

## 국내 인체피부모형을 이용한 광독성 동물대체시험법 개발 연구

이용선<sup>1†</sup>, 이정선<sup>1†</sup>, 임혜림<sup>2</sup>, 김태성<sup>1</sup>, 안일영<sup>1</sup>, 고경육<sup>1</sup>, 김주환<sup>1</sup>, 박혜경<sup>3</sup>, 이종권<sup>1\*</sup>, 손수정<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전평가원 특수독성과, <sup>2</sup>식품의약품안전평가원 생약제제과,  
<sup>3</sup>식품의약품안전평가원 독성평가연구부, <sup>4</sup>식품의약품안전평가원 독성연구과

### Development of an *In vitro* Phototoxicity Test Using the Human Reconstituted Epidermis Model Developed in Korea

Yong-Sun Lee<sup>1†</sup>, Jung-Sun Yi<sup>1†</sup>, Hye-Rim Lim<sup>2</sup>, Tae-Sung Kim<sup>1</sup>, Il-Young Ahn<sup>1</sup>, Kyung-yuk Ko<sup>1</sup>, Joo-Hwan Kim<sup>1</sup>,  
Hye-Kyung Park<sup>3</sup>, Jong-Kwon Lee<sup>1\*</sup>, Soo-Jung Sohn<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Toxicological Screening and Testing Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, 28159, Republic of Korea

<sup>2</sup>Herbal Medicinal Products Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, 28159, Republic of Korea

<sup>3</sup>Toxicological Evaluation and Research Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, 28159, Republic of Korea

<sup>4</sup>Toxicological Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, 28159, Republic of Korea

**ABSTRACT.** Human reconstituted epidermis models have been widely used in evaluating phototoxicity. However, human reconstituted epidermis models made in Korea have not been employed to assess phototoxicity. In this study, we conducted an *in vitro* phototoxicity test with Neoderm<sup>®</sup>-E, human reconstituted epidermis model from Korea, in order to see if the model could be used for the evaluation of phototoxicity. Firstly, we performed an UVA sensitivity test and selected 6 J/cm<sup>2</sup> for an UVA irradiation dose. Chlorpromazine as a positive control was then tested to confirm that the substance induces phototoxicity in this model. Afterwards, 3 phototoxins and 2 non-phototoxins were tested using Neoderm<sup>®</sup>-E and Epiderm<sup>™</sup>, a generally used phototoxicity test model, to compare prediction results for each chemical. The results indicated that all those 5 chemicals were correctly predicted with Neoderm<sup>®</sup>-E, which was accordant with the phototoxic information on them. However, only 3 chemicals were correctly predicted with Epiderm<sup>™</sup>. Consequently, the predictive capacity of the test with Neoderm<sup>®</sup>-E could be higher than that using Epiderm<sup>™</sup>. Overall, we reached the conclusion that Neoderm<sup>®</sup>-E could be used in evaluating phototoxicity.

**KEY WORDS:** Human reconstituted epidermis model, phototoxicity, alternative test method, Epiderm<sup>™</sup>, Neoderm<sup>®</sup>-E

Received: 9 August 2016  
Revised: 2 November 2016  
Accepted: 3 November 2016

† These authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author: Jong-Kwon Lee  
Toxicological Screening and Testing Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, 28159, Republic of Korea  
Tel: +82-43-719-5102 Fax: +82-43-719-5150  
E-mail: jkleest@korea.kr

Corresponding author: Soo-Jung Sohn  
Toxicological Research Division, National Institute of Food

## I. 서 론

인체피부모형은 인체조직으로부터 분리한 피부각질 세포를 분화시켜 3차원적으로 재구성한 모델로 인체피부와 유사하게 각질층, 과립층, 유극층, 기저층 등을 포함하고 있다. 이러한 인체피부모형은 인체피부가 가

and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju-si, 28159, Republic of Korea  
Tel: +82-43-719-5102 Fax: +82-43-719-5100  
E-mail: sjsohn@korea.kr

지고 있는 중요한 기능인 피부장벽기능을 가지고 있어 외부인자에 대한 유사한 반응을 얻을 수 있다 (Netzlaff et al., 2005). 또한 인체피부와 유사성으로 인해 기존의 *in vitro* 시험법에서 제한적이었던 비수용성물질 등을 포함하는 많은 종류의 물질을 평가하기 용이하며 조직학적 분석이 가능한 장점이 있다. 인체피부모델이 인체피부와 유사한 장점으로 인하여 동물실험의 대안으로 대체(replacement), 감소(reduction), 고통완화(refinement)의 3R 원리를 반영하는 동물실험대체법 개발에 많이 쓰이고 있다. 그로 인하여 현재 OECD Test Guideline(TG)에 인체피부모델을 이용한 피부자극시험(OECD TG 439)과 피부부식시험(OECD TG 431)이 제정되어서 활용되고 있다 (OECD, 2015a; OECD, 2015b). 현재 국내에서도 많은 종류의 인체피부모델들이 개발되어 시판되어지고 있으며 이를 이용하여 피부자극성, 피부부식성 시험법 개발 연구와 시험물질의 각종 평가 및 연구에 사용되고 있다 (문지영 등, 2010; 장원희 등, 2011; 박양희 등, 2012; 김민지 등, 2013; 조지훈 등, 2013; 박정은 등, 2015; 조지훈 등, 2015; Cho et al., 2012; Bin et al., 2014; Choi et al., 2014, Jung et al., 2014).

광독성은 자외선을 포함하는 빛에 의해 유도되는 급성 독성반응으로 광반응을 일으키는 화학물질이나 의약품, 식품 첨가제 등의 외부물질이 피부와 접촉된 후에 발생한다 (Gould et al., 1995; Lelièvre et al., 2007; Onoue et al., 2008). 이러한 광독성 평가를 위해서 2002년 EMA에서 ‘광안전성 평가지침(Note for guidance on photosafety testing)’을 시작으로 광안전성 평가에 대한 지침들이 나오기 시작하였으며 2004년 OECD에 *in vitro* 3T3 NRU 광독성 시험법이 OECD TG 432로 채택되었다 (EMA, 2002; OECD, 2004). 또한 최근에 의약품국제규제조화회의(ICH)에서 의약품의 광안전성평가 가이드라인(ICH S10)이 마련되었는데 ROS 광안전성 시험법, *in vitro* 3T3 NRU 시험법, 인체피부모델을 이용한 광독성 시험법

등을 제시하고 있다 (ICH, 2013). 그러나 이들 중 검증된 시험법은 ROS 광안전성 시험법과 *in vitro* 3T3 NRU 시험법으로 광독성을 평가하는 비임상시험법은 그리 많지 않은 상황이다 (EURL ECVAM, 2015). 인체피부모델을 이용한 광독성 시험법은 아직까지 국제적으로 검증되지 않았지만 시험물질에 대한 광독성 평가에 사용되고 있으며 좋은 정확도를 가지고 있다 (Liesch et al., 1997; Bernard et al., 2000; Jones et al., 2001; Portes et al., 2002; Lelièvre et al., 2007). 국외 인체피부모델과 동일하게 표피층을 가지는 국내 인체피부모델이 개발이 되었으나 이를 활용한 광독성 시험법 개발은 보고된 바가 없다. 그렇기 때문에 본 연구에서는 국내에서 개발된 인체피부모델인 Neoderm®-E을 이용하여 국외 인체피부모델과의 광독성 예측력 비교를 통해 국내 인체피부모델이 광독성 대체시험법에 활용될 수 있는지에 대하여 알아보하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질 및 재료

시험물질은 EpiDerm™ 시험법에서 제시하는 양성대조물질을 포함하여 기존에 광독성 시험에 사용된 물질을 사용하였다 (ZEBET/ECVAM, 1997; Lelièvre, 2007; Onoue et al., 2014). 4-Aminobenzoic acid (PABA), chlorpromazine HCl (CPZ), erythromycin (ETM), promethazine HCl (PMZ), quinine HCl (QN), tetracycline (TCC), isopropanol, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 시험물질에 대한 자세한 사항은 Table 1에 기술하였다. Sesame oil ( $\geq 99\%$ , research grade)은 Santa cruz (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 6-well plate, 12-well plate, 24-well plate, 96-well plate는 Corning (Corning, NY, USA)에서 구입하였다. DPBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  free, pH 7.4,

Table 1. Details on test chemicals

Test chemical	CAS No.	Form	Vendor	Purity	Selected vehicle	Phototoxic information
4-Aminobenzoic acid	150-13-0	Solid	Sigma	100%	Oil	Non-phototoxic
Erythromycin	114-07-8	Solid	Sigma	94.7%*	Water	Non-phototoxic
Chlorpromazine	69-09-7	Solid	Sigma	99%	Water	Phototoxic
Promethazine HCl	58-33-3	Solid	Sigma-Aldrich	99.7%	Water	Phototoxic
Quinine	6119-47-7	Solid	Sigma	94.8%	Water	Phototoxic
Tetracycline	60-54-8	Solid	Sigma	98.7%	Oil	Phototoxic

\* An estimated purity of erythromycin was calculated by nitrogen content.

**Table 2.** Details on two human reconstituted epidermis models

Model	Cell type	Tissue origin for cells	Number of cell layers	Thickness of cell layers	Surface area
EpiDerm™	Normal human epidermis keratinocytes	Foreskin (Neonatal)	8-12 layers	100 μm	0.64 cm <sup>2</sup>
Neoderm®-E	Primary human epidermis keratinocytes	Foreskin (Neonatal)	5-8 layers	40-50 μm	1.1 cm <sup>2</sup>

1X; 국내모델-Gibco, 국외모델-제조사 제공), water (UltraPure™ distilled)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 국외 인체피부모델인 EpiDerm™ (EPI-200-PHO, 24-tissue)는 MatTek (Ashland, MA, USA)에서 구입하였고, 국내 인체피부모델인 Neoderm®-E (12-tissue)는 TEGO Science (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 인체피부모델에 대한 자세한 사항은 Table 2에 기술하였다.

## 2. 광조사 조건

40 W 램프 (320-380 nm; 최고 발광과장 365 nm)를 갖춘 Biospectra UV 조사기 (Vilbert-Lourmat, Marne-la-vallee, France)를 사용하였다. UVA 조사는 1.7 mW/cm<sup>2</sup> 조도(irradiance)와 25 °C 조건에서 진행하였다. 조도는 UVA 측정기 (UVP, Cambridge, UK)를 이용하여 확인하였다.

## 3. 시험물질 조제

MatTek에서 제공하는 시험방법에 따라 용해도 시험을 실시하였다 (ZEBET/ECVAM, 1997). 물에서 시험물질의 용해도가 1% (w/v) 이상일 경우 용매는 water로 선택하고 1% (w/v) 미만일 경우 sesame oil로 선택하여 사용하였다. 시험물질의 용매가 water인 경우 농도는 0.01, 0.0316, 0.1, 0.316, 1% (w/v)으로 녹이고 sesame oil인 경우 0.1, 0.316, 1, 3.16, 10% (w/v)으로 녹여 사용하였다.

## 4. 인체피부모델 전배양

인체피부모델은 배송 후 무균 조작을 통해 각 tissue로부터 모든 agarose를 제거하였다. 국외모델의 경우 well 당 미리 데워진 0.9 ml의 배양액 (37°C, 제조사 제공)이 담긴 6-well plate에 tissue들을 옮기고, 국내모델의 경우 well 당 미리 데워진 2 ml의 배양액 (37°C, 제조사제공)이 담긴 12-well plate에 tissue들

을 옮긴 후에 18-24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도 조건에서 전배양을 실시하였다. 전배양시 well과 tissue 사이에 기포가 없도록 하였다.

## 5. 인체피부모델의 UVA 민감도 시험

인체피부모델 전배양 후 UVA 조사군의 21개 tissue들과 UVA 비조사군의 3개 tissue들을 국외모델의 경우 well 당 미리 데워진 0.9 ml의 배양액이 채워진 24-well plate로 각각 옮기고, 국내모델의 경우 2 ml의 배양액이 채워진 12-well plate로 각각 옮겼다. UVA 비조사군은 실온의 암소에서 두고 UVA 조사군은 plate lid가 덮혀진 상태에서 조사시키며 매 3 J/cm<sup>2</sup> 마다 tissue 3개를 암소로 옮겼다. UVA 조사는 연속적으로 실시하며 조사량은 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 J/cm<sup>2</sup> 이었다. UVA 조사가 완료된 후, 1X DPBS를 사용하여 모든 tissue를 세척하고 국외모델의 경우 미리 데워진 0.9 ml의 배양액이 채워진 6-well plate로 옮기고 국내모델의 경우 2 ml의 배양액이 채워진 12-well plate로 옮긴 후 하룻밤 동안(18-24 시간) 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도 조건에서 배양하였다.

## 6. 인체피부모델을 이용한 광독성 시험

인체피부모델 전배양이 끝나기 전 시험에 사용될 각 시험물질을 선택된 용매에 따라 5가지 농도로 조제하였다. 전배양이 끝난 후 국외 모델의 경우 미리 데워진 0.9 ml의 배양액이 채워진 6-well plate에 tissue들을 옮겼고 국내 모델의 경우 미리 데워진 2 ml의 배양액이 담긴 12-well plate에 tissue들을 옮겼다. 24개의 tissue들 중에 12개 tissue들은 UVA 비조사군 그리고 나머지 12개 tissue들은 UVA 조사군을 위해 사용하였다. 모든 조직에 용매대조군을 포함한 시험물질을 모델 윗부분이 전부 덮히도록 50 μl (국외모델) 또는 150 μl (국내모델) 처리한 후 조직을 하룻밤 동안(18-24 시간) 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도 조건에서 배양하였다. 시험물질을 oil에 녹일 경우 국외모델은

pad (Paper disk, 8 mm Ø; Advantec, Dublin, CA, USA)에 시험물질을 20 µl 처리한 후 처리한 면이 조직에 닿도록 적용하였고 국내모델은 pad (Paper disk, 12 mm Ø; 제조사 제공)에 시험물질을 60 µl 처리한 후 처리한 면이 조직에 닿도록 적용하였다. 농도별 시험물질 적용에 대한 디자인은 그림 1에 제시하였다. 배양 후, 광을 조사시킬 6-well plate (국외모델) 또는 12-well plate (국내모델)를 배양기에서 꺼내고 pad를 적용한 경우 이를 제거하였다. UVA 조사군은 plate lid를 덮은 채로 UVA를 6 J/cm<sup>2</sup> 만큼 조사하였고, UVA 비조사군의 플레이트는 실온의 암소에서 방치하였다. UVA 조사가 완료된 후, 1X DPBS를 사용하여 모든 tissue를 세척하고 국외모델의 경우 미리 데워진 0.9 ml의 배양액이 담긴 6-well plate로 옮기고 국내모델의 경우 미리 데워진 2 ml의 배양액이 담긴 12-well plate로 옮긴 후 하룻밤 동안 (18-24 시간) 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도 조건에서 배양하였다. 각 인체피부모델에 대한 시험물질 적용 디자인은 Figure 1에 자세히 묘사하였다.

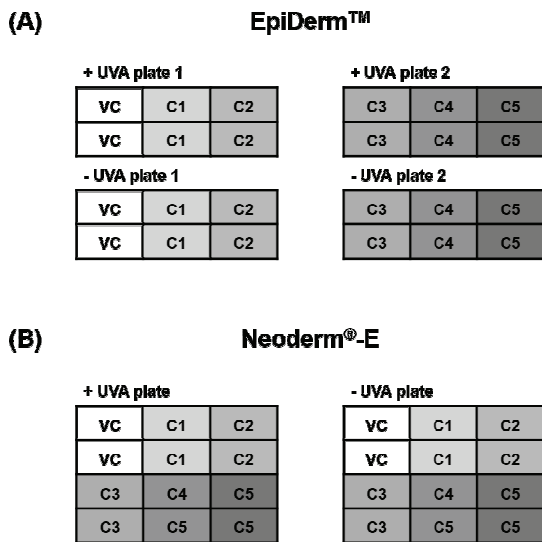


Figure 1. Test chemical application designs of EpiDerm™ and Neoderm®-E. Five concentrations of a chemical with a vehicle control were topically applied on each tissue duplicate using 6-well plates for EpiDerm™ (A) and 12-well plates for Neoderm®-E (B). VC, vehicle control; C1-C5, lowest to highest concentration.

### 7. 세포생존율 측정

인체피부모델의 세포생존율은 MTT assay를 통하여 측정하였다. 광조사 후 배양이 끝나기 전 국외모델의 경

우 배양액에 MTT를 녹인 MTT medium(1 mg/ml)을 준비한 후 24-well plate에 well 당 300 µl씩 넣어 준비하였고 국내모델의 경우 배양액에 MTT를 녹인 MTT medium (0.3 mg/ml)을 준비한 후 12-well plate에 well 당 2 ml씩 넣어 준비하였다. 배양 후 모든 조직들을 MTT medium이 담긴 24-well plate (국외모델) 또는 12-well plate (국내모델)로 옮긴 후 3 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 90% 습도 조건에서 배양하였다. 배양 후 MTT medium을 제거하고 각 well을 1X DPBS로 2번 세척하였다. 국외모델의 경우 세척 후 1X DPBS를 완전히 제거하고 모든 tissue를 새로운 24-well plate로 옮겼다. Formazan 추출을 위해 각 well에 2 ml의 isopropanol을 넣어 주었다. Isopropanol 증발을 막기 위해 24-well plate를 밀폐시키고 실온에서 2시간 동안 80 rpm 속도로 shaker를 이용하여 잘 흔들어 formazan을 추출하였다. 국내모델의 경우 세척 후 1X DPBS를 완전히 제거하고 모든 insert에 붙은 tissue들을 떼어내었다. Formazan 추출을 위해 각 tissue을 1.5 ml microtube에 넣고 600 µl의 0.04 N HCl- isopropanol을 넣은 후 실온에서 20-24시간 동안 80 rpm 속도로 shaker를 이용하여 잘 흔들어 formazan을 추출하였다. 추출 후 각 조직 당 200 µl × 3만큼의 formazan 용액을 96-well plate로 옮기고 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 8. 광독성 판정 및 기타사항

인체피부모델을 이용한 광독성시험 결과평가를 위해 용매대조군의 흡광도 값을 100%로 하여 각 물질 처리군의 조직 생존율(tissue viability)을 산출하고, 같은 농도의 UV 비조사군과 비교하여 UV 조사군의 생존율이 하나 이상의 처리농도에서 30% 이상 감소했을 때 시험물질은 ‘광독성이 있다’고 판정하였다. 인체피부모델 시험시 배양액 또는 MTT medium이 있는 plate에서 배양시 모델과 plate사이에 기포가 없도록 주의하여 실험을 실시하였다.

### 9. 통계 분석

모든 실험결과에 대한 통계적 분석은 Graphpad Prism software (San Diego, CA, USA)를 이용하였다. 대조군과 처리군 간의 조직 생존율의 감소가 30% 이상인 경우 통계분석을 실시하였고, p-value가 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의성이 있다고 하였다. 모든 실험결과는 평균과 표준편차 (mean ± standard deviation (S.D.))로 나타내었다.

### III. 결 과

#### 1. 인체피부모형 UVA 민감도 확인 및 국내 인체 피부모형 광조사량 선정

인체피부모형의 실험을 시작하기 전 모형의 적절성을 확인하기 위하여 UVA 민감도시험을 수행하였다 (Figure 2). 3 J/cm<sup>2</sup>씩 간격으로 총 21 J/cm<sup>2</sup>까지 UVA 조사를 하였고 생존율을 확인하였을 때 국외모형의 경우는 6 J/cm<sup>2</sup>에서의 조직 생존율이 80% 이상이어서 국외 인체피부모형에 대한 민감성 기준을 만족하였다 (ZEBET/ECVAM, 1997). 또한 국내 인체피부모형의 경우 UVA 민감도 시험을 실시하였을 때 12 J/cm<sup>2</sup>까지 조직 생존율이 80% 이상인 것을 확인할 수 있었다. 많은 *in vitro* 및 *in vivo* 광독성시험에서 5-20 J/cm<sup>2</sup>의 조사량이 사용되고 있고, 국외인체모

형인 EpiDerm™과 Episkin을 이용한 광독성 시험에서 6 J/cm<sup>2</sup>의 조사량을 사용하고 있으며, UVA에 의한 큰 세포독성을 보이지 않기 때문에 국내인체모형을 이용한 광독성 시험의 조사량을 6 J/cm<sup>2</sup>로 선정하였다 (ICH, 2013). 시험물질을 적용하기 위하여 시험물질에 대한 용매선정시험을 수행하였다. 그 결과 ETM, CPZ, PMZ, QN의 용매는 water로 선정되었고, PABA와 TCC의 용매는 oil로 선정되었다 (Table 1).

#### 2. 국내 인체피부모형의 광독성 평가 가능성 확인

양성대조물질인 CPZ를 적용하여 인체피부모형을 이용한 광독성 평가가 제대로 수행되는지 확인하고자 하였다. 우선 광독성 시험법이 개발되어 있는 국외 인체피부모형인 EpiDerm™을 이용하여 양성대조군의 광독성 판정이 잘 이루어지는지 확인하기 위해서 EpiDerm™ 시

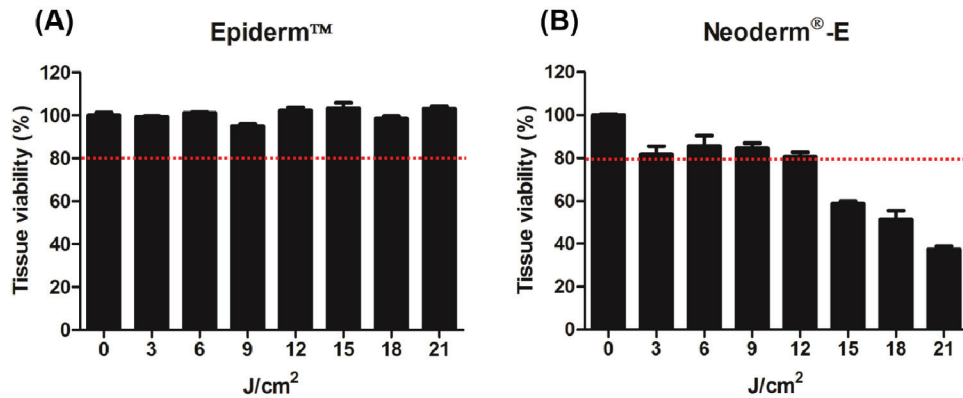


Figure 2. UVA sensitivity of two human reconstituted epidermis models. UVA was exposed up to 21 J/cm<sup>2</sup>. Tissue viability was calculated with the MTT assay. Red-dotted lines represent a tissue viability of 80%.

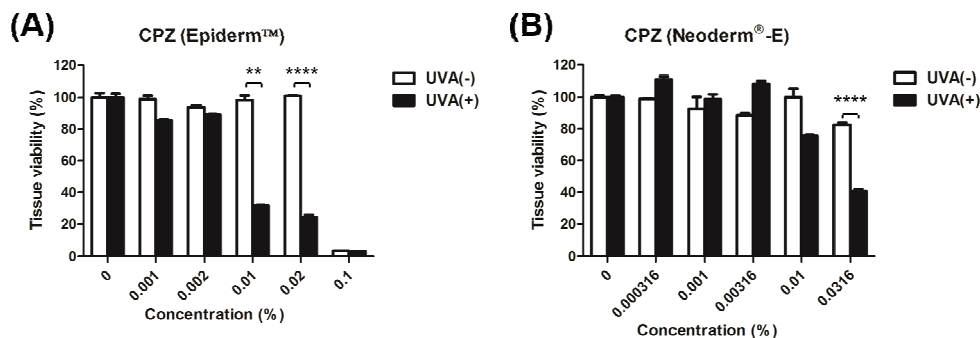


Figure 3. Phototoxic effect of chlorpromazine as a positive control in two human reconstituted epidermis models. Chlorpromazine was topically applied to the epidermis models. After application, UVA was exposed at 6 J/cm<sup>2</sup>. Tissue viability was calculated with the MTT assay. Values are the mean ± S.D. from 2 tissues per group. Statistical analysis was conducted when a 30% viability decrease in the UVA irradiated group occurred, compared with the UVA non-irradiated group in the same concentration (\*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.0001; Student's *t*-test). CPZ, chlorpromazine as a positive control.

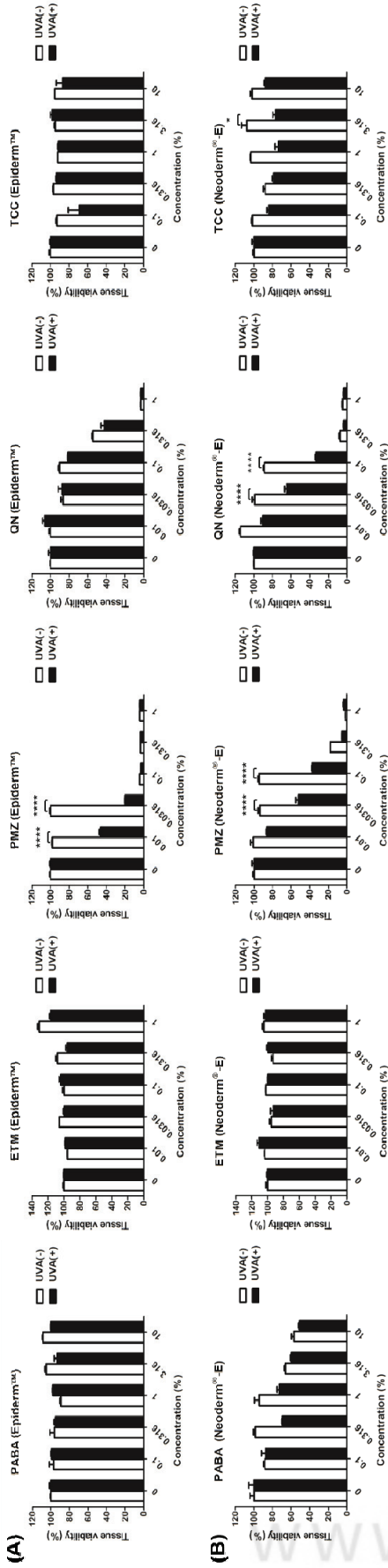
험법에서 제시하는 농도를 적용하여 실험을 수행하였다 (ZEBET/ECVAM, 1997). 그 결과 CPZ를 적용하였을 때 0.01%와 0.02%에서 비조사군과 조사군의 생존율차이가 30% 이상이기 때문에 광독성 물질로 판정되었고 기존 결과와 유사한 것을 확인하였다 (Figure 3A). 다음으로는 국내 인체피부모델인 Neoderm<sup>®</sup>-E를 이용하여 광독성을 평가할 수 있는지에 대한 가능성을 확인하고자 하였다. Neoderm<sup>®</sup>-E이 EpiDerm<sup>™</sup>보다 조직 두께가 얇은 것을 감안하여 0.000316-0.0316%의 농도를 처리하였다. 광조사 후 CPZ의 광독성을 확인하였을 때 0.0316%에서 비조사군과 조사군의 생존율차이가 30% 이상이므로 광독성 물질로 판정하였다 (Figure 3B). 따라서 Neoderm<sup>®</sup>-E를 이용한 광독성 평가가 가능할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 EpiDerm<sup>™</sup> 시험법에서 제시한 CPZ의 광독성이 관찰되는 농도 구간이 0.00316%에서 0.0316%사이고 Neoderm<sup>®</sup>-E에는 광독성이 관찰되는 농도가 0.0316%이기 때문에 두 인체피부모델에서 양성대조군이 광독성을 일으키는 농도가 유사하다는 것을 확인할 수 있다 (ZEBET/ECVAM, 1997). 그렇기 때문에 두 인체피부모델이 CPZ에 대한 광독성 반응이 유사하다는 판단하에 Neoderm<sup>®</sup>-E에 사용되는 시험물질의 농도설정을 EpiDerm<sup>™</sup> 시험법과 동일하게 적용하여 광독성 실험을 진행하였다.

### 3. 시험물질들의 광독성 평가를 통한 국내 인체피부모델의 성능 확인

국내 인체피부모델에서 양성대조물질이 잘 판정되었기 때문에 3개의 광독성 물질과 2개의 비광독성 물질을 사용하여 국외 인체피부모델과 비교시험을 수행하였다. 그 결과 국내 인체피부모델에서 시험물질의 광독성을 확인하였을 때 PMZ, QN, TCC는 광독성 물질로 판정되었고 PABA와 ETM은 비광독성 물질로 판정되었다 (Figure 4A). 국외 인체피부모델에서는 PMZ는 광독성 물질로 판정되었고 PABA, ETM, QN, TCC는 비광독성 물질로 판정되었다 (Figure 4B). 양성대조물질을 포함한 시험물질들의 광독성 정보와 시험결과를 비교하였을 때 국내 인체피부모델의 경우 6개 중 6개가 일치하였으며 국외 인체피부모델의 경우 6개 중 4개가 일치하였다 (Table 3). 결과들을 종합적으로 확인하였을 때 Neoderm<sup>®</sup>-E가 EpiDerm<sup>™</sup>보다 좋은 성능을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

## IV. 고 찰

첫 인체피부모델이 개발된 지 40여년이 지난 지금, 실제인체피부와 유사한 다양한 모델들이 개발되어 많은 연구에 활용되고 있다 (Poumay et al., 2007). 인체피부와 유사한 기능을 가지고 있는 장점으로 인하여 현재 인체피부모델을 이용한 시험법이 OECD Test Guideline에 채택되는 등의 활용가치가 인정되고 있다. 또한 인체피부모델을 이용한 광독성 시험법은 1999년 ECVAM에 의해 사전검증연구 (prevalidation study)가 진행되었고 그 결과 시험법으로의 가능성을 보여주었다 (Spielmann et al., 2000). 인체피부모델을 이용한 광독성 시험법은 MatTek사의 EpiDerm<sup>™</sup>과 L'Oréal사의 EpiSkin을 이용한 광독성 시험법들이 개발되어 있지만 국내 인체피부모델을 이용한 시험법은 아직 개발되지 않았다. 국내에서 개발된 인체피부모델은 국외 인체피부모델과 동일하게 각질세포로부터 분화시켰으며 표피층 (epidermis)의 구성이 동일하기 때문에 광독성 시험에 적용시킬 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 국내 인체피부모델을 이용하여 시험법을 수행하게 되면 배송시간이 크게 단축되어 모델의 안정성이 높아질 것으로 기대되며 가격도 국외 인체피부모델에 비해 많이 저렴하기 때문에 그 활용도가 높아질 것으로 생각되었다. 그래서 본 연구에 국내에서 개발되어 판매중인 인체피부모델 Neoderm<sup>®</sup>-E를 이용하여 광독성 시험법 개발 연구를 수행하였다. 우선적으로 국내 인체피부모델에 대한 UVA 민감도 시험을 수행하였으며 UVA에 대한 적절한 민감성을 나타내었다 (Figure 2B). UVA 조사량으로 선정된 6 J/cm<sup>2</sup>의 경우 국내 모델의 민감성이 12 J/cm<sup>2</sup>까지 조직 생존율이 80% 이상으로 비세포독성을 나타내는 수준이며, 국외 인체피부모델을 이용한 광독성 시험법에서 6 J/cm<sup>2</sup>를 채택하고 있고 광독성 물질이 충분히 활성이 되기 때문에 충분한 조사량이기 때문에 최종적으로 6 J/cm<sup>2</sup>를 선정하였다 (OECD, 2004). 선정된 UVA 조사량을 이용해 양성대조물질로 대표적으로 사용되는 CPZ를 이용하여 광독성 평가시 광독성으로 판정된 농도가 국외 인체피부모델인 EpiDerm<sup>™</sup>에서의 판정범위인 0.00316%에서 0.0316% 사이의 범위와 일치하였기 때문에 시험에 사용된 UVA 조사량이 적절한 것을 알 수 있었고 광독성 시험으로의 활용가능성이 있다는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3B). 추가적인 5가지 시험물질을 통해 시험물질의 광독성 정보와 동일한 예측을 보여줌으로써 국외 인체피부모델보다 좋은 광독성 평가모델인 것을 알 수 있었고 시험법으로의 활용가능



**Figure 4. Results of *in vitro* phototoxicity tests using two human reconstituted epidermis models.** As shown in (A) and (B), each test chemical was topically applied to the tissue of the two epidermis models. After application, UVA was exposed to generate phototoxicity. Tissue viability was calculated with the MIT assay. Values are the mean ± S.D. from 2 tissues per group. Statistical analysis was conducted when a 30% viability decrease in the UVA irradiated group occurred, compared with the UVA non-irradiated group in the same concentration (\* $p < 0.05$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; Student's *t*-test). ETM, erythromycin; PABA, 4-aminobenzoic acid; PMZ, promethazine HCl; QN, quinine; TCC, tetracycline.

**Table 3.** Performances of *in vitro* phototoxicity tests using two human reconstituted epidermis models.

Test chemicals	Vehicle	Epiderm™			Neoderm™-E		
		Phototoxic concentration (%)	Decrease in viability due to UVA (%)	Prediction*	Phototoxic concentration (%)	Decrease in viability due to UVA (%)	Prediction*
Positive control							
Chlorpromazine	Water	0.01, 0.02	67.7, 77.6	PT	0.0316	41.6	PT
Non-phototoxic chemicals							
4-Aminobenzoic acid	Oil	No	-	NPT	No	-	NPT
Erythromycin	Water	No	-	NPT	No	-	NPT
Phototoxic chemicals							
Promethazine HCl	Water	0.01, 0.0316	52.0, 80.0	PT	0.0316, 0.1	41.9, 56.9	PT
Quinine	Water	No	-	NPT	0.0316, 0.1	34.5, 55.5	PT
Tetracycline	Oil	No	-	NPT	3.16	31.6	PT
Concordance				4/6			6/6

\* PT, phototoxic; NPT, non-phototoxic.

성을 보여주었다 (Table 3). 광독성 평가시 국내 인체 피부모델에 QN과 TCC를 적용한 경우 국외 인체피부 모델과 다르게 광독성 판정이 기존 정보와 부합하는 결과를 얻었는데 국내 인체피부모델이 UVA에 대한 민감성이 높고 모델의 두께가 얇기 때문에 시험물질에 대한 반응이 국외 인체피부모델보다 높아 광독성으로 판정된 것으로 생각된다. 또한 TCC가 광독성 물질임에도 *in vitro* 시험에서 비광독성 물질로 분류되나 국내 인체피부모델을 이용하였을 때 광독성으로 판정되었기 때문에 다른 위음성 물질에 대한 정확한 판정을 할 수 있을 것이라고 예상할 수 있다 (이내경 등, 2014).

결론적으로, 국내 인체피부모델인 Neoderm<sup>®</sup>-E이 광독성 시험법의 대체시험법으로 활용할 수 있음을 확인할 수 있었고 그 성능이 국외 인체피부모델인 EpiDerm<sup>™</sup>보다 좋은 예측력을 가지는 것을 알 수 있었다. Neoderm<sup>®</sup>-E가 광독성 시험법에 활용될 수 있는지 확인하기 위하여 추가적인 시험물질들을 이용한 예측력 평가가 필요할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2015년도 식품의약품안전평가원의 연구 개발비(15181독성국458)로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

김민지, 김배환. (2013). 인공피부모델 KeraSkin<sup>™</sup>을 이용한 삼황사심탕의 피부자극 평가. 한국동물실험대체법학회지 7, 5-9.

문지영, 이수현, 정행선, 류양환, 정경미, 임경민, 박철범. (2010). 인공피부모델 KeraSkin<sup>™</sup> 피부자극성 시험 대체시험법의 실험실간 검증. 한국동물실험대체법학회지 4, 5-13.

박양희, 장원희, 정경미, 이수현, 임경민. (2012). 인공피부 모델을 이용한 트라넥삼산 제형의 피부투과도 및 자극 평가. 한국동물실험대체법학회지 6, 27-29.

박정은, Ravi Gautam, 김창열, 장원희, 석승혁, 허용. (2015). 한국형 인공피부조직을 이용한 탐색적 피부과민성 대체시험법 개발. 한국동물실험대체법학회지 9, 39-43.

이내경, 박현지, 임경민. (2014). 인공 피부, 인공 각막 모델을 활용한 동물실험 대체법 연구의 최근 동향. 한국동물실험대체법학회지 8, 29-36.

장원희, 정경미, 최선경, 정행선, 이수현, 최영진, 박영호, 임경민. (2011). 인공피부모델을 이용한 보습과우더의 보습 효능 평가. 한국동물실험대체법학회지 5, 57-60.

조지훈, Katharine Roque, 신소정, 조아랑, 허용. (2013). 국내 개발 인공피부의 친염증성 사이토카인 발현 평가. 한국동물실험대체법학회지 7, 35-38.

조지훈, 박정은, 허용. (2015). 국내 개발 인공피부 배양액

및 조직용해액내 염증매개단백질 발현 수준 평가에 대한 초기 연구. 한국동물실험대체법학회지 9, 33-37.

Bernard, F.X., Barrault, C., Deguercy, A., De Wever, B., Rosdy, M. (2001). Development of a highly sensitive *in vitro* phototoxicity assay using the SkinEthic<sup>™</sup> reconstructed human epidermis. Cell biology and toxicology 16, 391-400.

Bin, B.H., Joo, Y.H., Lee, A.Y., Shin, S.S., Cho, E.G., LEE, T.R. (2014). Novel inhibitory effect of N-(2-hydroxycyclohexyl) valiolamine on melanin production in a human skin model. International journal of molecular sciences 15, 12188-12195.

Cho, K.A., Kim, J.Y., Woo, S.Y., Park, H.J., Lee, K.H. (2012). Interleukin-17 and interleukin-22 induced proinflammatory cytokine production in keratinocytes via inhibitor of nuclear factor  $\kappa$  B kinase- $\alpha$  expression. Annals of dermatology 24, 398-405.

Choi, J., Kim, H., Choi, J., Oh, S.M., Park, J., Park, K. (2014). Skin corrosion and irritation test of sunscreen nanoparticles using reconstructed 3D human skin model. Environmental health and toxicology 29, Article ID: e2014004.

EMA. (2002). Note for guidance on photosafety testing. London, EMA.

EURL ECVAM. (2015). EURL ECVAM status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches (2015). Luxembourg, European Union.

Gould, J.W., Mercurio, M.G., Elmetts, G.A. (1995). Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. Journal of the american academy of dermatology 33, 551-573.

ICH. 2013. Photosafety evaluation of pharmaceuticals S10 step 4. ICH.

Jones, P.A., Lovell, W., King, A.V., Earl, L.K. (2001). In vitro testing for phototoxic potential using the epiderm 3-D reconstructed human skin model. Toxicology methods 11, 1-19.

Jung, K.M., Lee, S.H., Jang, W.H., Jung, H.S., Heo, Y., Park, Y.H., Bae, S., Lim, K.M., Seok, S.H. (2014). Keraskin<sup>™</sup>-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. Toxicology *in vitro* 28, 742-750.

Lelièvre, D., Justine, P., Christiaens, F., Bonaventure, N., Coutet, J., Marrot, L., Cotovio, J., 2007. The episkin phototoxicity assay (EPA): Development of an *in vitro* tiered strategy using 17 reference chemicals to predict phototoxicity potency. Toxicology *in vitro* 21, 977-995.

Liebsch, M., Barrabas, C., Traue, D., Spielmann, H. (1997). Development of a new *in vitro* test for dermal phototoxicity using a model of reconstituted human epidermis. Altex 14, 165-174.

Netzlaff, F., Lehr, C.M., Wertz, P.W., Schaefer, U.F. (2005). The human epidermis models Episkin<sup>®</sup>, SkinEthic<sup>®</sup> and EpiDerm<sup>®</sup>: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics 60, 167-178.

OECD. (2004). OECD guideline for testing of chemicals, Section 4: Health effects. Test No. 432. *In vitro* 3T3



- NRU phototoxicity test. OECD.
- OECD. (2015a). OECD guideline for testing of chemicals, Section 4: Health effects. Test No. 431. *In vitro* skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. OECD.
- OECD. (2015b). OECD guideline for testing of chemicals, Section 4: Health effects. Test No. 439. *In vitro* skin irritation: reconstructed human epidermis test method. OECD.
- Onoue S., Igarashi, N., Yamada, S., Yoshiko, T. (2008). High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: An enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substance. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 46, 187-193.
- Portes, P., Pygmalion, J., Popovic, E., Cottin, M., Mariani, M. (2002). Use of human reconstituted epidermis EpiSkin® for assessment of weak phototoxic potential of chemical compounds. *Photodermatology, photoimmunology and photomedicine* 18, 96-102.
- Poumay, Y., Coquette, A. (2007). Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Archives of dermatological research* 298, 361-369.
- Spielmann, H., Müller, L., Averbeck, D., Balls, M., Brendler-Schwaab, S., Castell, J.V., Curren, R., de Silva, O., Gibbs, N.K., Liebsch, M., Lovell, W.W., Merk, H.F., Nash, J.F., Neumann, N.J., Pape, W.J.W., Ulrich, P., Vohr, H-W. (2000). The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 42. *Alternatives to laboratory animals* 28, 777-814.
- ZEBET/ECVAM. (1997). Phototoxicity protocol for use with EpiDerm™ model (EPI-200) final version (5th November 1997). ZEBET/ECVAM.