell viability, CV) 분석을 위해 배양배지에 48시간 노출시킨 후, 5 mg/mL의 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide;)가 포함된 새 배지로 교환하고, $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 4시간 배양한다. 그런 다음 MTT 배지를 제거하고 적절한 용해제(lysing agent)를 사용하여 충분한 시간 동안(예: 10% SDS에 O/N) 용해시킨다. 진탕(shaking)한 후 시험법 프로토콜⁽⁹⁾에 설명한 바와 같이 광도계로 600 nm에서 흡광도를 측정한다.

시험결과 및 보고

데이터 평가

26. KeratinoSens™ 시험법에서 다음의 매개변수들을 계산한다:

- 시험물질과 양성대조물질의 모든 농도에서 측정된 루시퍼라아제 활성 중 최대 유도 배수 평균(I_{\max}) 값
- 루시퍼라아제 활성이 용매대조군 발광 측정값보다 1.5배 초과하는(루시퍼라아제 활성 50% 증가) 시험물질의 농도를 나타내는 $\text{EC}_{1.5}$ 값
- 세포생존율이 각 50%와 30%로 감소되는 IC_{50} 와 IC_{30} 농도 값

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

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

L시료는 시험물질을 처리한 well에서의 발광 측정값

L공시료는 무세포이며 시험물질 무처리한 well에서의 발광 측정값

L용매는 용매(음성) 대조군을 처리한 well에서의 평균 발광 측정값

- 2) EC_{1.5} 값은 방정식 2에 따라 선형내삽법을 이용하여 구한다. 전체 EC_{1.5} 값은 각 반복시험의 기하평균(geometric mean) 값으로 구한다.

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

Ca : 1.5배 초과 유도를 가진 최저 농도 (μM)

Cb : 1.5배 미만의 유도를 가진 최고 농도 (μM)

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

Ib : 1.5배 미만의 유도를 가진 최고 농도에서 측정한 유도 배수(3개 well의 평균)

- 3) 세포생존율은 방정식 3으로 구한다.

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

V시료는 시험물질 well에서의 MTT-흡광도 값

V공시료는 무세포이며 시험물질 무처리한 well에서 측정한 MTT-흡광도 값

V용매는 세포 및 용매(음성) 대조군을 처리한 well에서 측정한 MTT-흡광도 값의 평균

- 4) IC₅₀과 IC₃₀은 선형내삽법을 이용하여 방정식 4로 구한다. 전체 IC₅₀과 IC₃₀은 각 반복시험의 기하평균 값으로 구한다.

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

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

C_a는 세포생존율 감소율이 x%보다 큰 농도 중 최저 농도 (μM)

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

V_a는 세포생존율 감소율이 x%보다 큰 농도 중 최저 농도에서 측정한 세포생존율(%)

V_b는 세포생존율 감소율이 x%보다 작은 농도 중 최고 농도에서 측정한 세포생존율(%)

27. 각 농도에서 루시퍼라아제 활성이 1.5배 이상으로 유도되는 경우에는 해당 농도의 3개 반복시료 발광 값을 용매/부형제 대조군의 발광 값과 비교하여 통계적 유의성을 확인한다. 또한, 1.5배 이상(\geq)의 루시퍼라아제 활성을 유도하는 가장 낮은 농도에서 유의한 세포독성 영향이 나타나지 않고 이 농도가 세포생존율을 30% 이하로 감소시키는 지표인 IC_{30} 보다 낮은지 확인해야 한다. 뿐만아니라 최소 2개의 연속 농도는 생존율이 70%를 초과해야 하며, 그렇지 않은 경우 농도 범위를 조정해야 한다.
28. 데이터를 그래프로 표시하여 육안으로 확인할 것을 권장한다. 만약 용량-반응 곡선이 명확하지 않거나, 2상(biphasic)의 형태(1.5배 역치가 두 번 꺾이는)로 나타나는 경우, 시험물질의 특성인지 또는 시험 상의 오류인지를 확인하기 위한 재시험을 실시해야 한다. 각 시험에서 2상(biphasic)의 형태로 반응이 재현되는 경우, 더 낮은 농도, 즉 1.5배 역치를 처음으로 넘었을 때 보고해야 한다.
29. KeratinoSensTM 시험법은 1.5배 이상의 루시퍼라아제 활성을 유도하지만 통계적 유의성이 없다가 더 높은 농도에서 통계적 유의성이 발견되는 드문 경우도 있다. 이때는 1.5배 이상의 유도에 대한 통계적 유의성이 세포독성이 없는 농도에서 발견될 경우에만 반복시험 결과가 유효하며 양성으로 간주한다.
30. 마지막으로, KeratinoSensTM 시험법에서 가장 낮은 시험농도(예: $0.98 \mu\text{M}$)에서 이미 1.5배 또는 더 높은 루시퍼라아제 활성 유도가 관찰되면 용량-반응 곡선을 육안으로 검사하여 <0.98 인 $EC_{1.5}$ 값을 정한다.

인정요건

31. KeratinoSensTM 시험법을 사용할 경우 다음 인정요건을 충족해야 한다.
- 양성대조군 cinnamic aldehyde에 의한 루시퍼라아제 활성 유도는 최소한 시험농도 ($4\sim 64 \mu\text{M}$) 중 하나에서 (t -test 검정 등으로) 1.5배 초과하는 값으로 통계적 유의성이 있어야 한다.
 - 양성 대조물질의 $EC_{1.5}$ 값은(예: 검증된 데이터세트에 근거하여 $7\sim 30 \mu\text{M}$ 사이에서) 시험기관의 정기적으로 갱신된 평균 값의 표준편차 2배(2SD) 이내여야 한다. 또한 $64 \mu\text{M}$ 농도의 cinnamic aldehyde에 대한 3개의 반복시료 측정의 평균 루시퍼라아제 활성 유도

비율은 2~8사이여야 한다. 후자의 조건이 충족되지 않는 경우, cinnamic aldehyde의 농도 증가에 따라 루시퍼라아제 활성 유도 상승을 볼 수 있다는 명확한 용량반응이 인정되는 경우에 한하여, 시험결과를 받아들일 수 있다.

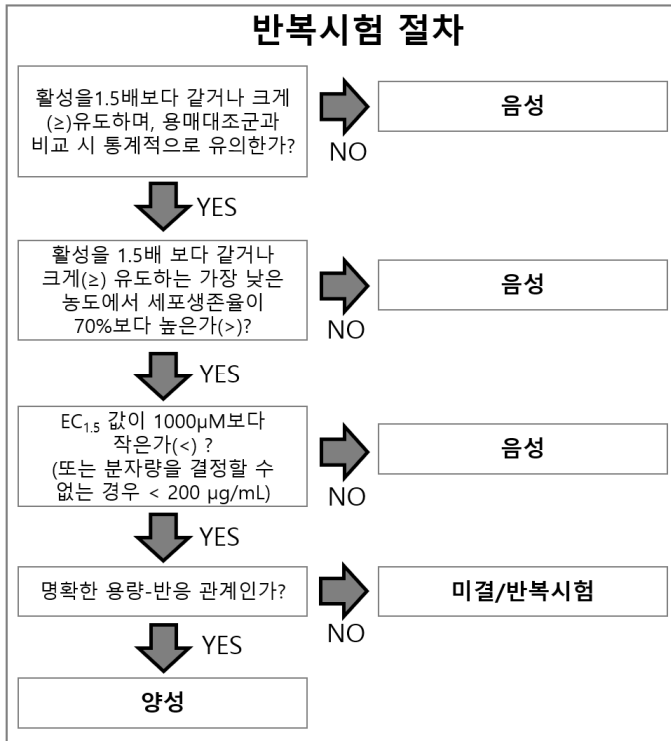
- 각 6개의 well로 구성된 3번의 시험에서 용매/부형제 대조군 DMSO의 발광 측정값 변동계수 평균은 20% 미만이어야 한다. 만약 변동계수가 20% 보다 높을 경우 시험결과는 사용될 수 없다.

결과의 해석 및 예측모델

32. KeratinoSens™ 결과 판정 시 i) 두 번 반복시험에서 모두 또는 ii) 세 번의 반복시험 중 두 번에 걸쳐 다음 네 가지 조건이 모두 충족되면 양성으로 판정하고, 그렇지 않으면 음성으로 판정한다(그림 1).

- I_{max} 값이 1.5배 이상(\geq)이고, 음성/부형제 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 차이가 있다(two-tailed, unpaired Student's *t*-test로 검정).
- 루시퍼라아제 활성을 1.5배 이상(\geq) 유도하는 가장 낮은 농도에서 세포생존율이 70% 보다 높다($>$)($EC_{1.5}$ 값 결정 농도).
- $EC_{1.5}$ 값이 1,000 μ M 보다 작다($<$)(또는 분자량을 결정할 수 없는 시험물질의 경우 (200 μ g/mL).
- 루시퍼라아제 활성 유도는 용량 의존적으로 증가한다(또는 28항에서 언급한 2상의 용량-반응 관계).

반복시험에서 앞의 세 조건을 충족하지만 루시퍼라아제 활성 유도에 대하여 명확한 용량 의존적인 증가가 관찰되지 않으면 그 반복시험의 결과는 미결로 간주되고 추가시험이 요구될 수 있다(그림 1). 최대 농도 1,000 μ M 미만에서 시험을 실시하고 그 최대 농도에서 세포독성이 없는 음성 결과 역시 미결로 간주된다(4항 참조).



최소한 두 번의 반복시험 수행

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

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

그림 1. KeratinoSens™ 시험법에서 사용되는 예측 모델. KeratinoSens™ 예측은 DA 또는 IATA의 체계와 일반적 개요의 7항과 8항의 조건에 따라 고려되어야 한다.

33. 세포독성 수준에 매우 가까운 농도에서 루시퍼라아제 활성을 유도하는 시험물질은 어떤 반복시험에서는 세포독성을 일으키지 않는(non-cytotoxic) 수준에서(EC_{1.5} 값 결정 농도가 (<)IC₃₀ 보다 낮음), 다른 반복시험에서는 세포독성(cytotoxic)을 일으키는 수준에서(EC_{1.5} 값 결정 농도가 (>)IC₃₀ 보다 높음) 양성으로 나올 수 있다. 시험물질의 활성 유도가 세포독성 수준에서 일어나는지에 대한 여부 확인을 위하여 더 낮은 희석배수(예: well 간 1.33 또는 √2 (=1.41)배 희석)를 사용하여 보다 제한적인 용량-반응 분석과 함께 시험을 다시 수행해야 한다⁽³⁾.

시험보고서

34. 시험보고서는 다음의 사항을 포함하여야 한다.

▶ 시험물질

• 단일성분물질

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 배치/lot 번호 및 유효기간과 같은 기타 식별자료 등의 화학물질 식별정보
- 물리적 성상, 용해도, DMSO 용해도, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 특성(확보 가능한 범위에서)
- 배지에서의 용해도(불용성) 또는 분산 안정성에 대한 설명
- 순도, 불순물의 화학물질 식별정보
- 해당하는 경우, 시험 전 처리방법(예: 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 확보 가능한 범위에서 보관 조건과 안정성

• 다성분물질, UVCB* 및 혼합물

- 물질의 특성(예: 화학물질 식별정보(위 참조), 확보 가능한 범위에서 순도, 함유량 및 해당 성분의 관련 물리화학적 성질(위 참조)).
- 물리적 성상, 용해도, DMSO 용해도 및 기타 관련 물리화학적 특성(확보 가능한 범위에서)
- 분자량 또는 조성이 알려진 혼합물/중합체의 경우 겉보기 분자량(apparent molecular weight) 또는 시험 수행과 관련된 기타 정보
- 배지에서의 용해도(불용성) 또는 분산 안정성에 대한 설명
- 해당하는 경우, 시험 전 처리방법(예: 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 확보 가능한 범위에서 보관 조건 및 안정성³⁾

▶ 대조군

• 양성대조군

- IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 다른 식별자료 등의 화학물질 식별정보

³⁾ UVCB: Unknown or Variable composition. Complex reaction products and Biological materials

- 물리적 성상, 용해도, DMSO 용해도, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 특성(확보 가능한 범위 및 적용 가능한 범위에서)
- 순도, 불순물의 화학물질 식별정보
- 해당하는 경우, 시험 전 처리방법(예: 가온, 분쇄)
- 시험 농도
- 확보 가능한 범위에서 보관 조건 및 안정성
- 해당하는 경우, 적합한 인정요건을 입증할 수 있는 기존 양성대조군 결과에 대한 참고자료
- 용매/부형제/음성 대조군
 - IUPAC 또는 CAS 명칭, CAS 번호 및/또는 다른 식별자료 등의 화학물질 식별정보
 - 순도, 불순물의 화학물질 식별정보
 - 본 가이드라인에 언급된 것과 다른 용매/부형제/음성 대조군이 사용되는 경우 물리적 외관, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 성질
 - 확보 가능한 범위에서 보관 조건 및 안정성
 - 각 시험물질에 대한 용매/부형제 선택에 대한 근거 제시
- ▷ 시험법 조건
 - 시험의뢰자, 시험기관, 시험책임자의 이름과 주소
 - 사용된 시험법에 대한 설명
 - 사용한 세포주, 세포주 보관 조건 및 공급처(예: 세포주 제공 기관)
 - 세포주의 계대수, 시험에 사용한 세포의 포화도
 - 시험 전 세포 분주 시 사용한 세포수 측정 방법과 균질한 세포수 배분에 대한 방법(14항 참조)
 - 사용된 발광측정기(예: 모델), 기기 설정, 사용된 루시페라아제 기질(substrate), 본 부록 IA의 부속서 3에서 설명한 대조시험에 근거한 발광도 측정의 적절성 제시
 - 시험법 수행에서 실험실의 숙련도 또는 재현성 입증을 위한 절차
- ▷ 시험 절차
 - 반복시험(repetitions)과 반복측정(replicates)의 횟수
 - 시험물질 농도, 시험물질 처리 절차, 처리 시간(권장과 다를 경우)
 - 사용된 평가 및 결정 기준에 대한 설명
 - 사용된 인정요건에 대한 설명
 - 시험 절차의 모든 변경 사항에 대한 설명

▷ 결과

- 개별 반복시험의 시험물질과 양성대조군으로부터 얻은 I_{max} 값, $EC_{1.5}$ 값, 세포생존율(IC_{50} , IC_{30}), 개별 반복시험으로부터 얻은 모든 데이터를 이용하여 계산된 평균값(I_{max} : 평균값, $EC_{1.5}$ 값과 세포생존율; 기하평균값)과 표준편차를 표로 제시, 즉 예측모델에 따라 시험물질의 평가 제시
- 각 시험에 대한 용매/부형제/음성 대조군의 발광도 측정의 변동계수
- 루시퍼라아제 활성 유도과 생존율에 대한 용량-반응 곡선 그래프
- 해당되는 경우, 다른 관련된 관찰사항에 대한 기술

▷ 결과 토의

- KeratinoSens™ 시험법으로 얻은 결과에 대한 고찰
- 기타 관련 정보가 이용 가능한 경우 IATA내에서 시험법 결과 고려사항

▷ 결론

참고문헌

1. OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
2. Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
3. Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
4. Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
5. Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.
6. Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
7. Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.
8. EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

9. DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™., 17 pp. Available: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
10. Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
11. Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1353-1364.
12. Casati S., Aschberger K., Asturiol D., Basketter D., Dimitrov S., Dumont C., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P., Patlewicz G., Roberts D.W., Worth A. (2016). Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. EUR 27752 EN. Available at : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-status-reports/pre-prohaptens-workshop-report>.
13. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
14. OECD (2012). BGLuc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
15. ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
16. Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.
17. Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.

18. Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
19. Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P.S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
20. Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S.N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016). Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Non-animal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
21. Natsch A, Emter R, Gfeller H, Haupt T, Ellis G (2015). Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicol Sci* 143, 319-332.
22. Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol* 89, 2355-2383.
23. Strickland J, Zang Q, Paris M, Lehmann DM, Allen D, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Casey W, Kleinstreuer N (2017). Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol* 37, 347-360.
24. Delaine T, Ponting DJ, Niklasson IB, Emter R, Hagvall L, Norrby PO, Natsch A, Luthman K, Karlberg AT (2014). Epoxyalcohols: bioactivation and conjugation required for skin sensitization. *Chem Res Toxicol* 27, 1860-1870.
25. Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 387-396.

26. Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1813-1822.
27. Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I. And Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
28. Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. In Vitro* 27, 2225-2232.
29. OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-NrF2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
30. 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
31. United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
32. Basketter D.A., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinozzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
33. Belot N, Sim B, Longmore CL, Roscoe L, Treasure C. (2017) Adaptation of the KeratinoSens™ skin sensitisation test to animal-product-free cell culture. *ALTEX*. 2017 Mar 16. doi: 10.14573/altex.1701311

34. 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, 82, 147-155.

부록 IA - 부속서 1: 숙련도 물질

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

본 가이드라인 442D 부록을 준수한 시험법을 본격적으로 이용하기 전에, 실험실은 표 1에서 권고하는 숙련도 물질 10종에 대하여 KeratinoSens™ 예측을 정확하게 판별하고, 10가지 숙련도 물질 중 최소 8가지 이상에 대해 각 기준 범위를 충족하는 EC_{1.5} 값과 IC₅₀ 값을 얻음으로써 기술적 숙련도를 입증하여야 한다. 이 숙련도 물질들은 피부감작 유해성의 반응 범위를 나타내기 위해 선정되었다. 다른 물질 선정 기준으로는 상업적 구매 가능성 여부, 신뢰할 만한 생체내(*in vivo*) 참고 데이터 및 KeratinoSens™ 시험법에서 나온 생체외(*in vitro*) 데이터가 해당된다.

표 1. KeratinoSens™ 시험법에서 기술 숙련도를 입증하기 위해 이용되는 권장 물질

| 숙련도 물질 | CASRN | 물리적 성상 | LLNA 예측 ⁽¹⁾ | Human category ⁽²⁾ | Keratino Sens™ 예측 ⁽³⁾ | EC _{1.5} (μM) 참조범위 ⁽⁴⁾ | IC ₅₀ (μM) 참조범위 ⁽⁴⁾ |
|--------------------------------|------------|--------|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|--|---|
| Salicylic acid | 69-72-7 | 고체 | 비감작성 | Cat. 6 | 음성 | > 1,000 | > 1,000 |
| Lactic acid | 50-21-5 | 액체 | 비감작성 | Cat. 6 | 음성 | > 1,000 | > 1,000 |
| Glycerol | 56-81-5 | 액체 | 비감작성 | Cat. 5 | 음성 | > 1,000 | > 1,000 |
| Isopropanol | 67-63-0 | 액체 | 비감작성 | Cat. 6 | 음성 | > 1,000 | > 1,000 |
| Ethylene glycol dimethacrylate | 97-90-5 | 액체 | 감작성 (약함) | Cat. 3 | 양성 | 5 - 125 | > 500 |
| Cinnamyl alcohol | 104-54-1 | 고체 | 감작성 (약함) | Cat. 4 | 양성 | 25 - 175 | > 1,000 |
| 2-Mercaptobenzo thiazole | 149-30-4 | 고체 | 감작성 (보통) | Cat. 3 | 양성 | 25 - 250 | > 500 |
| 4-Methylamino phenol sulfate | 55-55-0 | 고체 | 감작성 (강함) | Cat. 2 | 양성 | < 12.5 | 20 - 200 |
| Methyldibromo glutaronitrile | 35691-65-7 | 고체 | 감작성 (강함) | Cat. 3 | 양성 | < 20 | 20 - 100 |
| 2,4-Dinitro -chlorobenzene | 97-00-7 | 고체 | 감작성 (매우강함) | Cat. 1 | 양성 | < 12.5 | 5 - 20 |

- (1) 생체내(*in vivo*) 유해성(과 감작성) 예측은 LLNA 데이터를 기반으로 한다⁽⁷⁾. 생체외(*in vitro*) 감작성은 ECETOC가 제안한 기준을 이용하여 구한다⁽¹⁵⁾.
- (2) Basketter 및 그의 연구진에 따르면⁽³²⁾, Cat. 1은 접촉성 알레르기를 명확하게 유발하고, Cat. 2는 빈번하게(frequent) 유발하고, Cat. 3은 일반적으로(common) 유발하고, Cat. 4는 드물게(infrequent) 유발하고, Cat. 5는 거의(rare) 유발하지 않으며, Cat. 6은 접촉성 알레르기를 유발하지 않는다⁽³²⁾.
- (3) KeratinoSens™ 예측은 서론의 7항과 8항의 규정에 따라서 DA 또는 IATA의 체계 내에서 고려가 필요하다.
- (4) 기존에 관찰된 값 기반⁽⁶⁾.

부록 IA - 부속서 2: Xeno-free 세포 배양을 위해 Human reagent를 이용한 KeratinoSens™ 시험법의 적용

KeratinoSens™ 시험법에 대한 표2의 적용은 xeno-free 세포 배양을 위해 Human reagent (human 혈청 및 재조합 human 트립신)를 이용하여 수행될 수 있으며, 기술적 숙련도(부속서 1에 설명된 바와 같이)를 입증할 수 있다.

표 2. 적용 요약(Summary of adaptations)

| 시험법의 측면 | 검증된 참조 시험법 (KeratinoSens™) (부록 IA) | Xeno-Free 적용 (본 부속서) |
|------------------------|--|--|
| 혈청(Serum) ¹ | “혈청” state(DB-ALM 프로토콜 155에서는 우태아 혈청을 명시함)(13항) | 10% 인간(human) 혈청을 명시함 |
| 세포독성 측정 ² | MTT: 4시간 배양, O/N 동안 10% SDS에 용해시킨 후 600 nm에서 측정(25항) | MTT(1 mg/mL): 3시간 배양, 이소프로판올에 용해시킨 후 570 nm에서 측정 |
| 양성 대조군 ² | Cinnamic aldehyde 4~64 μM(18항) | Cinnamic aldehyde 8~128 μM |
| 트립신 ¹ | 명시되지 않음(DB-ALM 프로토콜 155에서는 트립신 EDTA를 명시함) | 비동물성 재조합 트립신 (TrypZean, Sigma-Aldrich T3499) |

¹ Xeno-Free 조건을 달성하기 위한 1가지 적용

² 다른 방법의 적용⁽³³⁾

시험 목적으로 사용하기 전에 KeratinoSens™ 세포주는 10% 인간 혈청을 사용하는 일상적인 배양에 적합해야 한다. 인간 혈청(통합 기증자로부터)은 적합한 기증자의 동의 및 세포 배양 적용을 위한 QC 테스트로 신뢰할 수 있는 출처로부터 얻어야 한다. 다른 유형의 혈청과 마찬가지로 새로운 배치를 사용하는 경우, 최소한 양성대조군 및 대표적인 표준참고물질(급적 감작성물질과 비감작성 물질 하나씩을 포함)을 이용하여 세포 형태, 증식률 및 $I_{max}/EC_{1.5}$ 값 등 해당 배치의 내부 검증이 수행되어야 하며, 성공적으로 내부 검증이 완료된 배치는 장기 사용을 위해 보관한다. 이전에 세포가 우태아 혈청에서 배양된 적이 있는 경우, 최소 3 계대(passage) 이상 인간 혈청으로 배양되어야 한다. 세포가 안정적인 상태(healthy morphology)를 보이고 우태아 혈청과 비슷한 성장율을 보인다면, 추후 사용하기 위해 균질한 조건으로 세포를 냉동 저장(cell bank)한다. 인간 혈청에서 배양될 때 KeratinoSens™ 세포주는 인간 혈청에 적응하기 위해 걸린 계대 수를 포함하여 최적의 성능을 위해 최대 22 계대 배양되어야 한다는 점을 유의해야 한다. 완전한 xeno-free 세포 배양을 위해, 재조합 트립신(예: Trypzean™)의 비동물성 공급원을 이용하여 계대배양 중에 세포를 얻는 데 사용해야 한다⁽³³⁾. 다른 모든 측면에서, 세포는 참조 KeratinoSens™ 세포주에 대한 시험법 가이드라인 442D 및 DB-ALM 프로토콜⁽⁹⁾의 부록에 설명된 것과 동일한 방식으로 배양되어야 한다.

18항을 참조하여, xeno-free 세포 배양을 위해 human reagent를 이용하는 KeratinoSens™ 시험법의 적용은 양성대조군으로 cinnamic aldehyde를 사용하여 최종 농도 범위가 8~128 μM 로 최적화되었다. 만일 인정요건을 충족하는 과거 데이터(historical data)가 있다면 중간 범위의 EC_{15} 값을 우선적으로 갖는 다른 적절한 양성대조군을 사용할 수 있다. 25항을 참조하여, xeno-free 세포 배양을 위해 human reagent를 이용한 KeratinoSens™ 시험법의 적용은 세포독성 평가를 위해 다음과 같은 방법으로 최적화되었다. 48시간 노출 후 1 mg/mL 농도의 MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)가 포함된 새로운 배지로 교환한 후 세포를 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 3시간 동안 배양한다. MTT 배지를 제거하고 이소프로판올을 첨가하여 세포를 용해시킨다. 30분 동안 교반한 후 분광광도계를 이용하여 570 nm에서 측정한다. Xeno-free 세포배양을 위해 human reagent를 이용한 KeratinoSens™ 시험법의 적용 절차는 시험법 가이드라인 442D 부록과 참조 KeratinoSens™ 세포주에 대한 DB-ALM 프로토콜⁽⁹⁾에 설명된 표준 방법과 동일하게 수행되어야 한다.

부록 IA - 부속서 3: 발광 측정의 품질 관리 (KeratinoSens™ 시험법에서 최적의 발광 측정을 위한 기본 시험)

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

- 대조군 well에서 안정된 배경 발광도를 생성하는 충분한 민감도를 가질 것.
- 플레이트 전체를 오래 측정하는 동안 시간이 지남에 따라 광도 측정값이 점진적으로 변하지 않을 것.
- 강한 활성을 나타내는 well로부터 인접한 well로 빛의 오염이 없을 것.

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

1. 첫 번째 숙련도 시험을 위한 플레이트 설정

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

EGDMA = Ethylene glycol dimethacrylate (CAS No.: 97-90-5) a strongly inducing compound CA = Cinnamic aldehyde, positive reference (CAS No.: 104-55-2)

2. 품질 관리 분석 결과에서 다음을 입증하여야 한다.

- D행에서 루시페라아제의 활성 유도가 명확하게 용량 의존적으로 증가하고, I_{max} 값은 배경 값 보다 20배 초과로 나타나야 함(대부분 I_{max} 값은 100~300 사이).
- H7~H11 well에서 루시페라아제의 활성 유도가 용량 의존적으로 증가하고, H11 well에서는 2~8까지의 유도배수로 나타나야 함.

- C행과 E행에서 루시퍼라아제의 활성 유도가 용량 의존적으로 증가하지 않음(특히 EGDMA 행에서 강한 활성을 보이는 well에 인접한 well에서 빛의 오염 때문에 유도 값이 1.5를 초과하지 않을 것(이상적으로는 1.3 미만).
- A, B, C, E, F, G행 사이에 통계적으로 유의성 있는 차이가 없을 것.
- A, B, C, E, F, G행과 H행의 DMSO를 처리한 well에서 발광도 편차는 20% 미만일 것.

OECD/OCDE

442D

Adopted:

27 June 2018

Corrected:

30 June 2022

(App.IB, parag. 20)

*OECD KEY EVENT BASED GUIDELINE FOR THE TESTING OF**CHEMICALS**In vitro* skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event onKeratinocyte activation

GENERAL INTRODUCTION

Keratinocyte activation Key Event based Test Guideline

1. A skin sensitizer refers to a substance that will lead to an allergic response following repeated skin contact as defined by the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) (1). There is general agreement on the key biological events underlying skin sensitisation. The current knowledge of the chemical and biological mechanisms associated with skin sensitisation has been summarised as an Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), starting with the molecular initiating event through intermediate events to the adverse effect, namely allergic contact dermatitis. This AOP focuses on chemicals that react with thiol (i.e. cysteine) and primary amines (i.e. lysine) such as organic chemicals. In this instance, the molecular initiating event (i.e. the first key event) is the covalent binding of electrophilic substances to nucleophilic centres in skin proteins. The second key event in this AOP takes place in the keratinocytes and includes inflammatory responses as well as changes in gene expression associated with specific cell signalling pathways such as the antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways. The third key event is the activation of dendritic cells, typically assessed by expression of specific cell surface markers, chemokines and cytokines. The fourth key event is T-cell proliferation (3).

2. This Test Guideline describes *in vitro* assays that address mechanisms described under the second Key Event of the AOP for skin sensitisation, namely keratinocyte activation (2). The Test Guideline comprises test methods to be used for supporting the discrimination between skin sensitizers and non-sensitizers in accordance with the UN GHS (1). The test methods currently described in this Test Guideline are:

© OECD, (2022)

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

OECD/OCDE

442D

- The ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ test method (Appendix IA), and
- The ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (Appendix IB).

3. These two in vitro ARE-Nrf2 luciferase test methods have been considered scientifically valid. The KeratinoSens™ test method first underwent a validation study followed by an independent peer-review by EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) and positive recommendations by EURL ECVAM, and is considered the validated reference method (VRM) (3) (4) (5) (6). The LuSens test method later underwent a Performance Standard-based validation study based on which it was also reviewed and received positive opinion by ESAC (7) (8) (9) (10).

4. The test methods included in this Test Guideline may differ in relation to the procedure used to generate the data and the readouts measured but can be used indiscriminately to address countries' requirements for test results on the keratinocytes activation Key Event of the AOP for skin sensitisation while benefiting from the Mutual Acceptance of Data.

Background and principles of the test methods included in the Key Event based Test Guidelines

5. The assessment of skin sensitisation has typically involved the use of laboratory animals. The classical methods that use guinea-pigs, the Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) of Magnusson and Kligman and the Buehler Test (OECD TG 406) (11), assess both the induction and elicitation phases of skin sensitisation. The murine tests, the LLNA (OECD TG 429) (12) and its three non-radioactive modifications, LLNA: DA (OECD TG 442A) (13) as well as LLNA: BrdU-ELISA and BrdU-FCM (OECD TG 442B) (14), all assess the induction response exclusively, and have gained acceptance since they provide an advantage over the guinea pig tests in terms of animal welfare together with an objective measurement of the induction phase of skin sensitisation.

6. Mechanistically-based in chemico and in vitro test methods addressing the first three key events of the skin sensitisation AOP have been adopted for contributing to the evaluation of the skin sensitisation hazard potential of chemicals: the OECD TG 442C describes the Direct Peptide Reactivity Assay (15) addressing the first key event; the present Test Guideline assesses keratinocyte activation addressing the second key event and the OECD TG 442E addresses the activation of dendritic cells, the third key event of the skin sensitisation AOP (16). Finally, the fourth key event representing T-cell proliferation is indirectly assessed in the murine Local Lymph Node Assay (LLNA) (12).

7. As keratinocyte activation represents only one key event of the skin sensitisation AOP (2) (17), information generated with test methods developed to address this specific key event may not be sufficient to conclude on the presence or absence of skin sensitisation potential of chemicals. Therefore data generated with the test methods described in this Test Guideline are proposed to support the discrimination between skin sensitisers (i.e. UN GHS Category 1) and non-sensitisers when used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), together with other relevant complementary information, e.g. derived from in vitro assays addressing other key events of the skin sensitisation AOP as well as non-testing methods, including read-across from chemical analogues (17). Examples on the use of data generated with these methods within Defined Approaches, i.e. approaches standardised both in relation to the set of information sources used and in the procedure applied to derive predictions have been published (17) and can be employed as useful elements within IATA.

8. The test methods described in this Test Guideline cannot be used on their own, neither to sub-categorise skin sensitisers into subcategories 1A and 1B as defined by UN GHS (1), for authorities implementing these two optional subcategories, nor to predict potency for safety assessment decisions. However, depending on the regulatory

OECD/OCDE

442D

framework, positive results generated with these methods may be used on their own to classify a chemical into UN GHS category 1.

9. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is being tested¹ and is not related to the applicability of the test methods to the testing of mono-constituent substances, multi-constituent substances and/or mixtures. When testing in submerged cultures, it should be determined that the test chemical is dissolved in the exposure medium or at least forms a stable dispersion (e.g. by visual inspection of the test chemical dissolved/prepared at the maximal final test concentration in the exposure medium, showing that no undissolved residues remain and that no precipitate or phase separation forms if the solution is left to settle for several hours).

10. Limited information is currently available on the applicability of the test methods to multi-constituent substances/mixtures (18) (19) (20). Although not evaluated in the validation studies, the test methods may nevertheless be technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures. When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are meaningful scientifically. Moreover, when testing multi-constituent substances or mixtures, consideration should be given to possible interference of cytotoxic constituents with the observed responses (e.g. the presence of a high content of non-sensitising cytotoxic constituents may mask the response of weakly sensitising components or sensitising components present at low concentration). It might, depending on the particular case, be scientifically justified to test either single main constituents forming the major fraction or several fractions of the mixture to conclude on the sensitisation potential of the complex mixture.

Literature

- 1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- 2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 3) Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- 4) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- 5) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.

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

OECD/OCDE

442D

- 6) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation].
- 7) Ramirez T., Mehling A., Kolle S.N., Wruck C.J., Teubner W., Eitze T., Aumann A., Urbisch D., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2014). LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification. *Toxicol In Vitro* 28, 1482-1497.
- 8) Ramirez T., Stein N., Aumann A., Remus T., Edwards A., Norman K.G., Ryan C., Bader J.E., Fehr M., Burlison F., Foertsch L., Wang X., Gerberick F., Beilstein P., Hoffmann S., Mehling A., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2016). Intra- and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers. *Toxicol In Vitro* 32, 278-286.
- 9) ESAC (2016). ESAC opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing. Available at: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC103706/esac_opinion_2016-04_lusens_final.pdf].
- 10) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-NrF2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- 11) OECD (1992). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 406. Skin Sensitisation. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 12) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 429. Skin sensitization: Local Lymph Node assay. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 13) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 14) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442B. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: BrdU-ELISA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 15) OECD (2015). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 16) OECD (2017). OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the AOP Key Event on Activation of Dendritic Cells. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 17) OECD (2016). Series on Testing & Assessment No. 256: 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, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].
- 18) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. *Toxicology In Vitro* 27, 1220-1225.
- 19) Kolle, S.N., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2013). Alternative method in practice: Post-validation experience of the skin sensitization in vitro test strategy. *Toxicology Letters* 221, S204.

OECD/OCDE

442D

- 20) Settivari RS, Gehen SC, Amado RA, Visconti NR, Boverhof DR, Carney EW (2015). Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. Regul Toxicol Pharmacol; 72(2):350-60.

OECD/OCDE

442D

Annex: 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 (3).

AOP (Adverse Outcome Pathway): sequence of events from the chemical structure of a target chemical or group of similar chemicals through the molecular initiating event to an in vivo outcome of interest (2).

ARE: Antioxidant response element (also called EpRE, electrophile response element), is a response element found in the upstream promoter region of many cytoprotective and phase II genes. When activated by Nrf2, it mediates the transcriptional induction of these genes.

CV: Cell viability

Coefficient of variation: a measure of variability that is calculated for a group of replicate data by dividing the standard deviation by the mean. It can be multiplied by 100 for expression as a percentage.

CV75: The estimated concentration resulting in 75% cell viability.

EC1.5: Interpolated concentration resulting in a 1.5 fold luciferase induction.

Fold luciferase activity induction: Represents the ratio of luminescence of treated cells (minus blank) over the luminescence of the cells exposed to the concurrent solvent/vehicle control (minus blank).

IC30: Concentration effecting a reduction of cellular viability by 30%.

IC50: Concentration effecting a reduction of cellular viability by 50%.

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

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

Imax: Maximal induction factor of luciferase activity compared to the solvent (negative) control measured at any test chemical concentration.

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, is a sensor protein that can regulate the Nrf2 activity. Under un-induced conditions the Keap1 sensor protein targets the Nrf2 transcription factor for ubiquitinylation and proteolytic degradation in the proteasome. Covalent modification of the reactive cysteine residues of Keap 1 by small molecules can lead to dissociation of Nrf2 from Keap1 (4) (5) (6).

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more substances in which they do not react (1).

OECD/OCDE

442D

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

Multi-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which more than one main constituent is present in a concentration $\geq 10\%$ (w/w) and $< 80\%$ (w/w). A multi-constituent substance is the result of a manufacturing process. The difference between mixture and multi-constituent substance is that a mixture is obtained by blending of two or more substances without chemical reaction. A multi-constituent substance is the result of a chemical reaction.

Negative control: A sample containing all components of a test system and treated with a substance known not to induce a positive response in the test system. This sample is processed with test chemical-treated samples and other control samples.

Nrf2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, is a transcription factor involved in the antioxidant response pathway. When Nrf2 is not ubiquitinated, it builds up in the cytoplasm and translocates into the nucleus, where it combines to the ARE in the upstream promoter region of many cytoprotective genes, initiating their transcription (4) (5) (6).

Performance standards: Standards, based on a validated test method, that provide a basis for evaluating the comparability of a proposed test method that is mechanistically and functionally similar. Included are (i) essential test method components; (ii) a minimum list of reference chemicals selected from among the chemicals used to demonstrate the acceptable performance of the validated test method; and (iii) the comparable levels of accuracy and reliability, based on what was obtained for the validated test method, that the proposed test method should demonstrate when evaluated using the minimum list of reference chemicals (3).

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.

Proficiency chemicals (substances): A subset of the Reference Chemicals included in the Performance Standards that can be used by laboratories to demonstrate technical competence with a standardised test method. Selection criteria for these substances typically include that they represent the range of responses, are commercially available, and have high quality reference data available.

Reference chemicals (substances): A set of chemicals to be used to demonstrate the ability of a new test method to meet the acceptability criteria demonstrated by the validated reference test method(s). These chemicals should be representative of the classes of chemicals for which the test method is expected to be used, and should represent the full range of responses that may be expected from the chemicals for which it may be used, from strong, to weak, to negative.

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 (3).

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 (3).

OECD/OCDE

442D

Reproducibility: The agreement among results obtained from testing the same substance using the same test protocol (see reliability) (3).

Sensitivity: The proportion of all positive / active chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (3).

Solvent/vehicle control: A replicate containing all components of a test system except of the test chemical, but including the solvent that is used. It is used to establish the baseline response for the samples treated with the test chemical dissolved in the same solvent.

Specificity: The proportion of all negative / inactive chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (3).

Substance: Chemical elements and their compounds in the natural state or obtained by any production process, including any additive necessary to preserve the stability of the product and any impurities deriving from the process used, but excluding any solvent which may be separated without affecting the stability of the substance or changing its composition (1).

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

United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS): A system proposing the classification of chemicals (substances and mixtures) according to standardised types and levels of physical, health and environmental hazards, and addressing corresponding communication elements, such as pictograms, signal words, hazard statements, precautionary statements and safety data sheets, so that to convey information on their adverse effects with a view to protect people (including employers, workers, transporters, consumers and emergency responders) and the environment (1).

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

Validated Reference Method (VRM): the first method(s) endorsed as scientific valid and used as a reference for performance-based validation studies.

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 (3).

Xeno-free: which does not contain any element that is not from the same species as the cells used, in this case, human.

Literature

- 1) United Nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- 2) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence.

OECD/OCDE**442D**

Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)

- 3) OECD (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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 4) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- 5) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- 6) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.

OECD/OCDE

442D

Appendix IA: In Vitro Skin Sensitisation: The ARE-Nrf2 Luciferase KeratinoSens™ Test Method

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

1. The test method described in this Appendix to Test Guideline 442D addresses the second key event of the skin sensitisation AOP (1), namely keratinocytes activation, by assessing with the help of luciferase, the Nrf2-mediated activation of antioxidant response element (ARE)-dependent genes. Skin sensitisers have been reported to induce genes that are regulated by the ARE (2) (3). Small electrophilic substances such as skin sensitisers can act on the sensor protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), by e.g. covalent modification of its cysteine residue, resulting in its dissociation from the transcription factor Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). The dissociated Nrf2 can then activate ARE-dependent genes such as those coding for phase II detoxifying enzymes (2) (4) (5).
2. The in vitro ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ test method (hereafter called the KeratinoSens™ test method) underwent validation studies (3) (6) (7) followed by an independent peer review conducted by the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM) (8). The KeratinoSens™ test method was considered scientifically valid to be used as part of an IATA, to support the discrimination between skin sensitisers and non-sensitiser for the purpose of hazard identification (8).
3. Based on the dataset from the validation study and in-house testing used for the independent peer-review of the test method, the KeratinoSens™ test method proved to be transferable to laboratories experienced in cell culture techniques (8). The level of reproducibility in predictions that can be expected from the KeratinoSens™ test method is in the order of 85% within and between laboratories (8). The accuracy (77% - 155/201), sensitivity (78% - 71/91) and specificity (76% - 84/110) of the KeratinoSens™ test method for discriminating skin sensitisers (i.e. UN GHS Cat. 1) from non-sensitiser when compared to LLNA results were calculated by considering all of the data submitted to EURL ECVAM for evaluation and peer-review of the test method (8). These figures are similar to those published based on in-house testing of about 145 test substances (77% accuracy, 79% sensitivity, 72% specificity) (7). This information indicates the usefulness of the KeratinoSens™ test method to contribute to the identification of skin sensitisation hazard. However, the accuracy values given here for KeratinoSens™ test method as a stand-alone test method, are only indicative since the test method should be considered in combination with other sources of information in the context of a Defined Approach or an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 7 and 8 in the General Introduction of this Test Guideline. Furthermore when evaluating non-animal methods for skin sensitisation, it should be kept in mind that the LLNA test as well as other animal tests may not fully reflect the situation in humans.

OECD/OCDE

442D

4. On the basis of the current data available, the KeratinoSens™ test method was shown to be applicable to test chemicals covering a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potency (as determined with *in vivo* studies) and physico-chemical properties (3) (6) (7) (8). The test method is applicable to test chemicals soluble or that form a stable dispersion in the exposure medium (i.e. a colloid or suspension in which the test chemical does not settle or separate from the solvent into different phases). Test chemicals that do not fulfil these conditions at the highest final required concentration of 2 000 µM may still be tested at lower concentrations. In such a case, results fulfilling the criteria for positivity could still be used to support the identification of the test chemical as a skin sensitiser. In cases where a negative result is obtained in a test with a maximal concentrations < 1000 µM and no cytotoxicity is reached, the result should be considered as inconclusive (see prediction model in paragraph 32). If cytotoxicity (< 70% viability) is reached at a maximal soluble test concentration < 1000 µM, criteria for negativity can still be applied. In general mono constituent substances with a LogP above 7 may be insoluble in the exposure medium, however, if solubility or stable dispersion can be obtained and documented, testing may still be conducted.

5. Negative results should be interpreted with caution as substances with an exclusive reactivity towards lysine-residues can be detected as negative by the test method as the key mechanism leading to the activation of the Keap1-Nrf2-ARE pathway appears to be the electrophilic reaction of stressors with nucleophilic thiols (cysteine sulfhydryl groups) of Keap-1. Complementary information from peptide reactivity assays may help addressing this uncertainty, in particular assays able to distinguish between cysteine and lysine reactivity. Furthermore, because of the limited metabolic capability of the cell line used (10) and because of the experimental conditions, pro-haptens (i.e. chemicals requiring enzymatic activation for example via P450 enzymes) and pre-haptens (i.e. chemicals activated by auto-oxidation) in particular with a slow oxidation rate may also provide negative results. However, it has been shown that the majority of pre-haptens (i.e. chemicals activated by auto-oxidation) and pro-haptens (i.e. chemicals requiring enzymatic activation for example via P450 enzymes) are sufficiently well identified by a combination of test methods covering key events 1, 2 and 3 on the AOP so that negative results can in general be used to support classification (12) (20) (34). On the other hand, test chemicals that do not act as a sensitiser but are nevertheless chemical stressors may lead to false positive results (8). Finally, test chemicals that interfere with the luciferase enzyme can confound the activity of luciferase in cell-based assays causing either apparent inhibition or increased luminescence (13). For example, phytoestrogen concentrations higher than 1 µM were reported to interfere with the luminescence signals in other luciferase-based reporter gene assays due to over-activation of the luciferase reporter gene (14) As a consequence, luciferase expression obtained at high concentrations of phytoestrogens or similar compounds suspected of producing phytoestrogen-like over-activation of the luciferase reporter gene needs to be examined carefully (14). In cases where evidence can be demonstrated on the non-applicability of the KeratinoSens™ test method to other specific categories of test chemicals, the test method should not be used for those specific categories.

6. In addition to supporting discrimination between skin sensitisers (i.e. UN GHS Category 1) and non-sensitisers, the KeratinoSens™ test method also provides concentration-response information that may potentially contribute to the assessment of sensitising potency when used in integrated approaches such as IATA (11) (15). Examples on how to use the KeratinoSens™ test method results in combination with other information sources are reported in the literature (7) (11) (16) (17) (18) (19) (20). Specifically, the use of KeratinoSens™ test method dose-response data along with quantitative peptide reactivity data to assess potency in the LLNA and in human tests has been described (21) and has been used in Bayesian integrated testing strategies on LLNA potency (11) (22). Furthermore, evaluation has been conducted on how to specifically address potency in humans (23). Finally, the use of KeratinoSens™ test method to assess potency of specific chemical classes has also been described (21) (24).

OECD/OCDE

442D

7. Definitions are provided in the Annex 1 of the General Introduction.

PRINCIPLE OF THE TEST

8. The KeratinoSens™ test method makes use of an immortalised adherent cell line derived from human keratinocytes stably harbouring a luciferase reporter gene under the control of the antioxidant response element of the human AKR1C2 gene (25). This gene is known to be up-regulated by skin sensitisers (26) (27). The cell line contains the luciferase gene under the transcriptional control of a constitutive promoter fused with the ARE element. The luciferase signal reflects the activation by sensitisers of endogenous Nrf2 dependent genes, and the dependence of the luciferase signal in the recombinant cell line on Nrf2 has been demonstrated (28). This allows quantitative measurement (by luminescence detection) of luciferase gene induction, using well established light producing luciferase substrates, as an indicator of the activity of the Nrf2 transcription factor in cells following exposure to electrophilic test substances.

9. Test chemicals are considered positive in the KeratinoSens™ test method if they induce a statistically significant induction of the luciferase activity above a given threshold (i.e. ≥ 1.5 fold, or 50% increase), below a defined concentration which does not significantly affect cell viability (i.e. below 1000 μM and at a concentration at which the cellular viability is above 70% (3) (6). For this purpose, the maximal fold induction of the luciferase activity over solvent (negative) control (I_{max}) is determined. Furthermore, since cells are exposed to series of concentrations of the test chemicals, the concentration needed for a statistically significant induction of luciferase activity above the threshold (i.e. $\text{EC}_{1.5}$ value) should be interpolated from the dose-response curve obtained from the series of tested concentrations of the test chemical (see paragraph 26 for calculations). Finally, parallel cytotoxicity measurements should be conducted to assess whether luciferase induction occurs at sub-cytotoxic concentrations.

10. Prior to routine use of the KeratinoSens™ test method that adheres to this Test Guideline, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the ten Proficiency Substances listed in Annex 1 of this Appendix.

11. Performance standards (PS) (29) are available to facilitate the validation of new or modified in vitro ARE-Nrf2 luciferase test methods similar to the KeratinoSens™ VRM and allow for timely amendment of this Test Guideline for their inclusion. Mutual Acceptance of Data (MAD) will only be guaranteed for test methods validated according to the PS, if these test methods have been reviewed and included in this Test Guideline by the OECD.

PROCEDURE

12. A DB-ALM protocol for the KeratinoSens™ test method is available and should be employed when implementing and using the test method in the laboratory (9). Laboratories implementing the test method can obtain the recombinant cell line used in the KeratinoSens™ test method by signing a standard agreement with the test method developer² which includes the licence for the commercial use of the luciferase gene. The luciferase reporter gene assay is also subject to a Promega limited use licence that requires the use of luminescent assay reagents purchased from Promega. The following paragraphs provide with a description of the main components and procedures of the KeratinoSens™ test method. Furthermore, an adaptation of the KeratinoSens™ test method to xeno-free culture conditions using human reagents is described in Annex 2 of this Appendix (33).

² Givaudan Schweiz AG, CH-8310 Kempthal

OECD/OCDE

442D

However, it is recommended that the relevant regulatory authorities be consulted before deciding on the type of serum to be used in the KeratinoSens™ test method.

Preparation of the keratinocyte cultures

13. The KeratinoSens™ transgenic cell line having a stable insertion of the luciferase reporter gene under the control of the ARE-element should be used. Upon receipt, KeratinoSens™ cells are propagated as defined by the test method protocol (e.g. 2 to 4 passages) and stored frozen as a homogeneous stock. Cells from this original stock can be propagated up to maximum 25 passages and are employed for routine testing using the maintenance/growth medium (Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) containing serum and Geneticin to allow maintaining the gene) as described within the test method's DB-ALM protocol (9).

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

Preparation of the test chemical and control substances

15. The test chemical and control substances are prepared on the day of testing. Test chemicals are dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, CAS No. 67-68-5, $\geq 99\%$ purity) to the final desired concentration (e.g. 200 mM). The DMSO solutions can be considered self-sterilising, so that no sterile filtration is needed. Test chemicals not soluble in DMSO are dissolved in sterile water or culture medium, and the solutions sterilised by e.g. filtration. For a test chemical which has no defined molecular weight (MW), a stock solution is prepared to the default concentration of 40 mg/mL or 4% (w/v). In case solvents other than DMSO, water or the culture medium are used, appropriate scientific rationale should be provided.

16. Based on the stock solutions of the test chemical, serial dilutions are made using DMSO or a suitable solvent (i.e. sterile water or culture medium) to obtain 12 master concentrations of the chemical to be tested (from 0.098 to 200 mM). Independent of the solvent used, the master concentrations, are then further diluted 25 fold into culture medium containing serum, and finally used for treatment with a further 4 fold dilution factor so that the final concentrations of the tested chemical range from 0.98 to 2000 μM (based on a dilution factor of 2). Alternative concentrations may be used upon justification (e.g. in case of cytotoxicity or poor solubility). For a test chemical which has no defined MW, serial dilutions are made using DMSO or a suitable solvent to obtain the desired final concentrations of the test chemical (e.g. 12 concentrations ranging from 0.196 to 400 $\mu\text{g/ml}$).

17. A concurrent solvent/vehicle control should be tested within each repetition (i.e. DMSO), for which a sufficient number of wells should be prepared per plate (i.e. six). The solvent/vehicle control undergoes the same dilutions as described for the master concentrations in paragraph 16, so that the final solvent/vehicle control concentration is 1%, known not to affect cell viability and corresponding to the same concentration of DMSO found in the tested chemical and in the positive control. For a test chemical not soluble in DMSO, for which the dilutions were made in water, the DMSO level in all wells of the final test solution must be adjusted to 1% as for the other test chemicals and control substances. This solvent/vehicle control (i.e. DMSO) also represents the negative control for the KeratinoSens™ test method.

OECD/OCDE

442D

18. A concurrent positive control should also be tested in a sufficient number of wells within each repetition as described within the DB-ALM protocol (9) to demonstrate appropriate response of the test system. For example, five concentrations of cinnamic aldehyde (CAS No. 14371-10-9, $\geq 98\%$ purity) are used within each replicate in the KeratinoSens™ test method, for which a series of 5 master concentrations ranging from 0.4 to 6.4 mM are prepared in DMSO (from a 6.4 mM stock solution) and diluted as described for the master concentrations in paragraph 16, so that the final concentration of the positive control range from 4 to 64 μM . Other suitable positive controls, preferentially providing EC_{1.5} values in the mid-range, may be used if historical data are available to derive comparable run acceptance criteria.

Application of the test chemical and control substances

19. For each test chemical and positive control substance, one experiment is needed to derive a prediction (positive or negative), consisting of at least two independent repetitions containing each three replicates (i.e. n=6). In case of discordant results between the two independent repetitions, a third repetition containing three replicates should be performed (i.e. n=9). Each independent repetition is performed on a different day with fresh stock solution of test chemicals and independently harvested cells. Cells may come from the same passage however.

20. After seeding as described in paragraph 14, cells are grown for 24 hours in the 96-wells microtiter plates. The medium is then removed and replaced with fresh culture medium (150 μl culture medium containing serum but without Geneticin as described within the DB-ALM protocol (9)) to which 50 μl of the 25 fold diluted test chemical and control substances are added. At least one well per plate should be left empty (no cells and no treatment) to assess background values.

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

Luciferase activity measurements

22. The following factors are critical to ensure appropriate luminescence readings:
- the choice of a sensitive luminometer,
 - the use of a plate format with sufficient height to avoid light-cross-contamination,
 - the use of a luciferase substrate with sufficient light output to ensure sufficient sensitivity and low variability; and
 - an appropriate and stable background level.

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

23. After the 48 hour exposure time with the test chemical and control substances, cells are washed with a phosphate buffered saline, and the relevant lysis buffer for luminescence readings added to each well for a sufficient time (e.g. 20 min at room temperature).

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

OECD/OCDE

442D

Cytotoxicity Assessment

25. For the KeratinoSens™ cell viability assay, medium is replaced after the 48 hour exposure time with fresh medium containing 5 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1) and cells are incubated for 4 hours at 37±1°C in the presence of 5% CO₂. The MTT medium is then removed and cells are lysed by using an appropriate lysing agent for a sufficient amount of time (e.g. 10% SDS overnight). After shaking, the absorption is then measured at i.e. 600 nm with a photometer as described in the test method protocols (9).

DATA AND REPORTING

Data evaluation

26. The following parameters are calculated in the KeratinoSens™ test method:
- the maximal average fold induction of luciferase activity (*I*_{max}) value observed at any concentration of the tested chemical and positive control;
 - the EC_{1.5} value representing the concentration for which induction of luciferase activity is above the 1.5 fold threshold (i.e. 50% enhanced luciferase activity) was obtained; and
 - the IC₅₀ and IC₃₀ concentration values for which 50% and 30% reduction of cellular viability occur respectively.

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

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

where

*L*_{sample} is the luminescence reading in the test chemical well

*L*_{blank} is the luminescence reading in the blank well containing no cells and no treatment

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

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

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

where

*C*_a is the lowest concentration in µM with > 1.5 fold induction

*C*_b is the highest concentration in µM with < 1.5 fold induction

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

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

Viability is calculated by Equation 3:

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

where

OECD/OCDE

442D

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

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

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

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

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

where

X is the % reduction at the concentration to be calculated (50 and 30 for IC_{50} and IC_{30})

C_a is the lowest concentration in μM with > x% reduction in viability

C_b is the highest concentration in μM with < x% reduction in viability

V_a is the % viability at the lowest concentration with > x% reduction in viability

V_b is the % viability at the highest concentration with < x% reduction in viability

27. For each concentration showing a luciferase activity induction equal or higher (\geq) than 1.5 fold, statistical significance is determined (e.g. using a two-tailed Student's t-test) by comparing the luminescence values of the three replicate samples with the luminescence values in the solvent/vehicle control wells to assess whether the luciferase activity induction is statistically significant ($p < 0.05$). Furthermore, it should be checked that no significant cytotoxic effects occur at the lowest concentration leading to ≥ 1.5 fold luciferase induction and that this concentration is below the IC_{30} value, indicating that there is less than or equal to 30% reduction in cellular viability. In addition, at least two consecutive concentrations should have > 70% viability, otherwise the concentration range should be adjusted.

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

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

30. Finally, for test chemicals generating in the KeratinoSens™ test method a 1.5 fold or higher induction already at the lowest tested concentration (i.e. 0.98 μM), the EC1.5 value of <0.98 is set based on visual inspection of the dose-response curve.

Acceptance criteria

31. The following acceptance criteria should be met when using the KeratinoSens™ test method.

- The luciferase activity induction obtained with the positive control, cinnamic aldehyde, should be statistically significant above the threshold of 1.5 (e.g. using a t-test) in at least one of the tested concentrations (4 to 64 μM).
- The EC1.5 value of the positive control should be within two standard deviations of the historical mean of the testing facility (e.g. between 7 μM and 30 μM based on the validation dataset) which should be regularly updated. In addition, the average induction in the three replicates for cinnamic aldehyde at 64 μM should be between 2 and 8. If the latter criterion is not fulfilled, the dose-response of

OECD/OCDE

442D

cinnamic aldehyde should be carefully checked, and tests may be accepted only if there is a clear dose-response with increasing luciferase activity induction at increasing concentrations for the positive control.

- The average coefficient of variation of the luminescence reading for the solvent/vehicle control (i.e. DMSO) should be below 20% in each repetition. If the variability is higher, results should be discarded.

Interpretation of results and prediction model

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

- the I_{max} is equal or higher than (\geq) 1.5 fold and statistically significantly different as compared to the solvent/vehicle control (as determined by a two-tailed, unpaired Student's T-test);
- the cellular viability is higher than ($>$) 70% at the lowest concentration with induction of luciferase activity ≥ 1.5 fold (i.e. at the $EC_{1.5}$ determining concentration);
- the $EC_{1.5}$ value is less than ($<$) 1000 μ M (or $<$ 200 μ g/mL for test chemicals with no defined MW);
- there is a dose-dependent increase in luciferase induction (or a biphasic response as mentioned under paragraph 28).

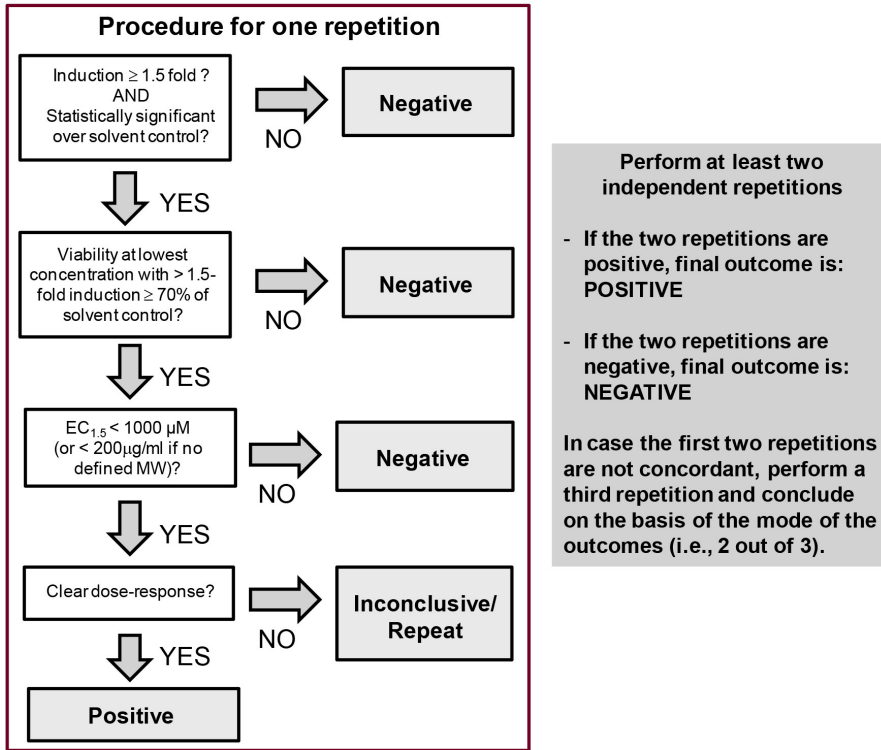
If in a given repetition, all of the three first conditions are met but a clear dose-dependent increase in luciferase induction cannot be observed, then the result of that repetition should be considered inconclusive and further testing may be required (Figure 1). In addition, a negative result obtained with test chemicals tested at a maximal test concentration $<$ 1000 μ M (or 200 μ g/mL for test chemicals with no defined MW) and which do not reach cytotoxicity ($<$ 70% viability) at the maximal tested concentration should also be considered as inconclusive (see paragraph 4).

OECD/OCDE

442D

Figure 1. Prediction model used in the KeratinoSens™ test method.

A KeratinoSens™ prediction should be considered in the framework of a Defined Approach or of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 7 and 8 of the general introduction



OECD/OCDE

442D

33. In cases when test chemicals induce the luciferase activity very close to the cytotoxic levels, they can be positive in some repetitions at non-cytotoxic levels (i.e. EC_{1.5} determining concentration below (<) the IC₃₀), and in other repetitions only at cytotoxic levels (i.e. EC_{1.5} determining concentration above (>) the IC₃₀). Such test chemicals shall be retested with more narrow dose-response analysis using a lower dilution factor (e.g. 1.33 or $\sqrt{2}$ (=1.41) fold dilution between wells), to determine if induction has occurred at cytotoxic levels or not (3).

Test report

34. The test report should include the following information:

Test chemical

- Mono-constituent substance
 - Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers, like batch/lot number and expiry date;
 - Physical appearance, water solubility, DMSO solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Statement on (in)solubility or stable dispersion in exposure media;
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available.
- Multi-constituent substance, UVCB and mixture:
 - Characterisation as far as possible by e.g. chemical identity (see above), purity, quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available;
 - Physical appearance, water solubility, DMSO solubility and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Molecular weight or apparent molecular weight in case of mixtures/polymers of known compositions or other information relevant for the conduct of the study;
 - Statement on (in)solubility or stable dispersion in exposure media;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available.

Controls

- Positive control
 - Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
 - Physical appearance, water solubility, DMSO solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available and where applicable;

OECD/OCDE

442D

- Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
- Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
- Concentration(s) tested;
- Storage conditions and stability to the extent available;
- Reference to historical positive control results demonstrating suitable run acceptance criteria, if applicable.
- Solvent/vehicle/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 solvents/vehicles /negative controls than those mentioned in this Appendix are used and to the extent available;
 - Storage conditions and stability to the extent available;
 - Justification for choice of solvent/vehicle for each test chemical.

Test method conditions

- Name and address of the sponsor, test facility and study director;
- Description of test method used;
- Cell line used, its storage conditions and source (e.g. the facility from which they were obtained);
- Passage number and level of confluence of cells used for testing;
- Cell counting method used for seeding prior to testing and measures taken to ensure homogeneous cell number distribution (cf. paragraph 14);
- Luminometer used (e.g. model), including instrument settings, luciferase substrate used, and demonstration of appropriate luminescence measurements based on the control test described in Annex 3 of this Appendix;
- The procedure used to demonstrate proficiency of the laboratory in performing the test method (e.g. by testing of proficiency substances) or to demonstrate reproducible performance of the test method over time.

Test procedure

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

OECD/OCDE

442D

Results

- Tabulation of I_{max}, EC_{1.5} and viability values (i.e. IC₅₀, IC₃₀) obtained for the test chemical and for the positive control for each repetition as well as the mean values (I_{max}: average; EC_{1.5} and viability values: geometric mean) and SD calculated using data from all individual repetitions and an indication of the rating of the test chemical according to the prediction model;
- Coefficient of variation obtained with the luminescence readings for the solvent/vehicle/negative control for each experiment;
- A graph depicting dose-response curves for induction of luciferase activity and viability;
- Description of any other relevant observations, if applicable.

Discussion of the results

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

Conclusion

Literature

- 1) OECD (2012). Series on Testing and Assessment No. 168. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- 2) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. *Toxicological Sciences* 113, 284-292.
- 3) Emter R., Ellis G., Natsch A.(2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245, 281-290.
- 4) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779-1791.
- 5) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1, 45-49.
- 6) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers in vitro: results of a ring-study in five laboratories. *Toxicol. In Vitro* 25, 733-744.
- 7) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1337-1352.
- 8) EURL-ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

OECD/OCDE

442D

- 9) DB-ALM (INVITTOX) (2013) Protocol 155: KeratinoSens™., 17 pp. Available: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- 10) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.
- 11) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1353-1364.
- 12) Casati S., Aschberger K., Asturiol D., Basketter D., Dimitrov S., Dumont C., Karlberg A.T., Lepoittevin J.P., Patlewicz G., Roberts D.W., Worth A. (2016). Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. EUR 27752 EN. Available at : <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-status-reports/pre-prohaptent-workshop-report>.
- 13) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chemistry and Biology* 17, 646-657.
- 14) OECD (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 15) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- 16) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining in vitro methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 489-504.
- 17) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different in vitro and in silico assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. *Toxicol. Sci.* 107, 106-121.
- 18) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 60, 389-400.
- 19) Urbisch D., Mehling A., Guth K., Ramirez T., Honarvar N., Kolle S., Landsiedel R., Jaworska J., Kern P.S., Gerberick F., Natsch A., Emter R., Ashikaga T., Miyazawa M., Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.
- 20) Urbisch D., Becker M., Honarvar N., Kolle S.N., Mehling A., Teubner W., Wareing B., Landsiedel R. (2016). Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Non-animal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
- 21) Natsch A, Emter R, Gfeller H, Haupt T, Ellis G (2015). Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicol Sci* 143, 319-332.
- 22) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol* 89, 2355-2383.
- 23) Strickland J, Zang Q, Paris M, Lehmann DM, Allen D, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Casey W, Kleinstreuer N (2017). Multivariate models for prediction of human skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol* 37, 347-360.

OECD/OCDE**442D**

- 24) Delaine T, Ponting DJ, Niklasson IB, Emter R, Hagvall L, Norrby PO, Natsch A, Luthman K, Karlberg AT (2014). Epoxyalcohols: bioactivation and conjugation required for skin sensitization. *Chem Res Toxicol* 27, 1860-1870.
- 25) Wasserman W.W., Fahl W.E. (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 387-396.
- 26) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1813-1822.
- 27) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I. And Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301-316.
- 28) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol. In Vitro* 27, 2225-2232.
- 29) OECD (2015). Guidance Document No 213. Performance Standards for assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. Series on Testing and Assessment. Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- 30) 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. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 31) United nations (UN) (2017). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications. Available at: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html]
- 32) Basketter D.A., Alépée N., Ashikaga T., Barroso J., Gilmour N., Goebel C., Hibatallah J., Hoffmann S., Kern P., Martinuzzi-Teissier S., Maxwell G., Reisinger K., Sakaguchi H., Schepky A., Tailhardat M., Templier M. (2014). Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
- 33) Belot N, Sim B, Longmore CL, Roscoe L, Treasure C. (2017) Adaptation of the KeratinoSens™ skin sensitisation test to animal-product-free cell culture. *ALTEX*. 2017 Mar 16. doi: 10.14573/altex.1701311
- 34) 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*, 82, 147-155.

OECD/OCDE

442D

APPENDIX IA - ANNEX 1: PROFICIENCY SUBSTANCES

In Vitro Skin Sensitisation: The ARE-Nrf2 Luciferase KeratinoSens™ Test Method

Prior to routine use of a test method that adheres to this Appendix of Test Guideline 442D, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly obtaining the expected KeratinoSens™ prediction for the 10 Proficiency Substances recommended in Table 1 and by obtaining the EC_{1.5} and IC₅₀ values that fall within the respective reference range for at least 8 out of the 10 proficiency substances. These Proficiency Substances were selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazards. Other selection criteria were commercial availability, availability of high quality in vivo reference, and availability of high quality in vitro data from the KeratinoSens™ test method.

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

| Proficiency Substances | CASRN | Physical Form | LLNA Prediction (1) | Human category (2) | KeratinoSens™ Prediction (3) | EC _{1.5} (µM) Reference Range (4) | IC ₅₀ (µM) Reference Range (5) |
|--------------------------------|------------|---------------|-----------------------|--------------------|------------------------------|--|---|
| Salicylic acid | 69-72-7 | Solid | Non-sensitiser | Cat. 6 | Negative | > 1000 | > 1000 |
| Lactic acid | 50-21-5 | Liquid | Non-sensitiser | Cat. 6 | Negative | > 1000 | > 1000 |
| Glycerol | 56-81-5 | Liquid | Non-sensitiser | Cat. 6 | Negative | > 1000 | > 1000 |
| Isopropanol | 67-63-0 | Liquid | Non-sensitiser | Cat. 5 | Negative | > 1000 | > 1000 |
| Ethylene glycol dimethacrylate | 97-90-5 | Liquid | Sensitiser (weak) | Cat. 4 | Positive | 5 - 125 | > 500 |
| Cinnamyl alcohol | 104-54-1 | Solid | Sensitiser (weak) | Cat. 3 | Positive | 25 - 175 | > 1000 |
| 2-Mercaptobenzothiazole | 149-30-4 | Solid | Sensitiser (moderate) | Cat. 3 | Positive | 25 - 250 | > 500 |
| 4-Methylaminophenol sulfate | 55-55-0 | Solid | Sensitiser (strong) | Cat. 3 | Positive | < 12.5 | 20 - 200 |
| Methyldibromom | 35691-65-7 | Solid | Sensitiser | Cat. 2 | Positive | < 20 | 20 - 100 |

OECD/OCDE

442D

| | | | | | | | |
|--|---------|-------|-------------------------|--------|----------|--------|--------|
| glutaronitri le | | | (strong) | | | | |
| 2,4-Dinitro- chlorobenz ene | 97-00-7 | Solid | Sensitiser (extreme) | Cat. 1 | Positive | < 12.5 | 5 - 20 |

Notes: (1) The in vivo hazard (and potency) predictions are based on LLNA data (7). The in vivo potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (15); (2) According to Basketter and co-workers (32), Cat. 1 represents clear evidence of contact allergy, Cat. 2 a frequent cause of contact allergy, Cat. 3 a common cause of contact allergy, Cat. 4 an infrequent cause of contact allergy, Cat. 5 a rare cause of contact allergy, and Cat. 6 essentially absent evidence of contact allergy (32). (3) A KeratinoSens™ prediction should be considered in the framework of a Defined Approach or of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 7 and 8 of the general introduction. (4) Based on the historical observed values (6).

OECD/OCDE

442D

APPENDIX IA - ANNEX 2: ADAPTATION OF THE KERATINOSENS™ TEST METHOD
USING HUMAN REAGENTS TO ACHIEVE XENO-FREE CELL CULTURE

The following adaptation to the KeratinoSens™ test method may be performed using human reagents (human serum and recombinant human trypsin) to achieve xeno-free cell culture, subject to demonstration of technical proficiency (as described in Annex 1) using the adapted method (33).

Table 2. Summary of adaptations

| Aspect of the Method | Validated Reference Method (KeratinoSens™) (Appendix 1A) | Xeno-Free Adaptation (this Annex) |
|---------------------------------------|---|---|
| Serum ¹ | States "serum" (DB-ALM protocol 155 states Foetal Calf Serum) (paragraph 13) | Specifies 10% human serum |
| Cytotoxicity measurement ² | MTT: 4hrs incubation; solubilise in 10% SDS overnight; read at 600nm (paragraph 25) | MTT (1mg/ml): 3hrs incubation; solubilise in isopropanol; read at 570nm |
| Positive control ² | Cinnamic aldehyde 4-64µM (paragraph 18) | Cinnamic aldehyde 8-128µM. |
| Trypsin ¹ | Not specified (DB-ALM protocol 155 states Trypsin EDTA) | Non-animal recombinant trypsin (TrypZean, Sigma-Aldrich T3499) |

Note: ¹adaptations to achieve xeno-free conditions; ²other adaptations to the method (33).

Prior to use for testing purposes, the KeratinoSens™ cell line should be adapted to routine culture using 10% human serum. Human serum (from pooled donors) should be obtained from a reliable commercial source, with appropriate donor consent and QC testing for cell culture applications. As with any type of serum, when a new batch is used, an internal validation of the batch including cell morphology, growth rates and I_{max} / $EC_{1.5}$ values with at least the positive control, and preferably representative reference chemicals (at least one sensitiser and one non sensitiser) should be conducted, with subsequent reservation of successfully performing batches for long term use. If the cells have previously been cultured in foetal calf serum, they should be weaned into human serum over at least 3 passages. Provided that the cells are showing healthy morphology and comparable growth rates with those in foetal calf serum, a cell bank should then be created for future use. It should be noted that the KeratinoSens™ cell line, when cultured in human serum, should be cultured up to a maximum passage number of 22 for optimal performance, including the number taken to adapt them to human serum. To achieve fully xeno-free cell culture, a non-animal source of recombinant trypsin (for example, Trypzean™) should be used to harvest the cells during sub-culture (33). In all other respects, the cells should be cultured in the same way as described in this Appendix to Test Guideline 442D and the DB-ALM protocol (9) for the reference KeratinoSens™ cell line

With reference to paragraph 18, the xeno-free adaptation of the KeratinoSens™ test method using human reagents has been optimised using cinnamic aldehyde (CAS No. 14371-10-9, >98% purity) as a positive control, at a final concentration range from 8 to 128µM. Other positive controls, preferentially providing $EC_{1.5}$ values in the mid-range, may be used if historical data are available to derive comparable run acceptance criteria (33).

OECD/OCDE

442D

With reference to paragraph 25, the xeno-free adaptation of the KeratinoSens™ test method using human reagents has been optimised using the following method for cytotoxicity assessment. Medium is replaced after the 48 hour exposure time with fresh medium containing MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; CAS No. 298-93-1) at a concentration of 1mg/ml, and cells incubated for 3 hours at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in the presence of 5% CO_2 . The MTT medium is then removed and cells are solubilised by the addition of isopropanol. After shaking for 30 minutes, the absorption is measured at 570 nm with a spectrophotometer.

All other aspects the xeno-free adaptation of the KeratinoSens™ test method using human reagents should be conducted in the same way as described for the standard method described in this Appendix to Test Guideline 442D and the DB-ALM protocol (9) for the reference KeratinoSens™ cell line.

OECD/OCDE

442D

APPENDIX IA - ANNEX 3: QUALITY CONTROL OF LUMINESCENCE MEASUREMENTS

Basic experiment for ensuring optimal luminescence measurements in the KeratinoSens™ test method

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

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

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

Table 1. Plate setup of first training experiment

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

Notes: EGDMA = Ethylene glycol dimethacrylate (CAS No.: 97-90-5) a strongly inducing compound. C = Cinnamic aldehyde, positive reference (CAS No.: 104-55-2). Concentrations are given in μM

The quality control analysis should demonstrate:

- a dose-dependent increase in luciferase induction in row D, with the $I_{\text{max}} > 20$ fold above background (in most cases I_{max} values between 100 and 300 are reached);
- a dose-dependent increase in luciferase induction in wells H7 to H11, with a fold induction of 2 to 8 in well H11;
- no dose-dependent increase in luciferase induction in row C and E (no induction value equal or above 1.5 (ideally not above 1.3) due to possible light contamination especially next to strongly active wells in the EGDMA row;

OECD/OCDE

442D

- no statistically significant difference between the rows A, B, C, E, F and G. (i.e. no gradient over plate); and
- variability in any of the rows A, B, C, E, F and G and in the DMSO wells in row H should be below 20% (i.e. stable background).

**“화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법(KeratinoSens™))
가이드라인(민원인 안내서)”**

발 행 일 2024년 3월
발 행 인 식품의약품안전평가원장
편 집 위 원 장 독성평가연구부장 오재호
편 집 위 원 이종권, 김주환, 방서영, 강남희, 현민경, 이수빈
문 의 처 Tel : 043-719-5502, 5506
주 소 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,
오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

공익신고자 보호제도란?

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

[공직자 부조리 및 공직신고안내]

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

♣ 보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과.
전화 044-200-7773