

## ITS 접근법을 활용한 Unsaturated fatty acid의 in vitro 피부 감작성 평가

박세라, 김지훈, 조선아, 이준환, 안수선\*

(주) 아모레퍼시픽 R&D Unit

### Assessment of Skin Sensitization for Unsaturated Fatty Acid Using Integrated Testing Strategy (ITS) Approaches

Sae-Ra Park, Ji-Hoon Kim, Sun-A Cho, John-Hwan Lee, Su-Sun An\*

AmorePacific Corporation R&D Unit, 1920, Yonggu-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Kyonggi-do, 17074, Korea

**ABSTRACT.** The local lymph node assay (LLNA)는 기니피그를 이용한 화학물질의 감작성 평가의 대체법 중 하나로 threshold dose를 정하는데 적합하다는 장점이 있다. 그러나 몇몇 물질에서 위양성 결과를 보인다는 보고가 있는데, 대표적으로 unsaturated carbon-carbon double bond를 가진 화학물질이 LLNA에서 위양성을 보이고 있다. In vitro 피부 감작 대체법들은 복잡한 생물학적 과정의 감작성 메커니즘 중 하나만 대변하므로, 한 가지 시험법만으로 평가하기에는 한계가 있다. 그러므로 최근에는 예측력을 높이기 위해 대체 시험법들을 조합하는 방식인 Integrated Testing Strategies (ITS) 개념을 활용하고 있으며, 본 연구에서도 피부 감작성을 평가하는 시험법들을 이용한 ITS접근법으로 Unsaturated fatty acid의 위양성 관정을 극복할 수 있는지 알아보았다. 그 결과, GPMT결과와 비교시 LLNA결과는 33.33%의 accuracy를 보이는 반면 피부 감작성 대체시험법들은 66.6~83.3%의 accuracy로 더 높은 정확도를 보였다. 단일 시험법 외에도 두 가지 혹은 세 가지 시험법을 조합한 ITS접근법으로 피부 감작성을 판정하였는데, Spectro-DPRA와 ARE-Nrf2 Luciferase Test를 조합한 ITS접근법과 세 가지 시험법 조합법 중 셋 다 양성을 양성으로 판단하는 조합법이 가장 높은 accuracy를 보였다. 따라서 Unsaturated fatty acid와 유사한 단일 원료 혹은 이들 원료를 함유하는 복합 물질의 평가시에는 이와 같은 ITS접근법으로 평가하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.

**KEY WORDS:** skin sensitization, Spectro-DPRA, ARE-Nrf2 Luciferase Test, LuSens, h-CLAT, Unsaturated fatty acid, Integrated Testing Strategy (ITS)

## I. 서 론

The local lymph node assay (LLNA)는 기니피그를 이용한 화학물질의 감작성 평가의 대체법 중 하나로 OECD 가이드라인에도 등재되어 있고 (OECD TG 429) 현재 감작성 평가에 널리 사용되고 있는 시험법이다. LLNA는 threshold dose를 정하는데 적합하다는 장점이 있으나, 몇몇 물질에서는 위양성의 결과를

보인다는 보고가 있다 (Vohr H.E et al., 2005). 이는 면역과정 중 비특이적 세포활성 (non-specific cell activation)으로 인해 나타나는 결과로 보여지며, 이러한 현상은 unsaturated carbon-carbon double bond를 가진 화학물질들도 GPMT와 비교시 LLNA에서 위양성을 보인다는 연구 보고가 있다 (R.Kreiling et al., 2008; Thomas Armin Frohwein et al., 2015).

피부감작성과 관련된 다양한 동물실험 대체법들은 유럽연합의 화장품 원료 및 완제품에 대한 동물실험 금지에 따라 이를 평가하기 위해 개발되었다. 그러나, 피부 감작반응은 복잡한 생물학적 과정을 거쳐 유발되는 만큼 한 가지 시험법만으로 평가하기에는 한계가 있다 (Corsini et al., 2009; dos Santos et al., 2009). 이러한 이유로 최근에는 피부감작성의 예측력을 높이기 위한 접근법으로 신뢰도 높은 대체시험법들을

Received: 23 November 2016  
Revised: 13 December 2016  
Accepted: 15 December 2016

\* Corresponding author: Su-Sun An  
Tel: +82-31-280-5851  
Fax: +82-31-284-8478  
Email: ssan@amorepacific.com

조합하는 방식인 Integrated Testing Strategies(ITS) 개념이 각광받고 있다 (Jaworska *et al.*, 2011; Osamu Takenouchi, 2015).

본 연구에서는 LLNA에서 위양성을 보인다고 알려진 unsaturated fatty acid를 피부감작성 메커니즘의 3가지 key event인 단백질과의 반응성 (Spectro-DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay), 피부세포의 활성화 (ARE-Nrf2 Luciferase Test, LuSens), 면역세포의 활성화 (h-CLAT) 측면에서 접근하여 각 key event에 해당하는 시험법들을 이용한 ITS 접근법으로 평가하여 unsaturated fatty acid에 의한 위양성의 한계를 극복할 수 있는지 연구하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험물질

Local Lymph Node Assay(LLNA)에서 위양성을 보이는 unsaturated fatty acid 8종 (Oleic acid,

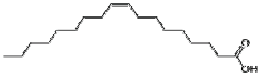
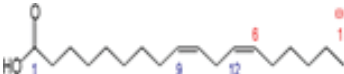
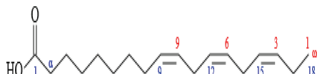
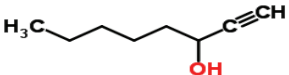
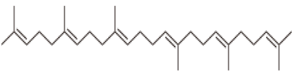
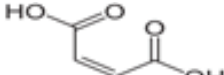
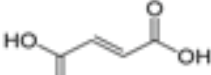

Linoleic acid,  $\alpha$ -Linolenic acid, 1-octyn-3-ol, Squalene, Maleic acid, Fumaric acid, Succinic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 실험에 사용하였다. 각 물질의 특성은 Table 1에 나열하였다.

## 2. 시험방법

### 1) ARE-Nrf2 Luciferase Test

기존 발표된 논문에 따라 HaCaT (Immortalized human keratinocyte) 세포주에 Human AKR1C2 유전자 프로모터의 Antioxidant Response Element (ARE) 부위와 발광유전자인 *luc2* 유전자가 형질 도입된 벡터를 넣어 리포터 기반 세포주를 제작하였다 (코스모진텍, Seoul, Korea). 이 세포주를 10% heat-inactivated FBS (GIBCO, Grand Island, NY, USA), 0.1% gentamicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 이 포함된 DMEM (Lonza, Maryland, USA) 배지를 이용하여 37°C, CO<sub>2</sub> 5%에서 배양하였다. 세포 밀도가 80~90% 정도가 되면 1:3 비율로 subculture를 실시하며, Passage number

Table 1. Unsaturated fatty acid 8종

Chemical information (Unsaturated compound)						
No.	Name	Chemical structure	Cas #	Chemical Formula	Molar Mass	Log P
1	Oleic acid		112-80-1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282.47 g/mol	7.73
2	Linoleic acid		60-33-3	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280.45 g/mol	7.51
3	$\alpha$ -Linolenic acid		463-40-1	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278.44 g/mol	7.3
4	1-octyn-3-ol		818-72-4	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	126.20 g/mol	1.96
5	Squalene		111-02-4	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	410.73 g/mol	14.12
6	Maleic acid		110-16-7	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	116.07 g/mol	0.05
7	Fumaric acid		110-17-8	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	116.07 g/mol	0.05
8	Succinic acid		110-15-6	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	118.09 g/mol	0.75

25이하의 세포만 실험에 이용하였다.

ARE-Nrf2 Luciferase Test는 기존에 개발된 유사 시험법 (ARE-Nrf2 Luciferase Test™)을 기반으로 진행되었다 (Emter *et al.*, 2010). 배양된 세포주는 3개의 white 96-well plates와 1개의 clear 96-well plate에 각각  $1 \times 10^5$  cells / 120  $\mu$  L / well씩 분주한 후 37°C, CO<sub>2</sub> 5% 조건 하에서 24시간동안 배양하였다. 배양 24시간 후 시험 물질을 2-fold serial dilution을 통해 0.98  $\mu$  M ~ 2000  $\mu$  M 의 12가지 농도로 처리하였다. 이때 시험물질의 용매로 사용된 DMSO의 최종 농도는 1%로 하였다. 이렇게 총 4개의 plates가 동일한 조건으로 준비되었으며, 이 중 3개의 plates는 발광 평가 목적, 1개의 plate는 세포생존율을 평가하는 목적으로 사용되었다. 48시간 동안 물질 처리 한 후 배지를 제거하고 멸균 PBS를 이용하여 한 차례 세척하였다. Luciferase substrate (Promega, Germany) 처리 후 luminometer (Synergy II, BioTek Instruments, Inc., VT, USA)로 발광값을 측정하였다. 또한 세포생존율의 경우 MTT assay를 수행하여 UV-vis spectrophotometer (Spectra MAX 190TM, Molecular Device, CA, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험물질에 의한 세포생존율이 70% 이상이고, 발광 값의 증가가 대조군인 1% DMSO 대비 1.5배 이상 증가한 경우, 피부감작성 위험이 있는 것으로 판정하였다.

## 2) LuSens

LuSens 세포주는 BASF (Dr. Tzutzuy Ramirez)로부터 분양을 받았으며 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (Lonza), 0.005% puromycin (Sigma)를 함유한 DMEM 배지에 37°C, CO<sub>2</sub> 5%조건하에서 배양하였다. 계대는 4~5일 간격으로 수행하며, 4일 주기시에는 0.68 X 10<sup>6</sup> cells/20 ml, 5일 주기시 0.4 X 10<sup>6</sup> cells/20 ml의 밀도로 75T flask에 배양 하였다.

시험은 BASF에서 제공한 프로토콜대로 수행하였다. 물질 처리 농도를 정하기 위해 먼저 세포생존율을 평가하는데, 본 시험시 최고 처리 농도는 예비 실험에서 세포 독성이 관찰될 경우 1.2 X CV75 그리고 세포독성이 없을 경우 2000  $\mu$  M로 하였다.

앞서 ARE-Nrf2 Luciferase Test와 마찬가지로 본 시험시 luciferase의 발현과 세포생존율 두 가지를 평가하였다. luciferase의 발현을 평가하기 위해 세포를 white 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells / 200  $\mu$  L / well씩 분주하였고 세포생존율을 평가하기 위해 clear 96-well plate에 동일한 숫자의 세포를 분주하였다.

24시간 배양 후 물질별 6개의 농도로 시험물질이 함유한 배지 200 $\mu$ L로 교환하였으며, 이때 용매로 사용된 DMSO의 최종 농도는 1%가 넘지 않도록 하였다. 시험은 triplicate로 실험하였다. 48시간 동안 물질 처리 한 후 배지를 제거하고 PBS (with Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) 300  $\mu$  L를 이용하여 두 번 세척하였다. 발광의 측정은 Luciferase substrate (Promega, Germany) 처리 후 luminometer (Synergy II, BioTek Instruments, Inc., VT, USA)로 발광값을 측정하였다. 또한 세포생존율의 경우 MTT assay를 수행하여 UV-vis spectrophotometer (Molecular Device)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험물질에 의한 세포생존율이 70% 이상이고, 발광 값의 증가가 대조군인 1% DMSO 대비 1.5배 이상 증가한 경우, 피부감작성 위험이 있는 것으로 판정하였다.

## 3) Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

THP-1 세포주 (Human monocytic leukaemia cell line, ATCC Rockville, MD, USA)를 10% Fetal bovine serum (GIBCO), 100 Unit/ml of Penicillin, 100  $\mu$  g/ml Streptomycin (GIBCO), 0.05 mM 2-mercaptoethanol (GIBCO)이 포함된 RPMI 1640 medium (GIBCO) 배지를 이용하여 37°C, CO<sub>2</sub> 5%에서 배양하였다. 계대는 0.1 X 10<sup>6</sup> ~ 0.2 X 10<sup>6</sup> cells/mL의 밀도로 2~3일 주기로 수행하였으며, 세포 수가 최대 1 X 10<sup>6</sup> cells/mL을 넘지 않도록 하고 시험시 passage number는 30을 넘지 않도록 하였다.

시험은 기존에 보고된 프로토콜과 (Nukada *et al.*, 2012) OECD 442E를 기반으로 수행하였다. 세포를 24-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/ml/well씩 분주하였고, 시험물질에 24시간 노출 시킨 후, FACS buffer로 두 번 세척하였다. 비특이적 항원의 결합을 막기 위해 Blocking 용액 (0.01 % (w/v) globulin 이 포함된 FACS buffer)를 4° C 에서 약 15분간 처리한 후, FITC-conjugated monoclonal mouse antibodies (anti-human CD54, ICAM-1/FITC (clone 6.5B5) (DAKO, Glostrup, Denmark); anti-human CD86 (clone Fun-1) (BD-PharMingen, CA, USA) 를 사용하여 제조회사가 권장한 농도 (6  $\mu$  L/3 x 10<sup>5</sup> cells/100  $\mu$  L for the anti-human CD86 mAb, 3  $\mu$  L/ 3 x 10<sup>5</sup> cells/100  $\mu$  L for the anti-human CD54 mAb, 3  $\mu$  L/3 x 10<sup>5</sup> cells/100  $\mu$  L for the anti-human IgG mAb)로 30분간 4° C 에서 처리하였다. FITC labeled-mouse IgG1 (clone DAK-G01; DAKO) 은 isotype control 로 사용되었다. 세포를 FACS

$$RFI = \frac{\text{MFI of chemical-treated cells} - \text{MFI of chemical-treated isotype control cells}}{\text{MFI of vehicle-treated cells} - \text{MFI of vehicle-treated isotype control cells}}$$

MFI = Geometric Mean Fluorescence Intensity

buffer로 두 번 씻어낸 후, 죽은 세포를 가려내기 위해 propidium iodide (Sigma-Aldrich, MO, USA)가 포함된 용액을 이용하여 세포를 염색하였다. 세포 표면 마커의 발현과 세포 생존율은 형광활성세포분류기 (FACS; Fluorescence Activated Cell Sorter)를 이용하여 측정하였고, CellQuest 소프트웨어 (BD Biosciences, USA)로 분석 하였다. 총 10,000개의 살아있는 세포를 분석하였으며, 표면 마커의 발현에 대하여 isotype control 과 비교하여 아래의 식에 의해 Relative fluorescence intensity (RFI)를 계산하였다.

시험물질에 의한 세포생존률이 75% 이상에서, 세포 표면 마커 CD68의 RIF 값이 150% 이상이거나, CD54의 RFI 값이 200% 이상일 경우 피부감작성 위험이 있는 것으로 판정하였다.

#### 4) Spectro- Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

Spectro-DPRA는 아모레퍼시픽에서 개발된 시험 방법을 적용하였다 (Jeong *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2014). 200 μ M의 Cysteine 펩타이드 (Ac-RFAACAA, Peptron, Dajeon, Korea) 또는 100 μ M의 Lysine 펩타이드 (Ac-RFAAKAA, Peptron)를 1mM의 시험물질과 24시간동안 반응시킨 후, 시험물질과 반응이 일어나면 펩타이드가 감소하는 원리를 이용하였다. 시험물

질과 반응하지 않은 펩타이드의 정량은 검출물질인 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan) 또는 fluorescamine (Sigma-Aldrich, MO, USA)을 처리한 후 UV-vis spectrophotometer (Spectra MAX 190, Molecular Device, CA, USA; absorption wavelength: 412 nm) 와 fluorometer (Flexstation 3, Molecular Device; excitation: 390 nm, emission: 465 nm, 475 nm)를 이용하여 정량하였다. 시험물질과 펩타이드와의 반응성은 반응 이후 검출물질에 의해 탐지된 펩타이드가 줄어든 비율로 나타내며, 식은 다음과 같다.

$$\text{펩타이드 감소비율 (\%)} = \frac{1 - \text{Peptide}_{\text{unreacted}}}{\text{Peptide}_{\text{total}}} \times 100$$

시험물질에 의해 cysteine펩타이드의 감소비율이 10%를 초과하거나, lysine펩타이드의 감소비율이 30%를 초과하면, 피부감작성 위험이 있는 것으로 판정하였다.

**Table 2.** in vitro 피부감작성 대체 시험 결과와 in silico model 분석 결과

Chemical information (Unsaturated compound)			동물실험 결과	OECD QSAR toolbox		LuSens	ARE-Nrf2 Luciferase Test	Spectro-DPRA	h-CLAT	
No.	Name	log P	LLNA class	GPMT (Y/N) (기준)	OASIS algorithms	OECD algorithms	LuSens final - "1" indicates positive test results	ARE-Nrf2 Luciferase Test final - "1" indicates positive test results	Spectro-DPRA final - "1" indicates positive test results	h-CLAT final - "1" indicates positive test results
1	Oleic acid	7.73	Weak	None	No alert	No alert	0	0	0	log P >3.5
2	Linoleic acid	7.51	Weak	inconclusive	No alert	No alert	1	1	1	log P >3.5
3	α-Linolenic acid	7.3	Moderate	no data	No alert	No alert	0	1	1	log P >3.5
4	1-octyn-3-ol	1.96	Moderate	None	No alert	No alert	1	1	0	1
5	Squalene	14.12	Moderate	None	No alert	No alert	0	0	0	log P >3.5
6	Maleic acid	0.05	Moderate	None	No alert	No alert	1	0	1	1
7	Fumaric acid	0.05	None	None	No alert	No alert	0	0	0	0
8	Succinic acid	0.75	None	None	No alert	No alert	0	0	0	석출, 불용성

### III. 결 과

#### 1. in vitro 피부감작성 대체 시험법을 이용한 Unsaturated fatty acid의 감작성 평가

각 시험법에서 시험물질에 대한 감작성 판정은 Table 2와 같다. Spectro-DPRA에서는 3종 (Linoleic acid, a-Linolenic acid, Maleic acid)가 양성되었고, ARE-Nrf2 Luciferase Test에서도 3종 (Linoleic acid, a-Linolenic acid, 1-octyn-3-ol), LuSens 3종 (Linoleic acid, 1-octyn-3-ol, Maleic acid)이 양성이었다. h-CLAT에서는 시험물질의 불용성 문제로 인해 log P 값이 3.5이상인 Oleic acid, Linoleic acid, a-Linolenic acid, Squalene은 실험이 불가능하였고, Succinic acid는 log P값은 3.5이하이나 석출되고 용해되지 않았다. 결과적으로 8종 중 3종이 실험 가능했고, 그 중 2종(1-octyn-3-ol, Maleic acid)이 양성으로 판정되었다.

#### 2. ITS접근법과 in silico model을 종합한 위양성 판별력 분석

각 물질의 피부감작성 판단은 GPMT 동물시험 결과를 기준으로 하였으며 이를 LLNA, 데이터를 확보 할 수 있는 데이터 단독 결과 (Spectro-DPRA, ARE-Nrf2 Luciferase Test, LuSens) 2가지 시험법(Spectro-DPRA, ARE-Nrf2 Luciferase Test 또는 Spectro-DPRA, LuSens)를 활용한 ITS접근법 그리고 3가지 시험법 (ARE-Nrf2 Luciferase Test, LuSens) 을 활용한 ITS 접근법의 결과와 비교해보았다 (Table 2). 실제 인체에서의 감작성 여부는 데이터가 없거나 (Linoleic acid, a-Linolenic acid, 1-octyn-3-ol, Maleic acid) non-sensitizer이거나 (Squalene, Fumaric acid, Succinic acid) 일부 실험에서 미약한 반응 (Oleic acid)이 있었다. (CIR Ingredient Status Report) 단독 시험법으로 분석시 두 시험법 (Spectro-DPRA, ARE-Nrf2 Luciferase Test)의 accuracy는 83.33%를 보였

고, LuSens의 accuracy는 66.67%로 앞의 두 시험법보다 낮은 정확도 (accuracy)를 보였다. Sensitivity와 Positive Predictive Value는 GPMT상 양성인 물질이 없어서, Specificity와 Negative Predictive Value예측은 시험물질 중 GPMT결과가 없는 2종을 제외하면 시험법간 유의미한 차이를 보이지 않아 본 연구에서는 계산하지 않았다. In silico model에서는 8종 모두 no alert로 toolbox 내 관련된 alert가 존재하지 않아 독성 판정이 불가능하였다.

일부 물질만 실험이 가능했던 h-CLAT을 제외한 나머지 3가지 시험법의 결과를 여러 가지 방법으로 조합해보아 각각 accuracy 를 비교해보았다 (Table 3). 단일 시험법, 두 가지 시험법의 결과가 일치할 때 그 방향으로 판정, 3가지 시험법 모두가 일치하는 방향으로 판정, 3가지 시험법 중 2가지 결과가 일치하는 방향으로 판정하는 방법으로 나누어 비교해보았을 시 GPMT 결과와 비교하였을 때 accuracy는 두 가지 시험법을 조합한 ITS와 세 가지 시험법을 조합한 ITS 중 모두 양성일 때 양성으로 판정한 ITS접근법이 100%로 가장 높았다.

### IV. 고 찰

기존 문헌에서 GPMT 결과에서 결론을 내릴 수 없거나 데이터가 없는 2종 (Linoleic acid, a-Linolenic acid)을 제외한 나머지 음성 6종에 대한 분석시, LLNA 결과는 음성 2종, weak sensitization 2종, moderate sensitization 4종으로 판정하고 있으며 33.33%의 accuracy를 보이고 있다. 이번 연구를 통해 피부감작성 시험법별로 unsaturated fatty acid의 피부감작 반응의 양·음성이 다르게 반응함을 확인할 수 있었으며 전체적인 accuracy는 66.6~83.3% 로 LLNA에 비해 동물대체 시험법이 unsaturated fatty acid를 예측하는데 유리하였다. 특히 spectro-DPRA와 ARE-Nrf2 Luciferase Test가 LuSens보다 정확도가 높고 음성물질을 더 잘 예측했다. 유사한 시험법인 LuSens와 ARE-Nrf2 Luciferase test는 시험물질 2

Table 3. 시험법 단독 및 조합별 ITS접근법의 Accuracy 비교(%)

	Spectro-DPRA	ARE-Nrf2 Luciferase Test	LuSens	Spectro-DPRA + ARE-Nrf2 Luciferase Test	Spectro-DPRA + LuSens	Spectro-DPRA + ARE-Nrf2 Luciferase Test + LuSens
양성판정 기준	양성	양성	양성	둘 다 양성	셋 다 양성	두 개 이상 양성
Accuracy	83.33 (5/6)	83.33 (5/6)	66.67 (4/6)	100 (6/6)	83.33 (5/6)	100 (6/6)

\* Linoleic acid, a-Linolenic acid 2종은 GPMT 결과 판별불가와 no data이므로 Accuracy를 구하는 대상에서 제외하였음.

종에서 상이한 결과를 보였는데, 이 중 GPMT결과가 없는 a-Linoleic acid를 제외하면 Maleic acid에서만 서로 다른 결과(LuSens 양성, ARE-Nrf2 Luciferase test 음성)를 보였다. ARE-Nrf2 Luciferase test를 제외한 다른 시험법들에서는 양성으로 나온 것으로 미루어보아 ARE-Nrf2 Luciferase test는 시험과정 중 세포와 충분히 반응하지 않아 감작성 음성이 나온 것으로 생각된다.

또한 log P가 3.5이상인 물질의 경우 h-CLAT을 이용한 피부 감작성 판단 자체가 불가능 하였으므로 이러한 특성을 가지는 물질에 대해서는 h-CLAT대신 다른 시험법 (LuSens, ARE-Nrf2 Luciferase Test, DPRA)를 활용하여 최종 판정에 이용하는 것이 좋을 것을 제안하는 바이다. 이번 연구에서는 시험물질의 데이터가 in silico model에 없어 이를 활용하지 못했지만, in silico model에 데이터가 있는 물질의 경우 이 역시 고려하여 판정하는 것이 정확도를 높일 수 있을 것이다. 그리고 다양한 수의 시험법을 조합한 ITS접근법일수록 LLNA의 위양성을 잘 극복할 수 있을 것으로 기대하였는데, 가장 높은 Accuracy를 갖는 ITS접근법은 두 가지 시험법 (Spectro-DPRA와 ARE-Nrf2 Luciferase Test)을 조합한 ITS접근법과 세 가지 시험법을 조합하고 셋 다 양성일 경우 양성으로 판정한 ITS접근법이였다. 세 가지 시험법 조합이지만 두 개 이상 양성일 때 양성으로 판정하는 경우는 Accuracy가 66.67%로 낮았다. 이러한 결과는 시험법별로 관찰하는 감각의 경로가 다르고, 사용하는 세포도 다르며 (유사한 시험방법인 ARE-Nrf2 Luciferase Test와 LuSens가 결과에 차이를 보임) 사용 가능한 용매의 양이 달라 log P로 인한 용해도 차이를 포함하여 다양한 요인이 영향을 미치기 때문인 것으로 판단된다. 세 가지 시험법 조합법 중 셋 다 양성을 양성으로 판단하는 조합법의 Accuracy가 높은 이유는 세 개의 결과가 일치할 경우에만 양성으로 판정함으로써 일부 위 양성결과로 인한 양성판정을 방지할 수 있기 때문으로 생각되며, 그렇게 함으로써 위양성을 줄일 수 있는 접근법이라고 생각된다. Spectro-DPRA와 ARE-Nrf2 Luciferase Test ITS접근법 역시 100%의 Accuracy를 보이므로 Unsaturated fatty acid 평가시 위양성을 줄여 GPMT결과와 일치율을 높일 효과적인 접근법이라고 생각된다. 그러므로 이러한 물질들과 유사한 단일 원료 혹은 이들 원료를 함유한 복합 물질 평가시 이와 같은 ITS접근법으로 평가하는 것이 효과적일 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 아모레퍼시픽 R&D Unit의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Cho SA, Jeong YH, Kim JH, Kim S, Cho JC, Heo Y, Suh KD, Shin K, An S. 2014. Method for detecting the reactivity of chemicals towards peptides as an alternative test method for assessing skin sensitization potential. *Toxicol. Lett.* 225(1), 185-191.
- CIR Ingredient Status Report IJT 31(Suppl. 1):5-76, 2012.
- CIR Ingredient Status Report JACT 1(2):36-56, 1982.
- CIR Ingredient Status Report JACT 6(3):321-401, 1987.
- CIR Ingredient Status Report March 23, 2009.
- Corsini E, Mitjans M, Galbiati V, Lucchi L, Galli CL, Marinovich M. 2009. Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol. In Vitro*, 23(5), 789-796.
- Dos Santos GG, Reinders J, Ouweland K, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. 2009. Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236(3), 372-382.
- Emter R, Ellis G, Natsch A. 2010. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245(3), 281-290.
- Jaworska J, Harol A, Kern PS, Gerberick GF. 2011. Integrating non-animal test information into an adaptive testing strategy-skin sensitization proof of concept case. *ALTEX* 28(3/11), 211-225.
- Jeong YH, An S, Shin K, Lee TR. 2013. Peptide reactivity assay using spectrophotometric method for high-throughput screening of skin sensitization potential of chemical haptens. *Toxicol. In Vitro*. 27(1), 264-71.
- Lhasa limited, 2016, Predicting skin sensitization using a decision tree integrated testing strategy with an *in silico* model and *in chemico/in vitro* assays.
- Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. 2012. Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-1160.
- OECD 442E. In Vitro Skin Sensitization, Human Cell Line Activation Test (adopted 29, 7, 2016).
- OECD TG 442C. Skin sensitization, Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (adopted 4, 2, 2015).
- OECD TG 442D. In Vitro Skin sensitization, ARE-Nrf2 luciferase assay (adopted 2, 2015).
- Osamu Takenouchi, 2015, Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and

- DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals, *Journal of applied toxicology*, 35: 1318-1332.
- R. Kreiling, H.M. Hollnagel, L.Hareng, D. Eigler, M.S. Lee, P.Griem, B. Dreeben, M. Kleber, A. Albrecht, C. Garcia, A. Wendel, 2008, Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay(LLNA) and the guinea pig maximization test(GPMT). *Food and Chemical Toxicology*, 1896-1904.
- Thomas Armin Frohwein, Anna Sonnenburg, Torsten Zuberbier, Ralf Stahlmann, Maximilian Schreiner, 2015, Unsaturated compounds induce up-regulation of CD86 on dendritic cells in the in vitro sensitization assay LCSA, *Arch Toxicol.*, 90(4): 927-936.
- Tzutzuy Ramirez, Annette Mehling, Susanne N. Kolle, Christoph J. Wruck, Wera Teubner, Tobias Eltze, Alexandra Aumann, Daniel Urbisch, Ben van Ravenzwaay, Robert Landsiedel, 2014. LuSens: A keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification, 1482-1497.
- Vohr H-W, Ahr HJ, 2005, The local lymph node assay being too sensitive?, *Arch Toxicol* 7: 721-728.