

피부감작능 평가 대체시험법간 위양성 및 위음성 화학물질에 대한 인체 세포주 활성화방법의 전수에 따른 예측력 평가

조아람, 여경옥¹, 정미숙², 이재희, 양수정, Ravi Gautam, 이기용³,
조지훈, Manju Acharya, Anju Maharjan, 김창열⁴, 허용*

대구가톨릭대학교 바이오메디칼대학 산업보건학과

¹한국화학융합시험연구원, ²바이오톡스텍(주), ³대구가톨릭대학교 GLP센터, ⁴대구가톨릭대학교 대학원 독성학과

Skin Sensitizing Predictability on Chemical Substances with False Positivity or Negativity Following the Transfer of Human Cell Line Activation Test

AhRang Cho, KyengUk Yeo¹, MiSook Jung², JaeHee Lee, SuJeong Yang, Ravi Gautam, GiYong Lee³,
JiHun Jo, Manju Acharya, Anju Maharjan, ChangYul Kim⁴, Yong Heo*

Daegu Catholic University, College of Bio and Medical Sciences, Dept. Occupational Health, 13-13 Hayang-ro,
Hayang eup, Gyongsan si, Gyeongbuk 38430, Korea

¹Korea Testing & Research Institute, Healthcare Research Institute, Jeonnam 58141, Korea

²Biotoxtech Co., Ltd., Pharmacology Efficacy Team, Chungbuk 28115, Korea

³Daegu Catholic University, GLP Center

⁴Daegu Catholic University, Graduate School Dept. Toxicology

ABSTRACT. The *in vitro* alternative assay for evaluating skin sensitizing potentials (SSP) called human Cell Line Activation Test (h-CLAT) has been recently adopted as an international test guideline. The present study was proceeded to pursue the domestic establishment and expansion of h-CLAT. The standard operational procedure was prepared in detail by the lead laboratory (LL) and transferred to one participating laboratory (PL). The LL demonstrated technical proficiency for the 10 substances listed in OECD TG 442E. The PL also demonstrated a certain level of proficiency, in that 4-phenylenediamine and 4-aminobenzoic acid distributed with coded names were correctly classified as positive and negative on SSP, respectively, and other indices including 75% cell viability (CV75) and relative fluorescence intensity (RFI) % for CD54 and CD86 were fell within the reference range. Methyl methacrylate, nickel chloride, and resorcinol, which are inconsistent in predicting SSP through various alternative test methods, were unanimously predicted as negative, positive, and positive on SSP by the two laboratories for the first time through h-CLAT. Both chlorobenzene and sodium lauryl sulfate with the existing h-CLAT report as positive and negative, respectively, were predicted as negative by the PL, which could contribute toward overall categorization into non-skin sensitizer.

KEY WORDS: human-Cell Line Activation Test, Predictability, Transferability, false positive or negative chemicals, skin sensitization

Received: 11 August 2020

Revised: 8 December 2020

Accepted: 8 December 2020

* Corresponding author: Yong Heo, DVM, Ph.D.
13-13 Hayang-ro, Hayang eup, Gyongsan si, Gyeongbuk
38430, Korea
Dept. Occupational Health, College of Bio and Medical
Sciences Daegu Catholic University
Tel: 82-53-850-3737
E-mail: yheo@cu.ac.kr

서 론

인체 세포주 활성화 방법 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT)은 화학물질의 피부감작능을 평가하는 대체시험법으로서 2016년 7월 경제협력개발기구 (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) 공인시험법(Test Guideline; TG) 442E로 채택되었다 (OECD, 2016). 본 시험법은 피부감작물질의 Adverse Outcome Pathway (AOP)에 의거하여 2018년 6월 U937 cell line activation test, Interleukin-8 Reporter Gene Assay와 함께 OECD TG 442E로 재차 등재되었다 (OECD, 2018). 인체 세포주 활성화 방법은 AOP 3단계에 속하는 시험법으로 수지상세포 계열인 THP-1의 세포막 발현 항원인 CD54 및 CD86의 발현정도가 피부감작성을 가진 화학물질 노출시 증가된다는 보고에 기초하였다 (Ashikaga et al., 2006). 본 시험법은 2017년 식품의약품안전평가원에서 화장품 동물대체시험법 가이드라인으로 발간된 바 있다 (식품의약품안전평가원, 2017).

인체 세포주 활성화 방법은 사람 대상 첩포검사나 국소림프절 시험에 기초를 둔 *in vivo* 시험법들에 비해 피부감작성에 대한 정확도는 낮은 것으로 평가되고 있다 (Ahn et al., 2016). 그러나 방사능물질을 사용하지 않는 친환경적 시험법이며 동물을 이용하지 않는 완전한 대체시험법으로 시험기간도 다른 피부감작성 평가 대체시험법에 비해 비교적 짧다는 점 등에서 관련 시험을 수행하는 기관 또는 기업들에게 선호될 수 있다. 대체시험법 사용이 확산되기 위해서는 해당 시험법의 기관간 전수 용이성과 더불어 높은 예측력이 우선적으로 고려된다 (USEPA, 2018). 그러나 *in silico*, *in chemico*, *in vitro* 방법에 의거한 피부감작성 평가 대체시험법의 경우 AOP 관련하여 특정 단계의 기전에 제한적으로 적용되기 때문에 위양성, 위음성 결과가 도출될 수 있는 제한점이 있고 이에 따라 각 단계별 시험법들을 조합하여 최종적으로 피부감작성을 평가하는 통합독성평가 (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)의 필요성이 제기되고 있다 (Casati, 2018). 인체 세포주 활성화 방법 역시 피부감작성 정도가 약하거나 용해도가 낮은 화학물질의 경우 위음성으로 판정될 가능성이 언급되었고 pro-hapten 및 pre-hapten의 경우도 위음성으로 판정될 가능성이 본 시험법의 제한점으로 기술되어 있다 (OECD, 2018).

본 연구에서는 식품의약품안전평가원에서 제정한

h-CLAT 시험관련 가이드라인에 의거하여 주관기관인 대구가톨릭대학교에서 표준시험법을 수립한 뒤 과거 본 시험법을 수행한 이력이 없는 국내 공인된 GLP 1개 기관 (참여기관, 한국화학융합시험연구원)에 시험법을 전수하고 전수의 완결성을 평가함에 동시에 다른 피부감작성 평가 대체시험법에서 위양성 혹은 위음성으로 결과가 발표된 5개 시험물질(methyl methacrylate, nickel chloride, chlorobenzene, sodium lauryl sulfate, resorcinol)에 대해 상기 2개 기관에서 예측력 시험을 수행한 결과를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. h-CLAT 표준시험법 개요

표준시험법은 OECD TG 442E, DB-ALM Protocol no. 158 (EURL-ECVAM, 2016), 화장품 피부감작성 동물대체시험법(인체 세포주 활성화 방법, h-CLAT) 가이드라인 (식품의약품안전평가원, 2017)을 토대로 작성하였으며 개요는 다음과 같다.

1) 세포배양

세포배양 전과정은 ECVAM Good Cell Culture Guideline (Coecke et al., 2005; Hartung et al., 2002)에 의거 수행하였다. 각 시험 참여 기관별로 THP-1 세포를 미국 American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA)에서 구입하여 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, Utah, USA), 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 1% penicillin-streptomycin-neomycin mixture (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) 함유된 RPMI-1640 배양배지를 이용하여 배양하였다. 세포수 2배 증식 시간 (doubling time)이 30~55시간 이내로 반응성 확인시험 (reactivity check)에서 양성 대조물질인 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCEB), 황산니켈 (NiSO₄) 및 음성 대조물질인 lactic acid 각각에 대하여 양성 또는 음성 기준에 부합한 경우에 한하여 해당 세포주를 사용하였다 (식품의약품안전평가원, 2017).

2) 용량설정시험 (Dose-finding assay)

시험대상물질에 대해 75% 세포생존률 (CV75)을 결정하고 이를 기준으로 본 시험에서 평가할 8개 시험 농도를 결정하기 위하여 2회 반복 실시하였다. 본 시험에 사용된 5개의 화학물질은 모두 Sigma-Aldrich

사에서 구입하였으며 주관기관 신뢰정보증부서 (Quality Assurance Unit; QAU)에서 암호화하여 주관기관 및 참여기관 시험자에게 전달하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 부형제에 2배 연속 희석한 8개 농도의 시험 물질을 THP-1 세포에 (10^6 cells/ml) 5% CO₂ 배양기에서 24시간 노출시킨 후 propidium iodide (PI, 0.25 µg/tube, Sigma-Aldrich) 용액을 첨가하고 유세포분석기를 (FACSCalibur, BD Bioscience, San Jose, California, USA) 이용하여 CV75를 결정하였다.

3) 예측력 (predictability) 평가 본시험

시험물질의 피부감작성을 평가하는 예측력 시험은 독립적으로 2회 반복하였다. 각 시험물질별로 8개 농도로 (1.2x CV75, CV75, 1/1.2x CV75, 1/1.2²x CV75, 1/1.2³x CV75, 1/1.2⁴x CV75, 1/1.2⁵x CV75, 1/1.2⁶x CV75) 5% CO₂ 배양기에서 THP-1 세포에 (10^6 /ml) 24시간 노출시킨 후 FACS tube에 수집하고 완충액 (0.1% bovine serum albumin PBS)으로 2회 세척하였다. 다음으로 600 µl blocking solution (0.01% globulin 함유 FACS 완충액, Sigma-Aldrich) 을 첨가하여 4°C에서 15분간 정치시킨 후 3개의 분취액으로 나누어(180 µl/FACS tube) 원심분리한 뒤 fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD54 (Dako, Denmark), FITC-labeled anti-CD86 (BD-PharMingen), mouse IgG1 isotype control (BD-PharMingen) 50 µl 씩 각 tube에 넣고 4°C에서

30분간 정치시켰다. 이후 2회 세척한 다음 PI 용액을 넣고 유세포분석을 실시하였다. CD54와 CD86 각각의 relative fluorescence intensity (RFI) 계산식은 다음과 같다: [(시험물질 처리 세포 mean fluorescence intensity (MFI)-시험물질 처리 세포 isotype control MFI)/(부형제 처리 세포 MFI-부형제 처리 세포 isotype control MFI)] x 100. 피부감작성 양성 판정은 다음과 같다: 시험물질 하나 이상의 농도에서 CD54 RFI가 200% 이상 또는 CD86 RFI가 150% 이상인 경우로 해당 농도에서 세포생존율은 50% 이상이어야 함. 양성대조물질로 DNCB (4 µg/ml)를 사용하였다.

2. 숙련도 시험

주관기관 시험자의 경우 OECD TG 442E Appendix II에 (OECD, 2018) 제시되어있는 10개의 숙련도 확인 용 권장 물질에 대해 숙련도 시험을 수행하여 최소 8 개 이상 물질에 대해 Appendix에 제시된 CV75, EC (Effective concentration) 150, EC200 값을 도출함으로써 h-CLAT 시험에 대한 숙련도가 확인되었다 (자세한 숙련도 시험 결과는 Lee et al., 2019에 제시되어 있음). 참여 기관의 경우, 주관기관 QAU에서 피부감작성 물질인 4-phenylenediamine과 비감작성 물질인 4-aminobenzoic acid를 암호화하여 제공한 뒤 양성/음성 예측력, CV75, EC150/EC200에 대한 결과를 회신 받아 숙련도를 확인하였다.

Table 1. Proficiency test results on 4-phenylenediamine and 4-aminobenzoic acid

Test substances*	Proficiency indices	DCU [§]	KTR [§]	OECD TG [§]
4-Phenylene diamine	CV75 [§]	46.4±1.4 [∨]	74.5±12.7	5~95
	RFI [§] for CD54	1638	267	
	RFI for CD86	226	169	
	EC200 [§] for CD54	18.8	71.0	Negative(>1.5)
	EC150 for CD86	19.9	1.0	Positive(<40)
	Skin sensitivity	Sensitizer	Sensitizer	Sensitizer
4-Amino benzoic acid	CV75	>1000	>1000	>1000
	RFI for CD54	110	183	
	RFI for CD86	144	122	
	EC200 for CD54	NC [§]	NC	Negative(>1000)
	EC150 for CD86	NC	NC	Negative(>1000)
	Skin sensitivity	Non-sensitizer	Non-sensitizer	Non-sensitizer

[§]DCU: Daegu Catholic University, KTR: Korea Testing & Research Institute, OECD TG: OECD TG 442E Appendix II, CV75: The concentration (µg/ml) at which the test substance demonstrates 75% cell viability, RFI: The highest relative fluorescence intensity % among the eight serially diluted concentrations tested, EC200/EC150: the concentration (µg/ml) at which the test substance induces an RFI of 200% for CD54 or 150% for CD86, respectively, NC: Not calculated.

*The test substances were coded and distributed to experimenters prior to the h-CLAT assays.

[∨]Data are expressed as mean±SD from two independent experiments.

Table 2. Predictability test results on chlorobenzene, methyl methacrylate, nickel chloride, resorcinol, and sodium lauryl sulfate

Test substances (CAS No.)*	Proficiency indices	DCU [§]	KTR [§]	Other test methods [†]
Chlorobenzene (108-90-7)	CV75 [§]	367.4±61.7 [‡]	577.3±107.6	LLNA:DA, LLNA:BrdU-ELISA: false positive LLNA, LLNA:BrdU-FCM: non-sensitizer DPRA, KeratinoSens: non-sensitizer h-CLAT: sensitizer
	RFI [§] for CD54	551.5±320.3	132.0±28.3	
	RFI for CD86	463.5±200.1	137.5±16.3	
	EC200 [§] for CD54	222.0±183.8	NC [§]	
	EC150 for CD86	208.5±112.4	NC	
	Skin sensitivity	Sensitizer	Non-Sensitizer	
Methyl methacrylate (80-62-6)	CV75	>1000	>1000	LLNA: sensitizer(weak) LLNA:BrdU-FCM: non-sensitizer DPRA: sensitizer TIMES-SS: non-sensitizer
	RFI for CD54	112.5±14.8	157.5±24.7	
	RFI for CD86	118.5±20.5	108.5±7.8	
	EC200 for CD54	NC	NC	
	EC150 for CD86	NC	NC	
	Skin sensitivity	Non-sensitizer	Non-sensitizer	
Nickel chloride (7718-54-9)	CV75	82.8±10.0	104.9±9.8	Human: sensitizer LLNA: false negative LLNA:BrdU-FCM: false negative Human epidermis IL-18 assay: non-sensitizer KeratinoSens: sensitizer LuSens: non-sensitizer
	RFI for CD54	1543.5±444.8	2755.0±1021.1	
	RFI for CD86	460.0±77.8	330.5±164.8	
	EC200 for CD54	18.0±2.8	17.0±19.8	
	EC150 for CD86	14.5±3.5	234.0±111.7	
	Skin sensitivity	Sensitizer	Sensitizer	
Resorcinol (108-46-3)	CV75	548.1±14.4	525.9±68.2	HMT: negative HPTA: positive LLNA: false negative DPRA, KeratinoSens: false negative
	RFI for CD54	352.5±43.1	584.0±189.5	
	RFI for CD86	260.5±150.6	145.5±3.5	
	EC200 for CD54	317.5±4.9	227.5±72.8	
	EC150 for CD86	419.5±317.5	NC	
	Skin sensitivity	Sensitizer	Sensitizer	
Sodium lauryl sulfate (151-21-3)	CV75	68.2±4.9	44.6±18.5	HMT: negative LLNA, LLNA:DA, LLNA:BrdU-ELISA, LLNA:BrdU-FCM: sensitizer (weak, false positive) SENS-IS: non-sensitizer h-CLAT: non-sensitizer
	RFI for CD54	492.0±325.3	190.0±4.2	
	RFI for CD86	350.5±178.9	135.5±10.6	
	EC200 for CD54	41.0±11.3	NC	
	EC150 for CD86	40.5±4.9	NC	
	Skin sensitivity	Sensitizer	Non-sensitizer	

[§]DCU, KTR, CV75, RFI, EC200/EC150, NC: abbreviations are same as the table 1.

*The test substances were coded and distributed to experimenters prior to the h-CLAT assays.

[‡]Data are expressed as mean±SD from two independent experiments.

[†]LLNA: Local lymph node assay, LLNA:BrdU-FCM: LLNA: 5-bromo-2- deoxyuridine-flow cytometry, DPRA: Direct peptide reactivity assay, TIMES-SS: Times metabolism simulator platform for predicting skin sensitisation, KeratinoSens:ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens test method, LuSens: ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method, HMT: Human maximization test, HPTA: Human patch test allergen.

3. 통계처리

시험 기관간 CV75, CD54 RFI %, CD86 RFI %, EC150, EC200 값들에 대한 유의한 차이는 SigmaPlot 통계프로그램(Systat Software, Point Richmond, CA, USA)을 이용하여 검토하였다. 우선 정규분포 여부를 Shapiro Wilk test에 의해 수행하고 정규분포시

에는 2차적으로 등분산 여부를 Brown-Forsythe test 로 검토한 후 Student's *t*-test (등분산) 또는 Welch's *t*-test (비등분산)를 최종적으로 수행하여 유의성을 검증하였다. 비정규분포시에는 Mann-Whitney Rank Sum test로 유의성 검정을 시행하였다. *p* value가 0.05 미만일 때를 유의한 차이로 판정하였다.

결 과

1. 숙련도 시험

주관기관으로부터 h-CLAT 시험법을 전수받은 참여 기관에서 5개 시험물질에 대한 예측력 시험에 앞서 시험자의 시험법 수행에 있어서 숙련도를 평가하기 위하여 암호화된 4-phenylenediamine과 4-aminobenzoic acid를 이용하여 용량설정시험을 포함한 예측력 평가 본시험을 수행하였다. 주관기관 역시 참여기관에서 생성한 자료와 비교하기 위하여 동일 시험을 수행하였다. 2회 반복하여 얻은 CV75 값은 두 기관간 유의한 차이는 없었다 (Table 1). RFI % 산출을 통한 시험물질 양성·음성 판정에 있어서도 두 기관 모두 4-phenylenediamine은 피부감작성 물질로, 4-aminobenzoic acid는 비감작성 물질로 OECD TG 442E에 제시된 판정과 동일하였다. 또한 CV75, EC200, EC150 값들 역시 OECD TG 442E에 제시된 범위 (reference range)에 속하였다. 한편, 4-phenylenediamine 시험물질 경우 OECD TG 442E 에서는 CD54에 대한 기준이 음성으로 제시되어 있지만 본 연구를 수행한 두기관 모두 양성의 결과를 도출하였다. 그러나 OECD TG 442E Appendix II 주석에 설명된 “양성의 결과를 얻는 경우 EC200 값이 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하여야 된다”는 전제 조건에는 부합하였다.

2. 위양성 및 위음성 물질에 대한 예측력 시험

예측력 시험은 2회 독립 시험을 반복하는데 피부감작성 판정 결과가 양성 혹은 음성으로 동일하면 시험이 종료되지만 일치하지 않는 경우에는 1회 추가 시험을 하여 3회 중 2회 일치된 판정결과에 의거하여 양성 혹은 음성으로 최종 판정한다. 각 시험이 유효하기 위해서는 다음과 같은 선행 조건을 만족하여야 한다: 용매 또는 부형제 대조군의 경우 ①세포생존율>90%, ②isotype control 대비 CD54 및 CD86 MFI>105%, ③배양배지 대조군 대비 부형제 (DMSO) 대조군 CD54 RFI<200%, ④배양배지 대조군 대비 부형제 (DMSO) 대조군 CD86 RFI<150%; DNCB 양성 대조군의 경우 ①세포생존율>90%, ②CD54 RFI \geq 200%, ③CD86 RFI \geq 150%. 각 기관에서 이러한 조건을 만족하는 2회 독립 시험 결과를 Table 2에 제시하였다.

시험 기관간 CV75, CD54 RFI %, CD86 RFI %, EC150, EC200 값들은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. Methyl methacrylate는 두 기관 공통적

으로 음성, 즉 비감작성 물질로 판정되었다. Nickel chloride 및 Resorcinol은 두 기관 모두에서 감작성물질로 판정되었다. Chlorobenzene 및 Sodium lauryl sulfate의 경우 주관기관에서는 CD54 및 CD86 RFI %가 양성기준에 해당되어 감작성물질로 판정하였지만 참여기관에서는 CD54 및 CD86 RFI %가 음성기준에 해당되어 비감작성물질로 판정하였다.

고 찰

시험물질을 암호화하여 진행된 숙련도 시험에서 주관기관 및 참여기관 모두 OECD TG 442E Appendix II에 제시되어있는 CV75, EC200, EC150 범위에 속하면서 감작성에 대한 일치된 판정 결과를 도출하였다. 또한 예측력 평가 시험에서도 5개 시험물질에 대해 두 기관간 CV75, CD54 RFI %, CD86 RFI %, EC150, EC200 값들이 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 점들은 h-CLAT 시험법이 주관기관으로부터 참여기관으로 성공적으로 전수되었다고 평가할 수 있는 근거가 될 것이다.

Methyl methacrylate은 본 연구를 통하여 h-CLAT 시험법에 의해서는 처음으로 비감작성물질로 예측된 결과를 제시하였다. 본 물질은 Local lymph node assay (LLNA), LLNA:DA, LLNA:BrdU-ELISA와 같은 마우스를 이용한 피부감작성 평가 시험법에서는 각각 90%, 99%, 79%의 높은 농도에서 감작성을 갖는 약감작성 물질로 분류되어 있다 (ICCVAM, 2010 & 2010a). *In chemico* 접근법인 Direct peptide reactivity assay (DPRA) 시험에서도 양성으로 보고된 바 있다 (Kimber, 2019). 반면 LLNA: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry (LLNA: BrdU-FCM) 시험에서는 음성으로 보고되었으며 (Ahn et al., 2016), Quantitative structure-activity relationships (QSAR) 방법인 Times metabolism simulator platform for predicting skin sensitisation (TIMES-SS)에서도 음성으로 보고된 바 있다 (Kimber, 2019). 본 연구 결과와 기존 보고된 결과를 종합하면 methyl methacrylate는 피부감작성에 있어서는 양성과 음성 경계역에 있는 borderline 물질로 분류됨이 타당할 것으로 여겨진다.

Nickel chloride의 경우 두 기관 모두 감작성물질로 판정하였는데, h-CLAT 시험법에 의한 결과로는 처음으로 발표되는 것이다. 마우스를 이용한 피부감작성 평가에서는 위음성으로 분류되고 있는데, 이는 수용성 금속의 경우 피부를 통과하기가 수월하지 않고 특히

니켈은 사람에서는 toll-like receptor 4 (TLR4)의 활성화를 통한 피부감작 유도가 기전으로 밝혀진 바, 마우스에서는 TLR4 매개 반응 기전이 유용하지 않다는 점에서 LLNA 기반 대체시험법에서 위음성 결과 도출이 설명되고 있다 (Schmidt et al., 2010). *In vitro* 시험법인 ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method (LuSens) 시험 결과 음성으로 보고된 바 있으나, ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens test method (KeratinoSens)에서는 양성으로 보고되어 *in vitro* 대체시험법간에도 피부감작성 판정에 차이가 있다 (Urbisch et al., 2015).

Resorcinol은 pro-hapten 물질로서 피부에서 대사되어 피부감작성을 나타내는 것으로 알려져 있는 물질이지만 (Urbisch et al., 2016) Human maximization test에서는 음성으로 LLNA, DPRA, KeratinoSens 시험법에서는 위음성으로 보고된 바 있다 (Dean et al., 1999). 그러나 Human patch test allergen에서는 양성으로 보고되고 있고 본 연구에서도 두 기관 모두 양성으로 판정한 결과는 resorcinol 물질이 알레르기성 접촉성 피부염을 유발할 수 있음을 뒷받침한다고 생각된다. Nickel chloride와 resorcinol에 대한 본 연구 결과에 따르면 h-CLAT 시험법이 다른 *in vitro* 대체시험법에 비해 피부감작성 결정에 효과적인 시험법으로 고려될 수 있을 것이다.

Sodium lauryl sulfate와 chlorobenzene의 경우 주관기관과 참여기관 감작성 판정에 차이가 있었다. Sodium lauryl sulfate는 OECD TG 429 (OECD, 2010) Annex I에 따르면 LLNA 시험법에서는 위양성으로 분류되고 있는데 LLNA: DA, LLNA: BrdU-ELISA, LLNA: BrdU-FCM 시험법에서도 양성으로 보고되었다 (Ahn et al., 2016). DPRA 시험법에서는 “inconclusive”로 최종 결론이 유보되었지만 SENS-IS 및 타 연구에서 수행된 h-CLAT 시험에서는 음성으로 보고되었다 (Clouet et al., 2017). Sodium lauryl sulfate 물질이 LLNA 기반 마우스 피부감작성 평가 시험법에서 공통적으로 위양성 (약감작성) 결과가 도출되는 것은 마우스에서 면역기전이 관여되지 않은 아직까지 규명되고 있지 못하는 어떠한 이유에서일 것이라 추론되고 있다 (Ahn et al., 2016). 이러한 점들을 고려하였을 때 본 연구 주관기관에 비해 참여기관에서 보다 정확한 결과가 도출되었다고 여겨지며 sodium lauryl sulfate는 비감작성 물질로 판정함이 객관적이라 생각된다. Chlorobenzene 역시 주관기관과 참여기관 감작성 판정에 차이가 있었다. Chlorobenzene은 OECD TG 429 (OECD, 2010) LLNA 시험법 및

LLNA: BrdU-FCM 시험법에서는 (Ahn et al., 2016) 음성으로 분류되고 있으나 LLNA: DA 및 LLNA: BrdU-ELISA 시험법에서는 양성으로 보고되었다. DPRA 및 KeratinoSens 시험 결과 역시 비감작성 물질로 보고된 바 있다 (Kolle et al., 2019). 반면 타 연구에서 수행된 h-CLAT 시험에서는 피부감작성 양성으로 보고되었다 (Takenouchi et al., 2015). 인체 피부감작성에 대한 유용한 임상자료가 거의 없는 상황에서 여러 대체시험법 결과가 피부감작성 양성 혹은 음성으로 나뉘고 있기에 본 연구 결과와 연계시켜 chlorobenzene의 피부감작성을 어느 한쪽으로 판정하는 것은 적절하지 않다고 판단된다.

본 연구를 통하여, OECD TG 442E Appendix II에 제시되어있는 10개의 숙련도 확인용 권장 물질에 대해 성공적인 숙련도 시험 결과를 보유한 기관에서는 세포 배양에 기본적인 이론 및 실기가 축적되어 있는 기관으로 시험법 전수를 효과적으로 실시할 수 있는 기반을 마련하였다. 아울러 다른 피부감작성 평가 대체시험법에서 위양성 혹은 위음성으로 결과가 일치되지 않는 methyl methacrylate, nickel chloride, resorcinol에 대해서는 각각 피부감작성 음성, 양성, 양성으로 판정하였는데 이는 h-CLAT 시험법을 이용한 피부감작성 평가로는 처음이다. 또한 기존 발표된 h-CLAT 시험법 결과에서 양성 (chlorobenzene) 또는 음성 (sodium lauryl sulfate)으로 보고된 물질 2종류는 다양한 시험법 수행 결과를 종합하였을 때 일반적으로 비감작성 물질로 인정되고 있는 바, 본 연구 참여기관에서 모두 음성으로 판정함으로써 이러한 국제적 인정에 기여하는 계기도 마련하였다.

감사의 글

본 연구는 주로 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 용역 연구 (17182독관리406) 지원에 의해 수행되었으며 일부 한국화학물질관리협회 화학물질 위해성 평가, 관리 전문인력 양성 사업의 지원을 받아 수행되었기에 감사드립니다.

References

- 식품의약품안전평가원. (2017). 화장품 피부감작성 동물대체시험법(인체 세포주 활성화 방법, h-CLAT) 가이드라인(민원인 안내서).
- Ahn IY, Kim T-S, Jung E-S, Yi J-S, Jang W-H, Jung K-M, Park MY, Jung M-S, Jeon E-Y, Yeo K-U, Jo J-H, Park J-E, Kim C-Y, Park Y-C, Seong W-K, Lee A-Y, Chun

- YJ, Jeong TC, Jeung EB, Lim K-M, Bae SJ, Sohn SJ, and Heo Y. (2016). Performance standard-based validation study for local lymph node assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 80: 183-194.
- Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, and Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicology In Vitro* 20: 767-773.
- Casati S. (2018). Integrated approaches to testing and assessment. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 123: 51-55.
- Clouet E, Kerdine-Römer S, and Ferret P-J. (2017). Comparison and validation of an *in vitro* skin sensitization strategy using a data set of 33 chemical references. *Toxicology in Vitro* 45: 374-385.
- Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, Hay R, Merten O-W, Price A, Leonard M, Stacey G, and Strokes W. (2005). Guidance on good cell culture practice: A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Alternatives to Laboratory Animals* 33: 261-287.
- Dean J, Twerdok LE, Andersen KE, Bailey P, Hamilton RG, and Haseman JMF. (1999). The murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the interagency coordinating committee on the validation of alternative methods (ICCVAM) and the national toxicology program center for the evaluation of alternative toxicological methods (NICEATM). NIH Publication 99-4494.
- EURL-ECVAM. (2016). DB-ALM Protocol no. 158: Human Cell line Activation Test (h-CLAT). Ispra, Italy: Joint Research Centre.
- Gibbs S, Kosten I, Veldhuizen R, Spiekstra S, Corsini E, Roggen E, Rustemeyer T, Feilzer AJ, and Kleverlaan CJ. (2018). Assessment of metal sensitizer potency with the reconstructed human epidermis IL-18 assay. *Toxicology* 393: 62-72.
- Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, and David L. (2002). Good cell culture practice: ECVAM Good cell culture practice task force report 1. *Alternatives to Laboratory Animals* 30: 407-414.
- ICCVAM. (2010). ICCVAM test method evaluation report. nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA test method protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10e7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.
- ICCVAM. (2010a). ICCVAM test method evaluation report. nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10e7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.
- Kimber I. (2019). The activity of methacrylate esters in skin sensitisation test methods: a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 104: 14-20.
- Kolle SN, Natsch A, Gerberick F, and Landsiedel R. (2019). A review of substances found positive in 1 of 3 *in vitro* tests for skin sensitization. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 106: 352-368.
- Lee JH, Cho AR, Gautam R, Kim YG, Shin SJ, Song ES, Kim HJ, Yang SJ, Acharya M, Jo JH, Maharjan A, Shim IS, Kim HM, Kim PJ, Kim TS, Lee JK, Kang MJ, Jeong TC, Kim CY, Kim Ah, and Heo Y. (2019). Prediction of the skin sensitization potential of didecyltrimethylammonium chloride and 3,7-dimethyl-2,6-octadienal and mixtures of these compounds with the excipient ethylene glycol through the human Cell Line Activation Test and the Direct Peptide Reactivity Assay. *Toxicology and Industrial Health* 35: 507-519.
- OECD. (2010). OECD guideline for the testing of chemicals. Skin sensitization: Local lymph node assay.
- OECD. (2016). OECD guideline for the testing of chemicals. *In Vitro* Skin sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT).
- OECD. (2018). Key event-based test guideline. *In vitro* skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation.
- Schmidt M, Raghavan B, Muller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, Keck S, Kalis C, Nielsen PJ, Galanos C, Roth J, Skerra A, Martin SF, Freudenberg MA, and Goebeler M. (2010). Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature Immunology* 11: 814-819.
- Takenouchia O, Fukuib S, Okamoto K, Satoru Kurotanic, Imaic N, Fujishirod M, Kyotanid D, Katoe Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, and Miyazawa M. (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.
- Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, and Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 71: 337-351.
- Urbisch D, Becker M, Honarvar N, Kolle SN, Mehling A, Teubner W, Wareing B, and Landsiedel R. (2016). Assessment of pre- and pro-haptens using nonanimal test methods for skin sensitization. *Chemical Research in Toxicology* 29: 901-913.
- USEPA. (2018). Strategic plan to promote the development and implementation of alternative test methods with the TSCA program. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

