

향료에 대한 ITS(Integrated Test Strategy) 접근을 통한 광독성 평가

박세라, 조선아, 김영소, 안수선*

(주) 아모레퍼시픽 R&D Unit

Evaluation of Phototoxicity through Integrated Test Strategy Approaches for fragrance

Sae-ra Park, Sun-A Cho, Youngso Kim, Susun An*

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

ABSTRACT. Although fragrance-free cosmetics are increasing in recent years, fragrance is still an important element of cosmetics. The phototoxicity of fragrance used in cosmetics is tested to confirm the safety before used. Because fragrances are mixtures of various aromatic compounds and exact composition of them are not disclosed by the fragrance company, it is difficult to analyze and/or presume the cause of phototoxicity. Therefore, it is important to use the test method having good applicability to various mixture and high reliability of results. In this study, we tried to establish an appropriate ITS approach to improve the reliability of the cosmetic fragrance toxicity test. Three animal alternatives, 3T3 neutral red uptake phototoxicity assay (OECD TG 432), Reactive oxygen species assay, Molar absorption (extinction) coefficient (MEC) measurement test were performed and coincidence rates among tests were compared. As a result, the application of the ITS approach wasn't suitable for fragrances due to the lack of harmonization of the three test methods and different positive rates. 3T3 neutral red uptake phototoxicity assay presumed to be most suitable for the evaluation of the phototoxicity of fragrance in terms of safety. Reactive oxygen species assay and MEC measurement test were thought to be available to reconfirm the results of 3T3 neutral red uptake phototoxicity assay.

KEY WORDS: Animal alternatives, 3T3 NRU PT assay, ROS assay, MEC, fragrance

서론

최근 들어 무향 화장품이 많아지고 있지만, 여전히 향은 화장품의 중요한 요소이다. 향료는 수많은 성분들로 구성된 화합물로, 빛과 반응하여 광독성을 일으키는 원인이 되기도 한다. 그러나 각각의 구성 성분과 양을 정확히 알 수 없기 때문에 정확한 광독성 유발 원인을 찾는 것이 어려우므로 최대한 정확한 광독성 판정을 할 수 있도록 신뢰도가 높은 실험결과를 얻는

것이 중요하다.

화장품 원료의 광독성을 평가하는 동물실험 대체법으로는 대표적으로 OECD TG 432인 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity assay (3T3 NRU PT assay)가 있고, 물질의 활성 산소종 (Reactive oxygen species, ROS) 생성 여부를 판정하는 ROS assay와 물질의 빛 흡수 여부를 판정하는 molar absorption (extinction) coefficient (MEC) 측정 시험도 사용 가능하다. 향료의 광독성 평가에는 현재 3T3 NRU PT assay가 많이 활용되고 있는데, 향료의 사용여부 결정에 있어 광독성 결과가 중요한 역할을 하므로 정확도를 높이기 위해 ROS assay와 MEC 측정 시험의 활용도 고려할 필요가 있다. 단, 일반적인 원료와는 다른 특성을 가지므로 향료에 적합한 시험 조건을 탐색하는 과정이 선행되어야 한다. 또한 독성의 예측력을 높이기 위해 피부감작성의 접근법에 적용된 Integrated Testing Strategies

Received: 29 November 2018

Revised: 27 December 2018

Accepted: 27 December 2018

* Corresponding author: Susun An
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, 아모레퍼시픽 R&D Unit
Tel: 82-31-280-5851 Fax: 82-31-284-8478
E-mail: ssan@amorepacific.com

(ITS)개념을 활용한 체계적인 접근법도 고려해보아야 한다.

이번 연구에서는 향료 광독성 평가의 신뢰도를 높일 수 있는 광독성 ITS 접근법을 찾고자 3T3 NRU PT assay, ROS assay, MEC측정 시험 세 가지 시험법으로 향료를 평가하고 결과 일치율을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 배양조건

본 연구에서는 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity assay (3T3 NRU PT assay)에서 사용 가이드 된 마우스 섬유아세포 세포주인 Balb/c 3T3(ATCC, VA, USA)를 사용하였다. 10% new-born calf serum(NCS: Gibco, USA), 100 Unit/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 포함된 DMEM (Lonza, USA) 배지를 이용하여 37°C, CO₂ 5%에서 배양하였으며 세포 밀도가 80~90% 정도가 되면 1:3 비율로 계대를 실시하고, 시험시 계대수는 30이 넘지 않도록 하였다.

2. 실험물질

본 연구는 현재 화장품 내 사용을 고려중인 합성 조합 향료 38종을 실험물질로 하였다. 화장품에 있어서 향료는 원료 자체의 취를 가려주고 소비자의 감성적인 부분을 케어해주는 등 필수적이고 배제하기 어려운 원료이다. 그러나 동시에 빛에 반응하여 광독성을 유발, 피부 자극 또는 감작성을 나타낼 가능성이 있으므로 사용 전 이에 대한 안전성을 확보하는 것이 중요하다. 향료의 안전성은 대표적으로 동물실험 대체법을 활용한 광독성 평가를 하는데, 광독성 가능성이 있는 경우 제품에 사용하지 않으므로 광독성 결과가 향료의 사용 여부 결정에 매우 중요하다. 그러므로 본 연구에서는 정확도 높은 광독성 평가가 중요하고, 광독성 시험법의 활용도가 높은 합성 조합 향료를 시험물질로 선정하였다.

3. 3T3 NRU PT assay

본 연구에서 수행된 3T3 NRU PT assay는 OECD TG 432에서 언급된 수행방법을 기반으로 수행하였다(OECD TG 432, 2004). 실험은 총 3일 동안 소요되는 시험으로, 첫째 날에 96well plate에 1 x 10⁴ cells/100 μ l/well 밀도로 세포를 분주해준 후 37°C,

CO₂ 5%에서 배양하였다. 이때 각 물질당 2개의 96well plate를 준비하였다(광조사용, 비광조사용). 둘째 날에, 실험물질을 에탄올과 1:1로 희석해주어 시험물질을 만들었다. 앞에서 만들어 준 시험물질은 다시 Earle's Balanced Salt Solution (EBSS; Sigma-Aldrich)로 5배 희석해주어 최종적으로 10% 농도로 희석되게 하였다. 전날 96 well plate에 분주한 세포에서 배지를 제거 후 PBS 100 μ l로 한 번 세척해주고, EBSS를 100 μ l씩 다시 넣어주었다. 이때 양성컨트롤 물질인 클로르프로마진(Chlorpromazine, CPZ)를 처리하는 plate에는 50 μ l/well, 실험물질을 처리하는 plate에는 100 μ l/well의 EBSS를 추가로 분주하였다. EBSS분주 후 CPZ는 첫 번째 시료 처리 열에 0.6 μ l/well로 넣어준 후 50 μ l씩 옮겨가며 3배 연속희석 해주었다. 실험물질은 첫 번째 시료 처리 열에 2 μ l/well로 넣어준 후 100 μ l씩 옮겨가며 2배 연속희석 해주었다. 양성 컨트롤과 시험물질 처리시 첫 번째와 마지막 열은 물질을 처리하지 않는 채로 놔두었다. 물질처리 후에는 37°C, CO₂ 7.5%에서 한 시간 동안 배양해주었다. 배양이 끝나면 광조사 plate를 광조사 기기(SUNTEST XLS+, ATLAS, USA)에 넣고 최종 5 J/cm²이 되도록 광조사 해주고, 그 동안 비광조사 plate는 실온에서 빛을 차단한 상태로 두었다. 광조사가 종료되면 EBSS를 제거 후 PBS 100 μ l로 한 번 세척해주고, 배양배지를 100 μ l/well로 분주 후 37°C, CO₂ 5%에서 배양해주었다. 셋째 날에는 배지를 제거 후 PBS 100 μ l/well로 한 번 세척해주고, 50 μ g/mL neutral red (NR) solution (Sigma-Aldrich)을 100 μ l/well로 분주한 후 37°C, CO₂ 5%에서 3시간 동안 배양하였다. 배양이 종료되면 PBS 100 μ l/well로 한 번 세척 후 NR desorb solution (water: ethanol: acetic acid = 49: 50: 1)을 150 μ l/well로 분주하고 shaker에서 100 rpm으로 한 시간 동안 용출시켜 주었다. 용출이 끝난 plate는 540nm 흡광도에서 광학밀도(optical density, OD)를 측정해주고, phototox2.0 (ZEBET, Germany) 프로그램을 이용하여 그 값을 입력하여 Photo-Irritation-Factor(PIF)와 Mean Photo Effect(MPE)를 계산하였다. 광독성의 판정은 3T3

Table 1. Criteria for determination of phototoxicity in accordance with OECD TG 432(3T3 NRU PT assay)

Evaluation	PIF	MPE
No phototoxicity	PIF < 2	MPE < 0.1
Probable phototoxicity	2 < PIF < 5	0.1 < MPE < 0.15
Phototoxicity	PIF > 5	MPE > 0.15

NRU PT assay는 OECD TG 432의 PIF와 MPE의 정의와 광독성 판정 기준을 따랐다 (Table 1).

PIF: 비조사 조건의 IC50을 조사 조건의 IC50으로 나눈 값

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr, UV \text{ 비조사조건})}{IC_{50}(+Irr, UV \text{ 조사조건})}$$

MPE: 농도 반응 곡선의 차이를 기초하여, n개의 PE값 가중평균으로 정의

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

4. Reactive Oxygen Species (ROS) assay

ROS assay는 JaCVAM에서 검증한 시험법을 참고하여 수행하였다 (JaCVAM, 2013). 먼저 실험물질의 singlet oxygen(SO)와 superoxide anion(SA)를 측정하는데 사용되는 혼합물을 준비하였다. SO는 20 mM sodium phosphate buffer (NaPB, pH 7.4) 480 μl, imidazole (Sigma-Aldrich) 250 μl, p-nitrosodimethyl aniline (RNO; Sigma-Aldrich) 250 μl와 실험물질 20 μl를 섞어주고, SA는 20 mM NaPB 855 μl, nitroblue tetrazolium (NBT; Sigma-Aldrich) 125 μl와 실험물질 20 μl를 섞어주었다. 볼텍스 믹서로 섞어준 혼합물은 초음파 분쇄기로 5~10분간 다시 섞어주고, 이를 96 well plate에 200 μl/well로 혼합물 하나당 총 세 개 well에 분주하였다. 현미경으로 100배에서 용해도와 색을 확인하여 침전이 있는 경우 추가 희석을 통하여 실험물질의 농도를 조절해주었다. 현미

경 관찰 시 이상이 없으면 5초간 다시 섞어준 후 440 nm와 560 nm에서 흡광도를 측정한 후 한 시간 동안 1.8~2.2 mW/cm², UVA intensity 6.5~7.9 J/cm²의 조건으로 광조사를 하였다. 광조사가 종료되면 1분 동안 섞어준 후 440nm와 560nm에서 흡광도를 측정하고, 이 때 색상의 변화도 같이 확인하였다. 광독성 판정은 아래의 기준에 따랐다 (Table 2).

또한, 기존 시험법의 용매인 DMSO에서는 항료의 용해도가 낮아 평가가 어려워 항료평가에 적합한 용매를 탐색하였다. 용매 후보로 20mM NaPB, ethanol, acetone을 선정하였으며, 용매 자체의 광반응 여부를 판단하기 위해 SO와 SA를 측정하는 혼합물에서 시험물질 자리에 각각의 용매만 넣어준 후 광조사를 수행하였다. 용매의 광반응 여부를 확인한 후에는 해당 용매에 대해 항료평가에 적합한 농도를 선정하여 위와 같은 평가를 수행하였다.

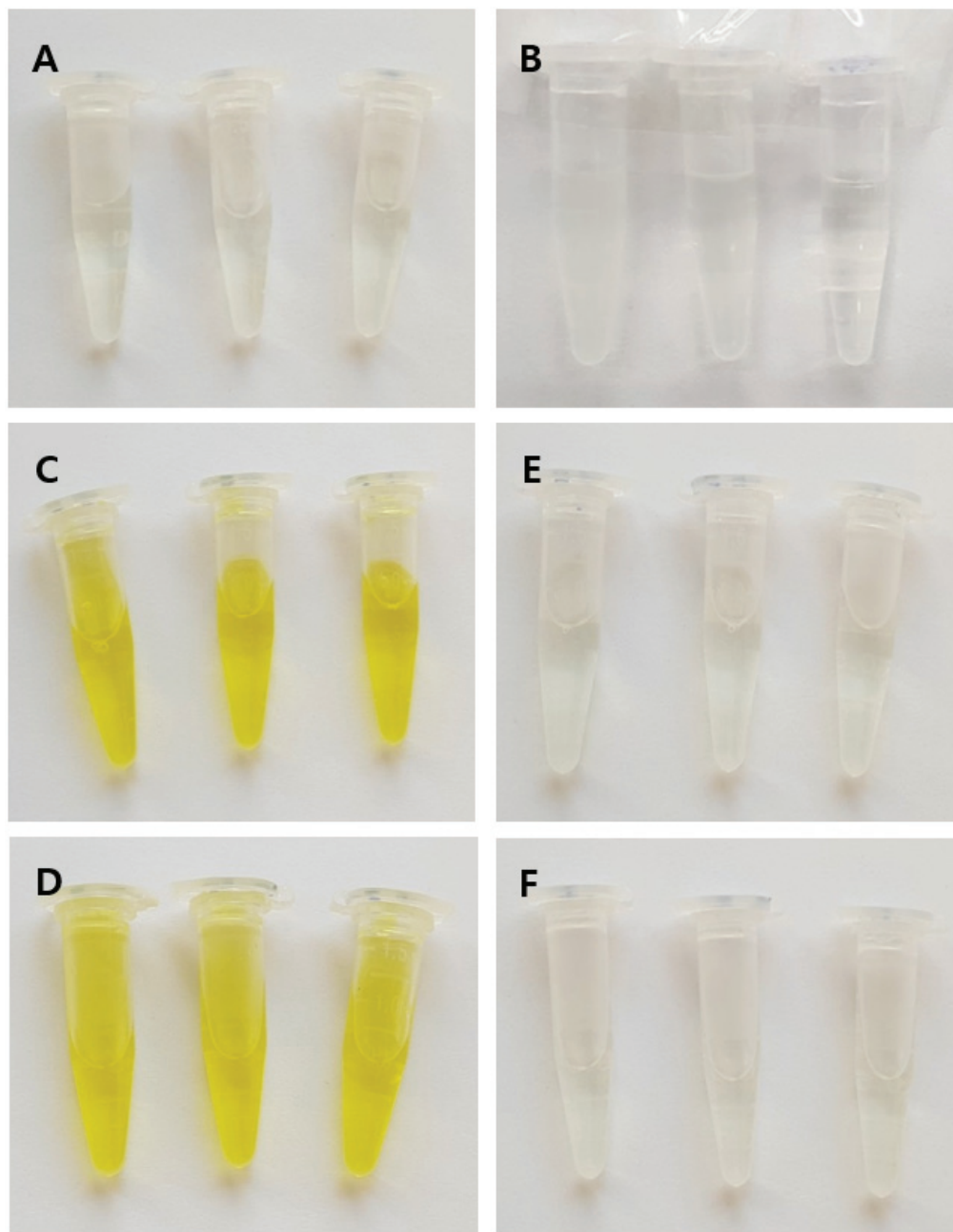
5. 몰흡광계수 측정 (molar absorption (extinction) coefficient(MEC))

실험물질의 빛 흡수여부를 평가하기 위해 몰흡광계수 측정 시험을 수행하였다. 시험법은 OECD 가이드라인 101을 참고하였다 (OECD TG 101, 1981). 실험물질은 0.002% 농도로 ethanol에 녹여 최종 1ml 용량으로 만들었으며, 분광광도계로 290~800nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 아래와 같은 식으로 MEC값을 계산하였고 MEC값이 1000 M⁻¹cm⁻¹ 이상이 되지 않는 경우 광독성을 일으킬만한 충분한 광반응성을 가지고 있지 않다고 판정하였다 (단, 반드시 광독성 가능성이 없음을 의미하지는 않음).

Table 2. Criteria for determination of phototoxicity in accordance with Reactive Oxygen Species (ROS) assay

Evaluation	Test concentration	SO ¹	SA ²
Photoreactive	200uM	≥ 25	≥ 70
		< 25 and/or Interference(I)	≥ 70
		≥ 25	< 70 and/or I
Weakly photoreactive	200uM	< 25	≥ 20, < 70
Non-photoreactive	200uM	< 25	< 20
Inconclusive	If not applicable to the above		

¹ singlet oxygen
² superoxide anion



In ethanol and acetone, the mixtures were cloudy after mixing fragrances. (A) Mixtures by solvents before mixing fragrances. From left to right, ethanol, acetone, 20mM NaPB. (B) Fragrance mixtures with the final 0.1%. The rightmost mixture using 20 mM NaPB solvent was transparent while mixtures using other two solvents were cloudy. The fragrances using 20 mM NaPB solvent were tested by concentration and all mixtures were transparent. (C, D) Comparison of mixtures measuring singlet oxygen (SO) before and after mixing fragrances. From left to right, mixing fragrances with the final 0.1%, 0.05%, and 0.01%. (E, F) Comparison of mixtures measuring superoxide anion (SA) before and after mixing fragrances. From left to right, mixing fragrances with the final 0.1%, 0.05%, and 0.01%.

Fig 1. Comparison of turbidity of mixture before and after addition of fragrance by solvent and comparison of turbidity of mixture using 20mM NaPB as a solvent by fragrance concentration.

$$A = d \sum_i \epsilon_i c_i$$

A: 흡광도(광학밀도); d: path length; ϵ_i : molar absorption (extinction) coefficient; C_i : 농도 (mol/L)

결 과

1. ROS assay에서 향료 평가에 적합한 신규 용매 탐색 및 농도 설정

광반응 무반응 용매 탐색 연구에서 ethanol, acetone, 20mM NaPB 세 가지 용매 모두 광반응은 없었으나, ethanol과 acetone은 혼합물 내에서 향료에 대한 용해도가 낮아 제외하였다 (Fig 1.). 20 mM NaPB 은 ethanol과 acetone와 달리 용해도가 좋아 이 용매를 사용하여 여러 농도의 향료를 용해하여 용해도가 좋으면서도 시험법에서 반응을 보이는 농도를 확인하였으며 (Fig 1.), 최종적으로 향료 평가에 적합한 농도와 용매 조건은 20mM NaPB와 향료 0.1%였다.

2. 각 시험법에서 향료의 광독성 평가

각 시험물질에 대한 각 시험법별 판정 결과는 Table 3. 에 나열하였다. 3T3 NRU PT assay의 경우 광독성 의심 (probable phototoxicity) 이나 양성 (phototoxicity) 판정 모두 광독성 가능성 (phototoxic potential)이 있다고 판정하였다. 이 판정기준으로 바탕으로 분류하였을 때 3T3 NRU PT assay에서 광독성 가능성 있는 향료는 22종이었다. 또한 ROS assay에서 10종의 향료가 광반응을 보였다. MEC 측정 시험에서 18종의 향료가 광반응 가능성이 있는 것으로 판정되었다.

각 시험법별 광독성 가능 판정 비율을 비교해보면, 광독성 가능 판정이 나오는 비율은 3T3 NRU PT assay (57.9%), MEC측정 시험 (47.4%), ROS assay (26.3%) 순이었다.

3. ITS적 접근을 위한 시험법간 결과비교

향료 평가에 대해 광독성 ITS (ICH S10의 의약품의 광독성 평가 전략 참고)의 적용 가능성을 확인하기 위해 먼저 각 시험법별 결과 일치율을 비교해 보았다 (Table 4.). 두 시험법간 일치율이 가장 높은 것은 ROS assay와 MEC측정 시험으로 57.9%였고, 세 시험

Table 3. Results of evaluation of phototoxicity by testing methods

Test substances (fragrances) ⁴	3T3 NRU PT assay ¹	ROS assay ²	MEC ³
fragrance 1	+	-	+
fragrance 2	+	-	+
fragrance 3	-	+	-
fragrance 4	-	-	-
fragrance 5	+	+	+
fragrance 6	+	-	+
fragrance 7	+	-	+
fragrance 8	+	-	-
fragrance 9	-	-	-
fragrance 10	-	-	+
fragrance 11	+	-	-
fragrance 12	+	-	+
fragrance 13	+	-	-
fragrance 14	+	-	-
fragrance 15	+	-	-
fragrance 16	+	-	+
fragrance 17	+	-	+
fragrance 18	+	-	-
fragrance 19	+	+	-
fragrance 20	+	+	-
fragrance 21	+	+	-
fragrance 22	-	-	-
fragrance 23	+	-	+
fragrance 24	+	-	-
fragrance 25	-	-	-
fragrance 26	-	-	-
fragrance 27	-	-	-
fragrance 28	-	-	-
fragrance 29	-	+	+
fragrance 30	-	-	+
fragrance 31	-	+	+
fragrance 32	+	-	+
fragrance 33	-	+	+
fragrance 34	-	-	+
fragrance 35	-	+	+
fragrance 36	-	-	-
fragrance 37	+	+	+
fragrance 38	+	-	-
Chlorpromazine	+	+	+
Vehicle(using solvent for each test method)	-	-	-
The evaluation rate of the phototoxic potential of chemicals	57.9%	26.3%	47.4%

¹ "phototoxicity" or "probable phototoxicity": +, "no phototoxicity": -.

² in case of photoreaction: +, in case of no photoreaction: -.

³ MEC measurement is greater than 1000: +, MEC measurement is less than 1000: -.

⁴ All fragrances in this study were complex compounds, not a single compound.

Table 4. Comparison of coincidence rates between test methods and result association with MEC measurement tests^{1,2}

3T3 NRU PT assay	ROS assay	MEC measurement test	Coincidence rate (%)
+	+	+	5.3% (2/38)
+	+	-	7.9% (3/38)
+	-	+	23.7% (9/38)
-	+	+	10.5% (4/38)
-	-	-	21.1% (8/38)
-	-	+	7.9% (3/38)
-	+	-	2.6% (1/38)
+	-	-	18.4% (7/38)
-	.	-	23.7% (9/38)
.	-	-	42.1% (16/38)
+	.	+	29% (11/38)
.	+	+	15.8% (6/38)

¹ in case of phototoxic potential: +, in case of no phototoxic potential: -.

² when calculating the coincidence rate between two test methods, the remaining one is marked .

법 모두 결과가 일치할 확률은 26.3%였다. 다음으로 MEC측정 시험의 결과와 다른 두 시험법의 결과 연관성을 확인해보았다. MEC측정 시험값이 1000 M⁻¹cm⁻¹ 미만이면 3T3 NRU PT assay도 음성인 경우는 23.7%였고, ROS assay도 음성인 경우는 42.1%였다. 반면, MEC 시험값이 1000 M⁻¹cm⁻¹ 이상이면 3T3 NRU PT assay도 광독성 가능성 있는 경우는 28.95%로 ROS assay의 15.8%보다 높았다.

토 의

향료의 경우 잘 알려진 *in vitro* 광독성 시험법인 3T3 NRU PT assay로 실험할 때 EBSS에 완전히 용해되지 않는 경우가 많고, 이는 결과의 신뢰도를 떨어뜨리는 요인이 되기도 한다. 그래서 광독성 판정의 신뢰도를 높이고 3T3 NRU PT assay 실험 전 광반응성을 스크리닝함으로써 실험의 효율도 높이고자 ITS 접근법을 시도해보았다.

평가에는 일반적으로 화장품에 적용될 수 있는 향료 38종을 사용하였으며, 광독성 시험법은 3T3 NRU PT assay, ROS assay, MEC측정 시험법 세 가지를 사용하였다. 먼저 광독성 가능성이 있는 향료를 배제하는 비율을 비교하기 위해 각 시험법별 전체 향료 중 광독성 가능 판정이 나오는 비율을 확인해 보았다. 인체나 동물 실험 결과가 없어 이 판정이 실제로도 광독성을

일으킨다고 말하기는 어렵지만, 각 시험법의 결과를 참이라 가정하였을 때 광독성 가능 판정이 나오는 비율은 3T3 NRU PT assay, MEC측정 시험, ROS assay 순이었다. 광독성 시험의 목적이 잠재적 광독성 가능성을 가진 향료를 배제한다는 점을 생각하면, 광독성 가능 판정 비율이 가장 높은 3T3 NRU PT assay가 안전성 측면에서 보수적인 선별을 한다고 할 수 있다. 즉, 세 가지 시험법 중 3T3 NRU PT assay의 결과가 가장 보수적인 선택을 한다고 할 수 있다.

앞서 말했듯이 MEC측정 시험과 ROS assay는 광독성 경로의 앞 단계를 측정하고, 실험에 소요되는 시간이 적다는 장점이 있다. 그러므로 광독성 ITS는 MEC측정 시험, ROS assay, 3T3 NRU PT assay의 순서로 각각 앞 단계의 실험 결과를 토대로 다음 실험을 진행하고자 하였다. 이러한 접근법이 가능하려면 우선 시험법간 결과 일치율이 일정 수준 이상이 되어야 하므로 이를 비교해보았다. 두 개 시험법의 일치율과 세 시험법 모두의 일치율을 먼저 비교해보았는데, 전반적으로 26~58 % 범위의 낮은 일치율을 보였다. 특히 세 시험법 모두 일치하는 경우는 26.3%로 가장 낮았으며, 두 시험법의 결과 일치율이 가장 높은 조합은 ROS assay와 MEC측정 시험으로 57.9% 이었다. 광독성 ITS의 순서대로 MEC측정 시험에서 음성으로 나온 물질이 다음 단계 실험에서도 동일하게 광독성 가능성이 없는 결과가 나오는지 확인하기 위해 MEC측정 시험값이 1000 M⁻¹cm⁻¹ 미만인 향료가 3T3 NRU PT assay 또는 ROS assay에서도 광독성 가능성이 없는지, 혹은 그 반대의 경우에 대해서도 교차 비교해 보았다. 이 역시 시험법간 일치율과 마찬가지로 기대보다 낮은 수치였는데, MEC측정 시험값이 1000 M⁻¹cm⁻¹ 미만이면 ROS assay도 무반응인 경우는 42.1%로 상대적으로 높은 일치율을 보였다. 반면 MEC측정 시험값이 1000 M⁻¹cm⁻¹ 이상이면 다른 두 시험법에서도 광독성 가능성이 있는 경우는 3T3 NRU PT assay가 ROS assay에서보다 약 두 배 높은 일치율을 보였다. 즉, 광독성 가능성이 없는 향료 판정은 ROS assay와 MEC측정 시험의 일치율이 높고, 광독성 가능성이 있는 향료 판정은 3T3 NRU PT assay와 MEC측정 시험의 일치율이 높았다.

이번 연구를 통해서 향료 광독성 평가의 신뢰도를 높일 수 있는 광독성 ITS 접근법을 찾고자 하였다. 그러나 가설과 달리 실제로는 세 시험법간 일치율이 낮았고, 향료 내 수많은 성분과 함량을 알 수 없기에 이러한 결과에 대한 정확한 해석이 어려웠다. 또한 MEC측정 시험과 ROS assay가 동시에 광독성 가능성 없

음으로 판정할 확률은 높은 편이었으나, 가장 마지막 단계인 3T3 NRU PT assay와의 일치율이 낮아 이 두 시험법만으로 광독성 여부를 판정하기엔 위험성이 있었다. 이는 동물실험 대체법 분야의 대표적인 ITS접근법인 피부 감작성과 달리 광독성을 유발하는 기전이 다양하고 복잡하며, 본 연구에 사용된 세 가지 시험법으로 기전 전체를 포함하기 어렵기 때문으로 생각된다. 그러므로 향료 평가의 경우 세 시험법 중 마지막 단계이면서 세포수준의 반응도 포함하는 3T3 NRU PT assay로 평가하는 것이 가장 적합하며, 광독성 가능 판정을 내리는 비율 역시 가장 높으므로 안전한 향료 스크리닝이라는 측면에서도 적합하다고 생각된다. 다만, 위양성이 강하게 의심되는 향료의 경우 MEC측정 시험과 ROS assay로 추가 실험함으로써 종합적인 판단을 내리는 것이 필요하며, 본 연구에서 두 시험법으로 향료를 평가해 보았으므로 이를 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 3T3 NRU PT assay에서 용해도가 너무 낮은 향료나 원료의 경우 MEC측정 시험과 ROS assay를 활용 가능할 것으로 생각된다.

Acknowledgements

본 연구는 아모레퍼시픽 R&D Unit 의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

References

- ICH guideline S10. (2012). Photosafety evaluation of pharmaceutical.
- JaCVAM. (2013). Validation report for the international validation study on ROS (Reactive Oxygen Species): Assay as a test evaluating phototoxic potential of chemicals (Atlas Suntest version).
- OECD TG 101. (1981). UV-VIS Absorption Spectra (Spectrophotometric Method).
- OECD TG 432. (2004). *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test.
- Satomi et al. (2008). High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay : An enabling technology for screening the phototoxic potential of pharmaceutical substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 46: 187-193.