

안자극 평가의 대체시험법인 인공각막모델(SkinEthic™, HCE)의 국내 확립 연구

박교현, 김배환*

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

Establishment Study of SkinEthic™ HCE eye irritation test in Korea

Kyo-Hyun Park, Bae-Hwan Kim*

Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

ABSTRACT. The objective of this study is to investigate the utility of reconstructed human corneal epithelium model(SkinEthic™, HCE) as an alternative method to eye irritation test.

We confirmed the pre-check test method for eye irritation test through condition setting of production for freeze-killed epidermis, possible direct MTT reduction with test substances, and colorant properties in test chemicals. And, we conducted eye irritation test using 8 chemicals listed in the proficiency test of the OECD test guideline 492. Summarizing the results above of assessment, it was confirmed that the SkinEthic™ HCE proves that it is so efficient and trustworthy enough to replace the eye irritation test.

Taken together, the results indicated that the SkinEthic™ HCE proposed by OECD test guideline 492 is expected to become a well-established method in Korea.

KEY WORDS: Eye irritation, SkinEthic™, HCE, OECD test guideline 492

Introduction

화학물질이 인체에 미치는 위험성으로 인해 국제사회는 화학물질에 대한 자극성 시험을 요구하고 있다. 특히, 눈은 외부의 다양한 환경에 노출되어 외부의 물질과의 접촉이 끊임없이 일어나는 신체장기로서 신물질의 개발 시 안자극 안전성평가는 반드시 필요하다(Steiling *et al.*, 1999). 따라서 안자극 안전성평가방법에 대한 연구 및 개발은 필수불가결하다.

OECD(Organization for Economic Cooperation and Development) test guideline 405에 등재된 안

자극평가법인 Draize eye irritation test는 전 세계적으로 인정되고 있으나, 자극정도를 판정하는 기준인 혼탁, 발적, 부종 등의 안구손상 반응을 육안적으로 평가하므로 평가자의 주관적인 요인으로 인해 자극의 정도가 정확하지 않게 판정 될 수 있다(Liang *et al.*, 2012). 또한, 각막에 접촉한 화학물질의 대사과정도 동물마다 차이가 있기 때문에 실제 사람에서 보이는 반응과의 유사성 여부에 대한 문제점이 제기되고 있다(Mallampati *et al.*, 2010).

최근 동물 복지에 대한 관심이 고조되고 있으며, 동물시험에 대한 동물에호단체의 강력한 반발이 끊임없이 일어나고 있다. 이러한 사회적 분위기에 맞춰 동물 시험을 대체할 수 있는 대체시험법을 많은 연구자들이 도입하려고 시도하고 있다(Mounir *et al.*, 2012). 그 중 Draize eye irritation test는 실험동물에게 큰 고통을 줄 수 있는 시험법으로, 국제사회는 Draize eye irritation test를 윤리적이고 과학적인 방법으로 대체할 수 있는 시험법의 개발을 필요로 하고 있다(Curren and Harbell, 2002).

Received: 28 November 2018

Revised: 27 December 2018

Accepted: 28 December 2018

*Corresponding author: Bae-Hwan Kim

Associate Professor

Department of Public Health, College of Natural Sciences,
Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel: 82-53-580-5933 Fax: 82-53-580-5933

E-mail: kim9399@kmu.ac.kr

현재 Draize eye irritation test를 대체할 수 있는 안점막 자극 실험의 대체법은 Neutral Red Uptake (NRU) assay, Cytosensor Microphysiometer(CM) assay, Fluorescein Leakage(FL) assay 등 배양된 세포를 이용하는 방법이 있으며, Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay, Isolated Chicken Eye(ICE) assay와 Isolated Rabbit Eye (IRE) assay, Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) assay와 같이 살아있는 생물의 장기나 수정란 등을 활용하는 방법이 있다(Freeman *et al.*, 2010, Hartung *et al.*, 2010). 이들의 대체시험법은 자극의 정도를 매우 정확하게 판정하지만 Draize eye irritation test와 같이 인체반응과의 차이에 대한 문제가 제시되면서 한계점을 가지고 있다(Wilson *et al.*, 2015).

많은 연구기관에서 Draize eye irritation test을 대체하기 위한 인공각막모델의 개발이 활발히 진행되고 있다(Doucet *et al.*, 2006). 현재 OECD test guideline 492에는 EpiOcular(MatTek, USA), HCE (SkinEthic, France) 모델이 등재되어 있으며, 이 모델들은 상업화를 위한 연구결과를 지속적으로 발표하고 있다(OECD, 2018). 최근 SkinEthic에서는 HCE 모델의 프로토콜을 일부 개량하여 발표하였으며, 새롭게 개량된 프로토콜을 이용한 연구는 아직 국내에서 실시된 적이 없으므로 국내 확립을 위해서 검증연구가 필요한 실정이다(Van Rompay *et al.*, 2018).

본 연구는 SkinEthic에서 새롭게 개량된 HCE 모델의 프로토콜에 다양한 물질을 적용하여 자극성을 평가함으로써 국내 연구자들이 HCE 모델을 이용한 다양한 연구를 시도할 때 밑바탕이 되는 자료를 제공하기 위함이다.

Materials and Methods

1. 인공각막모델

인공각막모델은 SkinEthic™에서 제조된 각막모델로서 정상 사람의 불멸화된 각막세포주를 이용하여 3차원적으로 사람의 각막 상피조직을 재구성하였다. 사람의 각막과 구조적, 형태학적, 기능적으로 유사하며, 기저, 원추 및 점액 분비세포를 가지는 특징이 있다. Insert 내 배양된 조직은 24-well plate에 담긴 gel 표면에 고정되어 인공각막모델의 배지와 함께 배송되었다.

2. 시험물질

인공각막모델의 자극성과 비자극성 판정을 위해 사용된 물질은 Table 1과 같다. Table 1의 8개 시험물질은 OECD Test guideline 492에 제시되어진 숙련도 물질 중 MTT 환원성(MTT Reducer) 및 색 간섭(colour interf.) 시험물질을 각각 1종과 액체시험물질 및 고체시험물질 각각 3종을 선택하여 진행하였으며, positive control은 Methyl acetate, negative control은 PBS(without Ca²⁺&Mg²⁺)을 사용하였다.

3. 동결사멸 인공각막조직(Freeze-killed tissue) 제작 조건설정

MTT 환원성 시험물질 적용 시 사용되는 동결사멸 인공각막조직 제작 시 동결 조건에 따른 사멸 정도를 확인하기 위해 동결온도(-20℃, -80℃)와 동결시간(24시간, 48시간)을 나누어 세포의 사멸정도를 확인하

Table 1. Test chemicals

Test number	Chemical	CASRN ¹	MTT Reducer	Colour interf.	Physical Form
1	Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	N	N	Liquid
2	2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	N	N	Solid
3	Sodium benzoate	532-32-1	N	N	Solid
4	Diethyl toluamide	134-62-3	N	N	Liquid
5	Piperonyl butoxide	51-03-6	N	N	Liquid
6	1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea	101-20-2	N	N	Solid
7	Methylthioglycolate	2365-48-2	Y (strong)	N	Liquid
8	2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide,N,N''-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-,di-D-gluconate(20%,aqueous)	18472-51-0	N	Y (weak)	Liquid

¹CASRN: Chemical Abstracts Service Registry Number

였다. 각각 다른 조건으로 동결 된 인공각막모델의 insert를 MTT solution(1 mg/mL)이 300 μ L씩 분주된 24-well plate에 배치시킨 후 차광하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 3시간 배양하였다. 이후, MTT solution을 제거하기 위해 insert를 300 μ L의 PBS를 사용하여 washing한 뒤, 거즈를 사용하여 빠르게 건조시켰다. 인공각막모델은 isopropanol이 750 μ L씩 분주된 24-well plate에 인공각막모델의 insert를 배치시킨 뒤 insert 내부에 750 μ L를 적용 후 차광하여 4시간 동안 300 rpm에서 shaking하여 하여 formazan을 추출하였다. 동결 세포의 사멸정도는 MTT assay를 실시하여 확인하였으며, 동결하지 않은 인공각막모델의 세포생존율을 100%로 설정하여 상대 비율로 계산하여 나타내었다.

4. MTT 환원성 여부 판정

MTT와 상호작용하는 물질은 MTT assay 실시 시 MTT의 비 특이적 감소를 일으킬 수 있으므로 시험 시작 전 MTT 환원성 여부를 사전에 확인하여야 한다.

6-well plate의 각 well에 MTT solution(1 mg/mL) 1 mL을 넣은 후 시험물질을 30 μ L (\pm 2 μ L) 혹은 30 mg (\pm 2 mg)을 처치하였다. 처치 후 plate는 차광하여 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 뒤 육안으로 색을 관찰하였다. 시험물질과 MTT가 서로 상호작용 시 MTT solution의 색이 노란색에서 파란색 또는 자주색으로 변하게 되며, 그 색의 변화양상을 통해 환원성 여부를 판정하였다.

5. 색간섭 여부 판정

시험물질 자체의 발색성으로 인해 인공각막조직이 염색되어 시험결과에 영향을 미칠 수 있으므로 시험 시작 전 색간섭 여부를 사전에 확인하여야 한다.

E-tube 내 증류수 90 μ L를 넣고 시험물질 10 μ L 또는 10 mg 을 첨가한 뒤, 30 \pm 2분간 상온에서 반응 후 e-tube 내 색 변화를 확인하여 색간섭 여부를 판정하였다.

6. 인공각막을 이용한 자극 평가

인공각막모델의 안정화를 위해서 pre-incubation을 실시하였다. 6-well plate의 각 well에 상온(RT)으로 예열해 둔 배양액(MEM)을 1 mL씩 넣은 후 인공각막 모델의 insert를 배치시킨다. 이후 37°C, 5% CO₂ 조

건으로 16~24시간 동안 pre-incubation 시켰다.

시험물질은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24-well plate를 이용하여 적용하였으며, 각 well에 배양액을 300 μ L씩 넣은 후 pre-incubation이 끝난 인공각막모델의 insert를 옮겨 시험물질의 성상에 따라 분류 후 적용하였다. Liquid and viscous 물질은 처치 전 PBS 10 μ L를 조직의 표면에 적용 후 insert 당 30 μ L(\pm 2 μ L)씩 처치하여 30 \pm 2분간 적용하였으며, solid 물질은 처치 전 PBS 30 μ L를 조직의 표면에 적용 후 insert 당 30 mg(\pm 2 mg)씩 처치하여 4시간 \pm 5분간 적용하였다. 물질처치가 종료 된 직후 liquid and viscous 물질은 insert 표면을 PBS 10 mL으로 2회 반복하여 washing 하였고, solid 물질은 insert 표면을 PBS 25 mL으로 1회 washing 하였다. Washing 종료 후 조직 내 잔류된 시험물질을 완전히 제거하기 위해 post-soak period를 진행하였다. Liquid and viscous 물질은 750 μ L의 배양액이 적용 된 24-well plate에 insert를 옮긴 후 insert 내부에 750 μ L의 배양액 적용 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 30분간 배양하였고, solid 물질은 4 mL의 배양액이 적용 된 12-well plate에 insert를 옮긴 후 상온에서 30분간 배양하였다. Solid 물질은 post-incubation을 실시하기 위해 1 mL의 배양액이 적용된 24-well plate를 상온으로 예열 후 post-soak period이 끝난 인공각막 모델의 insert를 옮겨 37°C, 5% CO₂ 조건에서 18시간 배양하였다.

자극평가 시험과정에서 사용한 총 8종의 시험물질 (Table 1)은 코드화하여 진행하였다.

7. 세포생존율 측정

세포생존율을 측정하기 위해서 MTT assay를 실시하였다. 미리 준비한 MTT solution(1 mg/mL)은 24-well plate에 300 μ L씩 분주하여 준비하였으며, 특정 색 제어(control) 시험물질의 경우 MTT 미포함 배지를 분주한다. Post-soak period 및 post-incubation이 종료 된 인공각막모델의 insert를 배치시킨 뒤 차광하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 3시간 배양하였다. 배양을 마친 뒤 MTT solution을 제거하기 위해 insert를 300 μ L의 PBS를 사용하여 washing한 뒤, 거즈를 사용하여 빠르게 건조시켰다. 이후, liquid and viscous 물질을 적용한 인공각막모델은 isopropanol이 750 μ L씩 분주된 24-well plate에 인공각막모델의 insert를 배치시킨 뒤 insert 내부에 750 μ L를 적용 후 차광하여 4시간 동안 300 rpm에서 shaking하여 하여

formazan을 추출하였다. Solid 물질을 적용한 인공각막모델은 isopropanol이 1.5 mL씩 분주된 12-well plate에 인공각막모델의 insert를 배치시킨 뒤 2시간 동안 300 rpm에서 shaking하여 하여 formazan을 추출하였다. 추출한 formazan 용액을 96-well plate에 200 μL씩 2회 반복 분주하여 ELISA reader를 이용해 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

8. 시험의 평가 및 해석

인공각막모델에 음성대조물질인 PBS(without Ca²⁺ & Mg²⁺)를 적용 후 MTT assay를 실시한 인공각막모델의 세포생존율(%NgC)을 100%로 설정한 후, 다른 시험물질 처리군의 생존율을 그 상대 비율로 계산하여 나타내었으며, 그 계산식은 아래와 같다. Liquid and viscous 물질은 세포생존율이 60%이하일 경우 양성으로, 60%를 초과할 경우 음성으로 판정하였다. Solid 물질은 세포생존율이 50%이하일 경우 양성으로, 50%를 초과할 경우 음성으로 판정하였다.

$$\begin{aligned} \% \text{ TT}(\text{Mean Test Treatment}) &= (\% \text{ TT1} + \% \text{ TT2})/2 \\ \% \text{ TT1} &= [\text{OD}_{\text{TT1}}/\text{mean OD}_{\text{TT}}] \times 100 \\ \% \text{ TT2} &= [\text{OD}_{\text{TT2}}/\text{mean OD}_{\text{TT}}] \times 100 \end{aligned}$$

9. MTT 환원성을 가지는 시험물질의 세포생존율 값 보정

동결 사멸된 인공각막모델과 정상 인공각막모델을 모두 이용하여 시험을 진행하였다. 대조군의 세포생존율을 우선적으로 보정 후 보정한 대조군을 이용하여 MTT 환원성을 가지는 시험물질의 세포생존율 값을 보정하였다.

MTT 환원성물질에 대한 대조군의 세포생존율은 다음과 같이 확인하였다.

$$\begin{aligned} \% \text{ NSMTT}(\text{NON SPECIFIC MTT REDUCTION CALCULATION}) &= (\% \text{ NSMTT1} + \% \text{ NSMTT2})/2 \\ \% \text{ NSMTT1} &= [(\text{OD}_{\text{kt1}} - \text{OD}_{\text{ku}}) / \text{OD}_{\text{NgC}}] \times 100 \\ \% \text{ NSMTT2} &= [(\text{OD}_{\text{kt2}} - \text{OD}_{\text{ku}}) / \text{OD}_{\text{NgC}}] \times 100 \end{aligned}$$

MTT 환원성물질 대조군으로 보정한 세포생존율 (FV_C, CORRECTED FINAL VIABILITY)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} \% \text{ FV}_C \text{ NSMTT} &= (\text{FV}_C \text{ NSMTT1} + \text{FV}_C \text{ NSMTT2})/2 \\ \% \text{ FV}_C \text{ NSMTT1} &= \% \text{ TT1} - \% \text{ NSMTT} \\ \% \text{ FV}_C \text{ NSMTT2} &= \% \text{ TT2} - \% \text{ NSMTT} \end{aligned}$$

10. 색간섭 시험물질의 세포생존율 값 보정

정상 인공각막모델을 이용하여 시험을 진행하며, 시험물질이 가지는 비 특이적인 흡광도를 측정 후 보정하였다. MTT assay 단계에서 MTT solution 처리한 모델과 배양액을 처리한 모델로 나누어 흡광도를 측정하였으며, 대조군의 세포생존율을 우선적으로 보정 후 보정한 대조군을 이용하여 색간섭 시험물질의 세포생존율 값을 보정하였다.

색간섭 시험물질에 대한 대조군의 세포생존율(%NSC_{living})은 다음과 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{OD}_{\text{TT-MTT}} &: \text{OD treated tissue without MTT incubation} \\ \% \text{ NSC}_{\text{living}} &= (\% \text{ NSC}_{\text{living1}} + \% \text{ NSC}_{\text{living2}})/2 \\ \% \text{ NSC}_{\text{living1}} &= [(\text{OD}_{\text{TT1-MTT}} / \text{OD}_{\text{NgC}}) \times 100] \\ \% \text{ NSC}_{\text{living2}} &= [(\text{OD}_{\text{TT2-MTT}} / \text{OD}_{\text{NgC}}) \times 100] \end{aligned}$$

색간섭 시험물질을 대조군으로 보정한 세포생존율은 다음과 같이 계산한다.

$$\begin{aligned} \% \text{ FV}_C \text{ NSC}_{\text{living}} &= (\text{FV}_C \text{ NSC}_{\text{living1}} + \text{FV}_C \text{ NSC}_{\text{living2}})/2 \\ \% \text{ FV}_C \text{ NSC}_{\text{living1}} &= \% \text{ TT1} - \% \text{ NSC}_{\text{living}} \\ \% \text{ FV}_C \text{ NSC}_{\text{living2}} &= \% \text{ TT2} - \% \text{ NSC}_{\text{living}} \end{aligned}$$

Results

1. 동결사멸 인공각막조직(Freeze-killed tissue) 제작 조건설정

동결사멸 인공각막조직의 세포생존율 측정결과는 Table 2와 같다. -20℃와 -80℃, 24시간과 48시간으로 나누어 제작 된 동결사멸 인공각막조직의 세포 생

Table 2. Cell Viability of freeze-killed tissue for setting production conditions

Cell Viability (%)	Tissue 1	Tissue 2	Mean	STD
Living tissue	98.6	101.4	100	1.98
-20℃, 24 hr	1.7	1.7	1.7	0.05
Freeze - killed tissue				
-20℃, 48 hr	1.8	1.7	1.7	0.05
-80℃, 24 hr	2.8	2.6	2.7	0.25
-80℃, 48 hr	2.4	2.5	2.4	0.01

존율은 모든 조건에서 낮은 수준으로 보여 조직이 동결사멸 된 것으로 확인되었으며, 조건간의 큰 차이는 보이지 않았다.

2. MTT 환원성 여부 판정

MTT 환원성물질인 methylthioglycolate는 incubation 후 보라색으로 색변화를 일으켰으며, 이는 methylthioglycolate이 MTT solution과 상호작용을 하는 것으로 볼 수 있다.

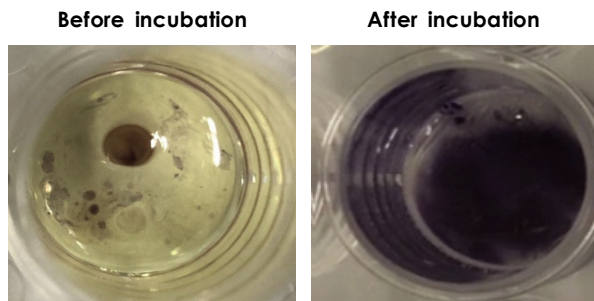


Fig 1. Result of MTT reducer in Methylthioglycolate.

3. 색간섭 여부 판정

2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide,N,N'-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconate (20%, aqueous)의 경우 약한(weak) 색반응을 나타내는 물질로, 반응 후 육안적으로 관찰한 결과 큰 변화는 확인되지 않았다.

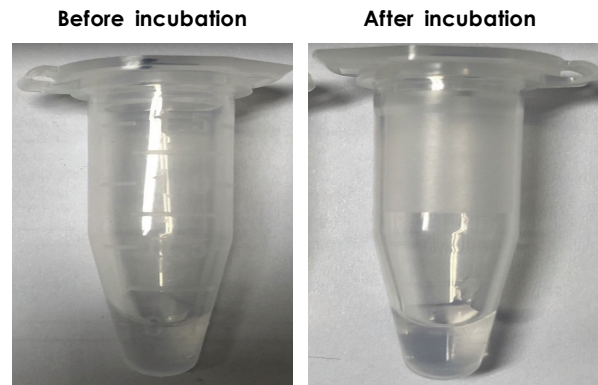


Fig 2. Result of colour interference in 2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide,N,N'-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-,di-D-gluconate (20%, aqueous).

4. 인공각막 자극 평가 시험 결과

인공각막모델을 이용한 자극평가 결과는 Table 3과 같다. Positive control로 사용한 Methyl acetate은 3.3±1.53으로 매우 강한 자극 정도를 확인하여 시험법의 적합성을 확인하였다. 2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol와 Piperonyl butoxide는 조직의 세포생존을 편차가 10.22, 16.43로 확인되어 자극의 차이가 있는것으로 보였으나 판정은 동일하게 확인되었다. 비자극 물질인 Piperonyl butoxide, 1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea은 본 시험에서 비자극으로 판정되었으나 VRM viability의 세포생존율보다 좀 낮은 정도의 세포생존율을 보였다.

Table 3. The cell viabilities for test materials

Test number	Chemical	VRM ¹ Viability	Tissue1	Tissue2	Mean	STD	Prediction
NC	PBS(without Ca ²⁺ &Mg ²⁺)	-	95.2	104.8	100.0	9.61	-
PC	Methyl acetate	-	2.5	4.1	3.3	1.53	-
1	Hydroxyethyl acrylate	1.6±1.0	0.8	0.8	0.8	0.03	I
2	2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	0.2±0.1	0.2	10.4	5.3	10.22	I
3	Sodium benzoate	0.6±0.1	0.6	0.5	0.6	0.08	I
4	Diethyl toluamide	2.8±0.9	1.0	1.0	1.0	0.03	I
5	Piperonyl butoxide	96.5±3.5	78.4	94.5	86.3	16.43	NI
6	1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)urea	101.9±6.6	80.2	77.0	78.6	3.17	NI
7	Methylthioglycolate	5.5±7.4	0.0	0.0	0.0	0.00	I
8	2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide,N,N'-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-,di-D-gluconate (20%,aqueous)	1.3±0.6	1.5	1.5	1.5	0.04	I

¹VRM : Valid Reference Method, Unit: %, NI: Non-irritants, I: Irritants

Discussion

화장품, 의약품, 식품 등의 안전성에 대한 문제가 사회적 이슈가 되는 가운데 안전성 평가법에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 관심속에서 안전성의 평가 시 사용되는 실험동물의 희생에 대해 윤리적인 측면에서 문제가 제기되고 있으며, 많은 연구진들은 동물대체시험법을 지속적으로 개발하고 있다(Sakaguchi *et al.*, 2011). 현재 안점막자극의 경우 인공각막모델, 도축된 소 안구, 돼지 안구 및 닭 안구, 유정란 등을 이용하여 평가하는 방법이 개발되었으며, 이러한 평가법은 지속적으로 개량되고 있다(Luepke 1985; Foreman *et al.*, 1996). 최근 OECD test guideline 492에 등재되어 있는 HCE 모델은 새롭게 프로토콜을 개량했으며, 본 연구에서는 새롭게 개량된 HCE 모델의 프로토콜이 국내에 확립될 수 있도록 검증연구를 실시하였다.

인공각막모델을 이용한 평가법의 경우 세포생존율을 통해 안자극 정도를 평가하게 된다. 하지만 세포생존율을 평가하기 위해 사용되는 MTT assay 실시 시 시험물질이 MTT solution과 상호작용을 하여 시험결과에 영향을 미칠 수 있으며, 시험물질이 가지는 고유의 발색성으로 인해 인공각막조직이 염색이 되어 시험결과에 영향을 미칠 수도 있다(Chakrabarti *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2005). 그러므로 인공각막모델을 이용한 안자극평가 시 시험물질의 MTT 환원성 여부와 색간섭 여부를 확인하여야 한다.

MTT 환원성 물질의 경우 최종 자극평가 시 흡광도 값의 보정을 실시하여 세포생존율을 계산하여야 한다. 보정을 실시하기 위해 동결사멸 인공각막조직이 제작되어야 하며, 인공각막조직의 세포사멸이 제대로 이루어지지 않을 경우 판정에 오류가 발생할 수 있다. 본 연구에서는 다양한 동결사멸조건에서 인공각막조직의 세포사멸정도를 확인하였으며, 대부분의 조건에서 유사한 정도의 사멸정도를 확인할 수 있었다.

OECD test guideline 492에 제시된 숙련도 물질 중 2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide, N, N''-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-, di-D-glucuronate(20%, aqueous)을 사용하여 색간섭 여부를 확인하였다. 사용한 시험물질은 고유의 발색성이 강한 물질이 아니며, 색간섭 여부확인 시 육안으로는 큰 변화가 없었다. 이는 발색성이 약한 물질의 자극여부를 확인할 때 발색여부를 확인하기 위해 추가적인 시험이 필요한 것으로 보여진다.

인공각막모델을 이용한 자극 평가 시험에서 valid reference method의 결과와 비교했을 때 시험물질의

세포생존율을 다소 낮은 것으로 보여진다. 하지만 specificity, sensitivity가 모두 100%의 결과를 보여주는 것으로 볼 때 판정에는 큰 영향을 미치지 않는 수준인 것으로 보여진다.

추후 HCE 모델을 이용하여 더욱 다양한 물질에 대해 검증실험을 실시한다면 국내에서 다양한 연구에 도움이 될것으로 기대한다.

Acknowledgements

본 논문은 산업통상자원부 및 한국산업기술진흥원의 산업융합기반구축사업의 일환으로 수행하였음(N0000848, 향장 및 화학산업 글로벌화를 위한 동물실험대체 시험인증 기반구축)

References

- Bouhifd M, Bories G, Casado J, Coecke S, Norlén H, Parissis N, Rodrigues RM, Whelan MP. (2012) Automation of an in vitro cytotoxicity assay used to estimate starting doses in acute oral systemic toxicity tests. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2084-2096.
- Chakrabarti R, Kundu S, Kumar S, Chakrabarti R. (2001) Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *Journal of Cellular Biochemistry*, 80, 133-138.
- Curren RD, Harbell JW. (2002) Ocular safety: a silent (in vitro) success story. *Alternatives to Laboratory Animals*, 30, 69-74.
- Doucet O, Lanvin M, Thillou C, Linossier C, Pupat C, Merlin B, Zastrow L. (2006) Reconstituted human corneal epithelium: A new alternative to the Draize eye test for the assessment of the eye irritation potential of chemicals and cosmetic products. *Toxicology in Vitro*, 20, 449-512.
- Foreman DM, Pancholi S, Jarvis-Evans J, McLeod D, Boulton ME. (1996) A simple organ culture model for assessing the effects of growth factors on corneal re-epithelialization. *Experimental Eye Research*, 62, 555-564.
- Freeman SJ, Alépée N, Barroso J, Cole T, Compagnoni A, Rubingh C, Eskes C, Lammers J, McNamee P, Pfannenbecker U, Zuang V. (2010) Prospective validation study of reconstructed human tissue models for eye irritation testing. *ALTEX*, 27, 261-266.
- Hartung T, Bruner L, Curren R, Eskes C, Goldberg A, McNamee P, Scott L, Zuang V. (2010) First alternative method validated by a retrospective weight-of-evidence approach to replace the Draize eye test for the identification of non-irritant substances for a defined applicability domain. *ALTEX*, 27, 43-51.
- Liang H, Baudouin C, Daull P, Garrigue JS, Brignole-Baudouin F. (2012) Ocular safety of cationic emulsion of

- cyclosporine in an in vitro corneal wound-healing model and an acute in vivo rabbit model. *Molecular Vision*, 18, 2195-2204.
- Luepke NP. (1985) Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*, 23, 287-291.
- Mallampati R, Patlolla RR, Agarwal S, Babu RJ, Hayden P, Klausner M, Singh MS. (2010) Evaluation of EpiDerm™ full thickness-300(EFT-300) as an in vitro model for skin irritation: studies on aliphatic hydrocarbons. *Toxicology in Vitro*, 24, 669-676.
- OECD. (2018). OECD guideline for testing of chemicals, Section 4 : Health effects, Test No. 492. Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. OECD.
- Peng L, Wang B, Ren P. (2005) Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45, 108-111.
- Sakaguchi H, Ota N, Omori T, Kuwahara H, Sozu T, Takagi Y, Takahashi Y, Tanigawa K, Nakanishi M, Nakamura T, Morimoto T, Wakuri S, Okamoto Y, Sakaguchi M, Hayashi T, Hanji T, Watanabe S. (2011) Validation study of the short time exposure (STE) test to assess the eye irritation potential of chemicals. *Toxicology in Vitro*, 25, 796-809.
- Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, de Silva O. (1999). The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology in Vitro*, 13, 375-384.
- Van Rompay AR, Alépée N, Nardelli L, Hollanders K, Leblanc V, Drzewiecka A, Gruszka K, Guest R, Kandarova H, Willoughby JA Sr, Verstraelen S, Adriaens E. (2018). CON4EI: SkinEthic™ Human Corneal Epithelium Eye Irritation Test (SkinEthic™ HCE EIT) for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. *Toxicology in Vitro*, 49, 11-20.
- Wilson SL, Ahearne M, Hopkinson A. (2015) An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicol. In Vitro*, 327, 32-46.