

# KeraSkin™ 을 이용한 피부자극시험 프로토콜

Protocol for *in vitro* skin irritation test with a 3D-reconstructed human skin model, KeraSkin™



Biosolution Co., Ltd.

(주)바이오솔루션

## 목 차

1. 서론 (Background) .....	3
2. 목적 (Purpose of the method).....	3
3. 재료 (Materials).....	3
4. 방법 (Methods).....	5
5. 결과 (Results).....	15

## 1. 서론 (Background)

본 시험방법은 한국인 유래 각질세포 (keratinocyte)를 이용하여 인체 표피와 생화학적 및 물리적으로 특성이 유사하게 제작된 인체피부모델인 KeraSkin™을 이용한 피부자극시험에 대한 시험방법을 기술하고 있다.

## 2. 목적 (Purpose of the method)

한국인 유래 각질세포로 인체 표피와 생화학적·물리적 특성이 유사하게 제작된 인체피부모델인 KeraSkin™을 이용한 피부자극시험법으로, 기존 토끼를 이용한 피부자극시험 (OECD TG 404 중 부식성을 제외한 자극성 부분)을 대체하는 것을 목적으로 한다. 본 시험방법은 물질이 인체피부모델인 KeraSkin™의 각질층(stratum corneum)을 투과하면서 나타나는 피부세포의 손상을 측정하여 화학물질이 유도하는 피부자극 가능성을 예측하는 방법으로, MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]에 대한 환원 능력으로 인체피부모델의 세포생존율을 측정한다.

## 3. 재료 (Materials)

### 3.1 시험모델 : KeraSkin™

KeraSkin™은 한국인 각질세포를 이용하여 피부의 표피를 재현한 인체피부모델로서, 사람의 정상적인 피부각질세포로 이루어져 있으며 각질층(stratum corneum), 과립층(granular), 가시층(spinous), 기저층(basal)으로 구성된 다층의 구조이다. KeraSkin™은 초대 배양된 사람 피부각질세포를 외경 12 mm (0.67cm<sup>2</sup>) Millicell®(Millipore, USA)에 접종하고 배양하여 공급되며, 24개의 조직이 agarose gel 위에 올려져 배송된다. KeraSkin™의 모든 batch는 품질보증 지표로서 음성대조군의 흡광도 값(OD), SDS에 의한 IC-50 그리고 조직병리학적 형태를 확인하여 그 결과를 제공한다.

### 3.2 실험실내 품질관리

시험모델의 배송 후, 전 배양, 물질 적용 및 후 배양을 거친 후 측정된 음성대조물질의 흡광도 값(OD)과 양성대조물질의 세포생존율을 품질관리 지표로서 사용한다. 음성대조물질은 DPBS를 사용하며, 음성대조물질의 OD값은 0.7 이상, 1.6 이하이어야 한다. 양성대조물질은 5% SDS를 사용하며, 양성대조물질의 평균 세포생존율은 40% 이하이어야 한다[Table 1].

지표	품질관리 허용범위
음성대조군(흡광도, OD <sub>570</sub> )	$0.7 \leq OD_{NC} < 1.6$
양성대조군(세포생존율)	$\leq 40\%$

[Table 1. 품질관리 기준]

### 3.3 시험물질 및 용매

본 시험의 시험물질은 물질 자체를 사용하는 것을 원칙으로 한다. 희석이 부득이한 경우 적절한 용매를 사용하되 그 과학적 근거를 제시하도록 한다.

### 3.4 시험도구 및 장비

시험과정	장비와 시약명	제조사/공급업체*	사용목적
배양	Laminar flow cabinet		무균상태에서 시험
	Cell incubator		37°C, 5% CO <sub>2</sub> 에서 조직 배양
	Water bath at 37°C		배양액과 DPBS 데움
	Extra sterile 6 well plates	BD 353046	조직 배양
	Media	From Biosolution	조직 배양
	Forceps (Small sterile blunt-edged forceps)		조직이 담긴 insert 취급
물질적용 및 세척	DPBS	Capricorn PBS-1A	음성대조물질, 시험물질 세척
	5 (aq) % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Sigma L4509 [CAS: 151-21-3]	양성대조물질
	Balance		고체물질 무게측정
	Weighing papers		고체물질 무게측정, 물질 적용
	Spatula		고체물질 무게측정, 물질 적용
	Micropipette and tips		시험과정 전체 사용
	Extra sterile 6 well plates		조직배양과 물질 처리시 사용
	Stop-watches/Timers		노출, 세척, 배양시간 사용
	Poly wash bottle		세척과정시 사용
	500 ml beakers		세척과정시 사용 (조직 씻겨낸 용액 수집 시)
	General laboratory materials (latex gloves, paper towel, 70% EtOH etc.)		-
MTT 시험	4mg/ml MTT reagent (3-4,5- dimethyl thiazole 2-yl) 2,5- diphenyltetrazolium bromide		세포생존율 측정
	DMEM (phenol red-free)	Welgene LM001-59	MTT 용해
	24-well sterile plates	BD 353047	MTT 적용
	6-well sterile plates	BD 353046	Formazan 추출
	Isopropanol	Sigma I9030	Formazan 추출

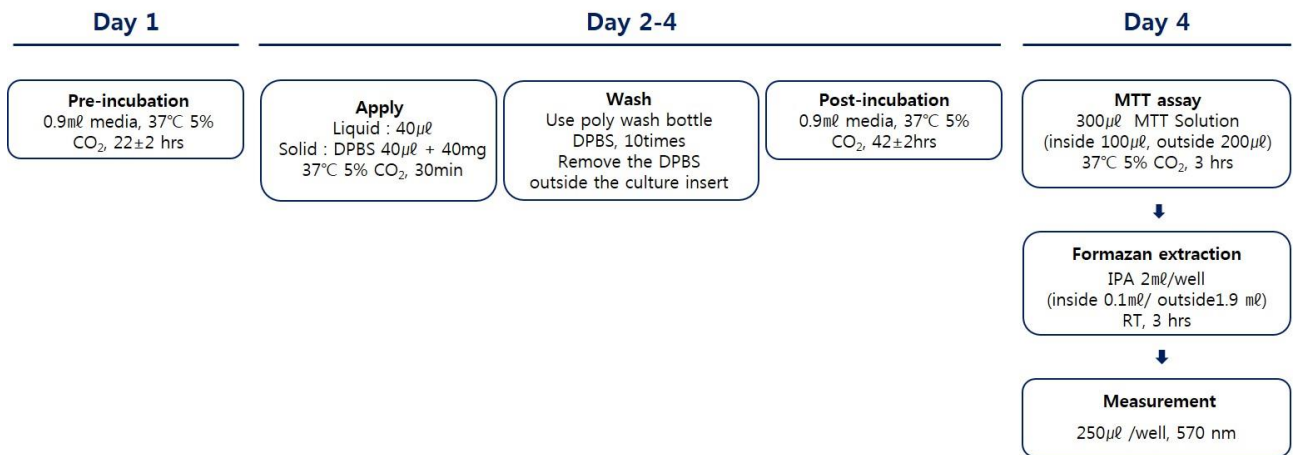
	Shaker		Formazan 추출
	96-well plates	BD 353072	OD(Optical Density)값 측정
	ELISA Plate reader (96 well)		570 nm filter 에서 OD (Optical Density)값 측정

[Table 2. 시험도구 및 장비]

## 4. 방법 (Methods)

### 4.1 시험디자인 요약

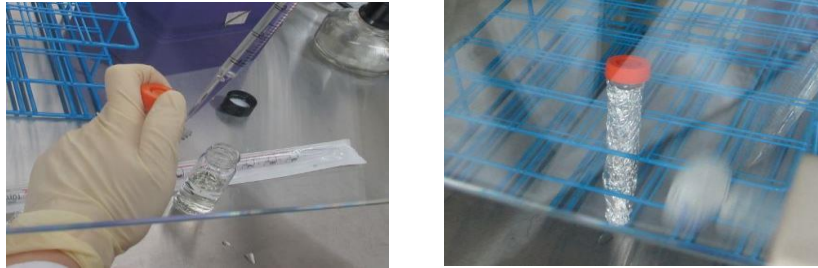
KeraSkin™을 이용한 피부자극시험을 수행하는 절차에 대해 요약은 아래와 같다[Fig 1].



[Fig 1. 시험수행절차]

### 4.2 시험물질 및 시약 준비

모든 시험물질 및 시약은 시약의 휘발성 여부, 상온에서의 물질 성상 등의 차이가 있을 수 있으므로 시험 직전에 측정하거나 조제한다. 음성대조물질은 DPBS를 이용하며, 양성대조물질은 DPBS에 5%로 희석한 SDS를 이용한다. 액체시험물질은 3개 well에 적용할 수 있는 충분한 양인 200 µl를 갈색유리병에 분주하여 준비한다. 고체시험물질은 40 mg씩 측정하여 유산지에 넣어 물질당 3개를 준비한 후 차광하여 둔다. 고체물질이 고운 가루 형태가 아닌 경우에는 막자와 막자사발을 이용하여 곱게 갈아 칭량한다. MTT 용액은 제조사에서 제공하는 10X stock solution을 water bath에서 37°C로 유지시킨 phenol red-free DMEM을 이용하여 1X로 희석하며 조제 후 차광상태로 준비한다[Fig 2].



[Fig 2. MTT용액 조제과정]

### 4.3 시험물질의 발색성, MTT 반응성 확인

시험물질에 따라 발색을 보이는 물질이 있거나, MTT와 직접적으로 반응하여 formazan을 환원시키는 경우가 있어, 시험물질 적용 전에 이를 확인한다.

#### 4.3.1 시험물질의 발색성 시험

시험물질 40  $\mu\text{l}$  또는 40 mg을 0.5 ml의 증류수가 들어있는 Eppendorf tube에 넣고 잘 섞어준 후 30분간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후에 색 변화가 있는지 확인한다. 색 변화가 큰 경우 인공피부에서 functional check를 시행한다.

#### 4.3.2 시험물질의 MTT 반응성 확인

시험물질이 조직을 직접 염색시키거나 MTT를 직접 환원시켜 formazan을 생성시킬 수 있으므로 이에 대한 확인시험을 진행한다. 시험물질 40  $\mu\text{l}$  혹은 40 mg을 0.5 ml의 0.4mg/ml MTT 용액이 들어있는 Eppendorf tube에 넣고 잘 섞어준 후 1시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후에 색 변화가 있는지 확인한다. MTT 용액이 파랑/보라색으로 바뀐 경우 시험물질이 MTT를 환원시킬 수 있으므로 동결사멸조직에서 functional check를 시행한다.

#### 4.3.3 Functional check 및 세포생존율의 보정

##### 1) 시험물질이 발색성만 갖는 경우

살아있는 조직 표면에 시험물질 40  $\mu\text{l}$  또는 40mg을 도포한 후에 본 시험법과 동일한 방법으로 세척한다. 단, MTT assay 단계에서 MTT를 넣지 않은 phenol red free-DMEM만 넣고 3시간 동안 배양한다. 살아있는 조직을 사용하는 것이므로 매 시험마다 실시해야한다. 최종 세포생존율은 보정 전 세포생존율(%TT)에서 본 시험에서 얻은 세포생존율(%NSC<sub>living</sub>)을 감해준다.

$$\%최종세포생존율 = \%TT - \%NSC_{living}$$

##### 2) 시험물질이 MTT 반응성만 갖는 경우

동결사멸된 조직을 이용하여 피부자극시험을 동일하게 실시한다. 동결사멸 인공피부의 경우 세포의 대사능력만 배제된 상태이며 피부흡수나 시험물질과의 결합능력은 유지된다. 조직이 배송 되면 이물질을 제거하고 24well plate에 넣어 -80°C에서 48시간 이상 동결시킨다. 그리고 새로

운 배지가 well 당 0.9mℓ씩 담겨있는 6well plate에 동결된 조직을 옮겨와 상온에서 약 10분간 안정화 시킨 후에 시험물질을 적용한다. 동결 사멸된 조직을 사용하므로 매 시험마다 하지 않고 한 시험물질 당 한번만 최소 duplicate 이상으로 시험한다. 세포생존율을 계산하는 기준은 각 시험의 음성대조군으로 한다. 최종 세포생존율은 보정 전 세포생존율에서 본 시험에서 얻은 세포생존율(%NSMTT)을 감해준다. 단, 염색비율이 5% 미만인 경우 보정이 필요 없고, 30% 이상인 경우는 본 시험과 양립할 수 없지만 세포생존율이 50% 이하인 경우에는 자극물질로 판정한다.

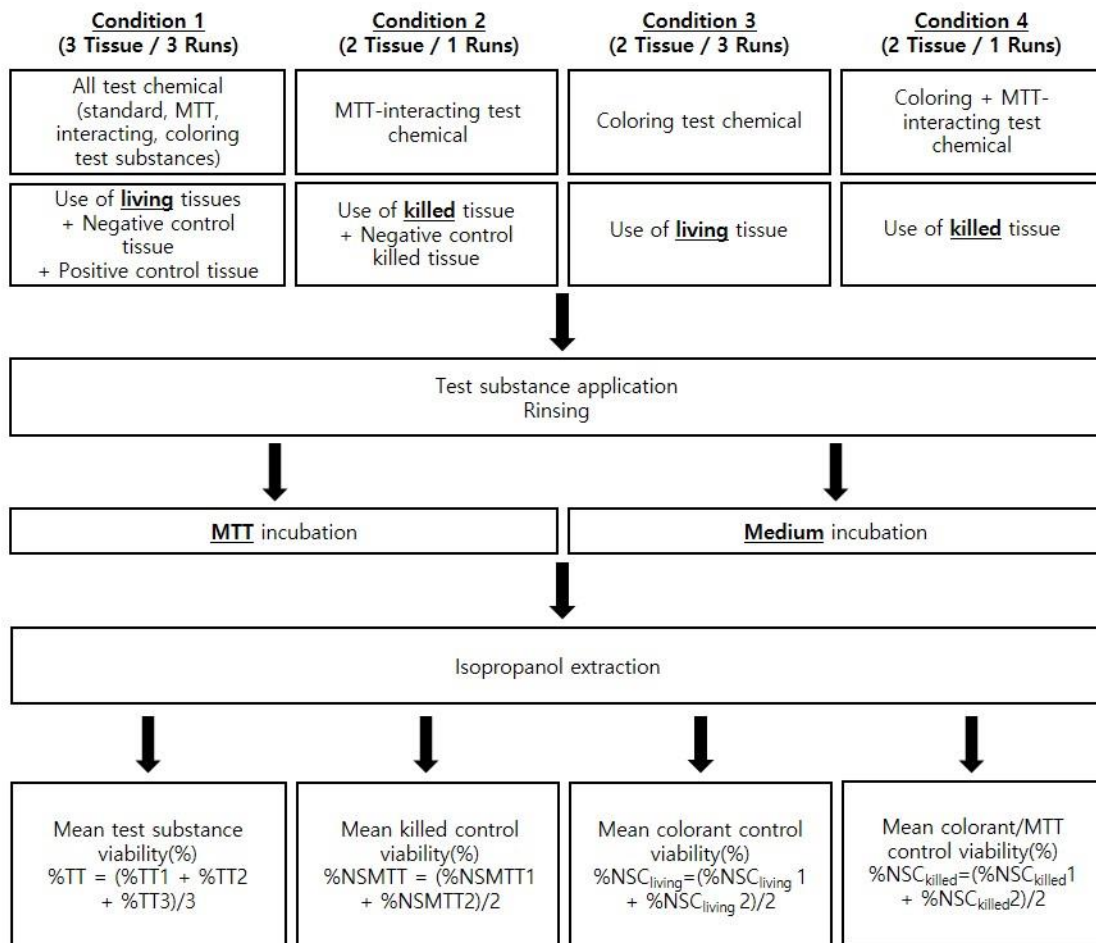
$$\%최종세포생존율 = \%TT - \%NSMTT$$

3) 시험물질이 발색성과 반응성을 동시에 갖는 경우

이 경우에는 4.3.3 1)과 2)에 따라 두 단계의 보정 과정을 거치면 되지만 시험물질이 살아 있는 조직과 동결 사멸조직 모두에서 흡수될 수 있으므로 발색성에 대한 부분이 이중으로 보정 될 수 있다. 따라서 동결 사멸된 조직으로 자극시험을 동일하게 진행하되 MTT assay 단계에서 MTT를 넣지 않은 phenol red free-DMEM만 넣고 3시간 동안 배양한다. 동결 사멸된 조직의 제조 방법은 4.3.3 2)를 참조하며 한 시험물질당 한번만 최소 duplicate 이상으로 시험한다. 세포 생존율을 계산하는 기준은 각 시험의 음성대조군으로 한다. 최종 세포생존율은 보정 전 세포생존율에서 %NSC<sub>living</sub> 와 %NSMTT를 감해주고 본 시험에서 얻은 세포생존율(%NSC<sub>killed</sub>)을 더해준다.

$$\%최종세포생존율 = \%TT - \%NSC_{living} - \%NSMTT + \%NSC_{killed}$$

Summary of adapted controls depending of test chemical physical properties (when OD method is chosen)



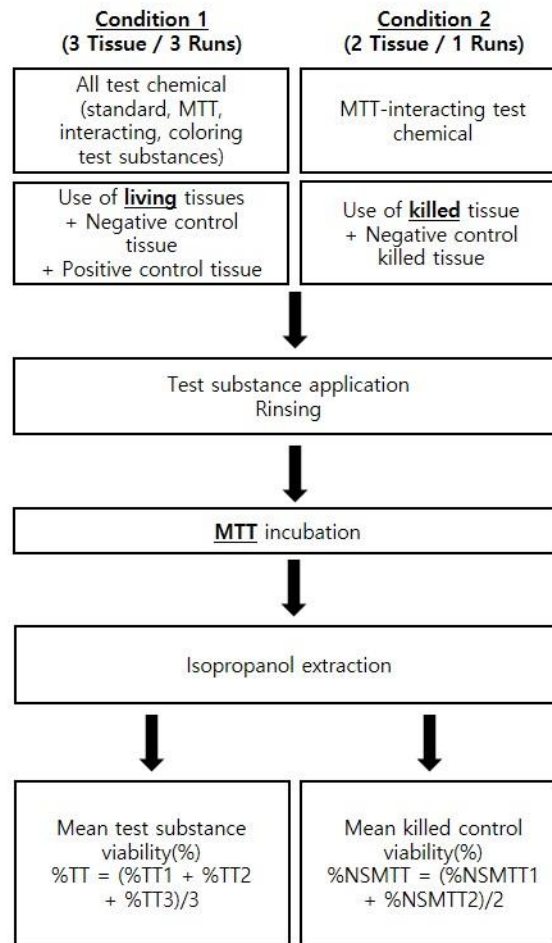
Case by case test conditions for OD reading

	MTT interaction	Coloration interference	Conditions	Corrected Viability
Case 1	-	-	1	%TT
Case 2	-	+	1+2	%TT- %NSC <sub>living</sub>
Case 3	+	-	1+3	%TT- %NSMTT
Case 4	+	+	1+2+3+4	%TT- %NSC <sub>living</sub> - %NSMTT + %NSC <sub>killed</sub>

[Fig 3. 색간섭 결과에 따른 세포생존을 측정-OD]



**Summary of adapted controls depending of test chemical physical properties (When HPLC/UPLC-spectrophotometry method is chosen)**



**Case by case test conditions for HPLC/UPLC-spectrophotometry endpoint**

	MTT interaction	Coloration interference	Conditions	Corrected Viability
Case 1	-	-	1	%TT
Case 2	+	-	1+2	%TT- %NSMTT

[Fig 4. 색간섭 결과에 따른 세포생존을 측정-HPLC/UPLC]

#### 4.4 KeraSkin™ 수령

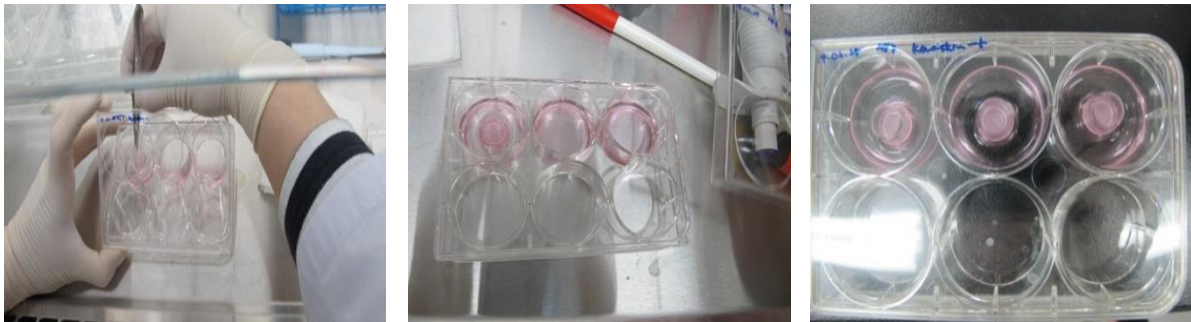
KeraSkin™을 수령 후 같이 첨부된 구성품 (KeraSkin™, 배양액 50 ml)를 확인한다. 배양액은 37 °C가 유지된 water bath안에 넣어 따뜻하게 30분간 유지시킨다. 그 사이 피부모델의 상태를 확인하면서 해당 서식지에 체크한다. (조직의 표면에 수분이 없는지, agarose gel의 형태가 유지되는지, 조직 아래에 공기방울이 있지 않은지 등의 여부 체크) 조직 상태를 확인 한 다음 전 배양 과정을 준비한다[Fig 5].



[Fig 5. KeraSkin™ 배송시스템]

#### 4.5 전 배양

Water bath안에서 따뜻하게 유지시킨 배양액을 6 well plate에 well당 0.9 ml을 넣는다. 그 후 인체피부모델을 각 well마다 공기방울이 생기지 않도록 plate를 기울이면서 조심스럽게 옮긴다. 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 약 22±2시간 동안 안정화시킨다[Fig 6].



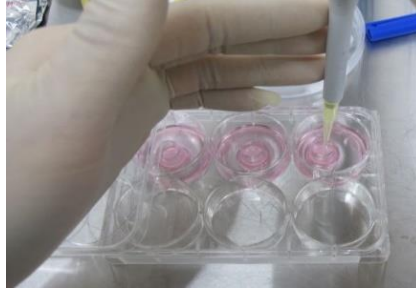
[Fig 6. 전배양]

#### 4.6 시험물질의 적용

전배양을 통해 안정화시킨 조직은 물질 적용 직전에 꺼내어 사용한다. 시험물질별로 6 well plate를 다르게 사용한다. 시험물질은 성상에 따라 액체와 고체의 적용방법을 다르게 한다. 시험물질을 적용하는 시간 간격은 시험자에 따라 조절이 가능하지만 액체는 30초, 고체는 1분 간격으로 적용하는 것을 추천한다. 2개의 시험물질을 하나의 그룹으로 설정하여 한번에 6well 까지만 사용한다.

액체

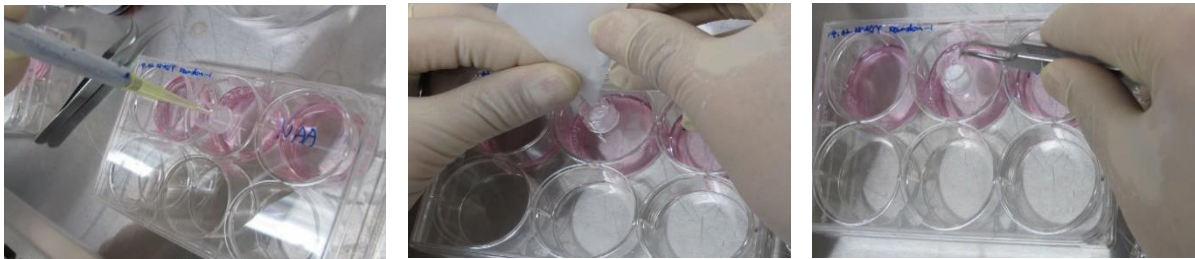
액체물질 40  $\mu\ell$ 를 조직 안쪽 중앙에 천천히 떨어뜨린 후 포셉으로 insert를 잡고 돌려주어 골고루 적용되도록 한다[Fig 7].



[Fig 7. 액체물질의 적용]

고체

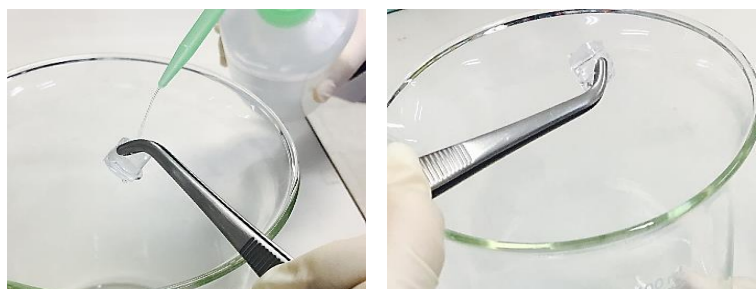
고체를 적용할 때에는 배지 내에 시험물질이 떨어지지 않도록 조직을 6 well plate 뚜껑 위로 옮겨 적용한다. 먼저 DPBS 40  $\mu\ell$ 로 인체피부모델표면을 골고루 적신 다음, 고체물질 40 mg을 중앙에 적용하고 포셉으로 insert를 잡고 살짝 흔들어 주어 물질이 고루 퍼질 수 있도록 한다 [Fig 8]. 시험물질이 적용된 후 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 30±1분간 적용한다



[Fig 8. DPBS로 모델의 표면을 촉촉하게 적용시킨 후 고체물질 적용]

**4.7 세척**

1) 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 시험물질을 적용한 조직을 꺼내어, poly wash bottle을 이용하여 insert 내 side well로 DPBS를 분사하며 DPBS가 insert에 가득 차면 insert를 뒤집어서 비커에 한번에 떨어낸다. 이때 insert를 집은 포셉으로 비커를 내려치면 조직에 물리적 자극이 가해질 수 있으므로 유의한다[Fig 9].



[Fig 9. 세척]

- 2) 1)과정을 9번 반복하여 총 10회 세척한다. 단, 세척 5회 후 조직을 살펴봤을 때 물질이 다량 잔류하는 경우(예를 들어, 오일 또는 점도가 높은 액체물질, 세척액과 반응하여 겔화가 일어나는 고체물질 등)에 한하여 면봉으로 물질을 닦아 낸 후 나머지 세척을 수행한다.
- 3) 세척 후, 멸균된 거즈를 이용하여 insert 밖의 DPBS를 제거한다. 단, insert내 잔여물질은 제거하지 않는다[Fig 10].



[Fig 10. Insert 외부의 DPBS 제거]

#### 4.8 후 배양

물질 적용 전에 미리 0.9 mL의 배양액을 분주한 6 well plate를 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 가온한다.

세척된 조직은 미리 준비한 후배양 plate에 옮겨 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 42±2시간 동안 후배양한다[Fig 11].



[Fig 11. 후 배양 과정]

#### 4.9 MTT assay

- 1) Post-incubation 후 200 μL 피펫을 이용하여 insert 내·외부의 배지를 제거한다[Fig 12].



[Fig 12. MTT 적용 전 insert 내·외부의 배양액 제거]

- 2) 미리 준비된 0.4 mg/ml MTT 용액을 새로운 24 well plate에 well당 200  $\mu$ l씩 넣고 조직을 옮긴 후, MTT 용액 100  $\mu$ l를 insert 내부에 처리한다[Fig 13].



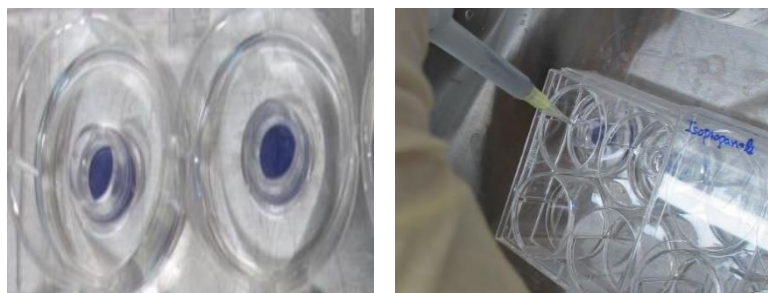
[Fig 13. MTT 적용]

- 3) MTT를 적용한 24 well plate는 차광상태로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간±5분 동안 배양한다.
- 4) MTT 적용이 끝나면 200  $\mu$ l 피펫을 이용하여 insert 내·외부의 MTT 등 이물질을 제거한다 [Fig 14].



[Fig 14. MTT적용 후 insert 내·외부의 MTT 제거]

- 5) Isopropanol을 1.9 ml/well씩 넣어 놓은 새로운 6 well plate에 조직을 옮긴 후, isopropanol 100  $\mu$ l씩을 insert 내부에 처리한다[Fig 15].



[Fig 15. Isopropanol 적용]

6) Isopropanol을 적용한 6 well plate는 알루미늄 호일로 차광하고 지퍼백에 넣어 120rpm에서 3시간±5분 동안 진탕하여 formazan을 추출한다[Fig 16].



[Fig 16. Formazan 추출]

#### 4.10 흡광도 측정

Formazan 추출 후 insert 내부의 추출액을 외부의 추출액과 합하고, 조직을 제거한 후, 각 well의 formazan 결정체가 보이지 않을 정도로 충분히 피펫팅하여 섞어준다. Well 당 250  $\mu$ l를 96 well plate로 1개 well씩 옮겨준 다음, 96 well plate 분광광도계(파장 570 nm)를 이용하여 흡광도(Optical Density, OD)를 측정한다. 최종 값은 3개 well의 평균 값을 사용한다[Fig 17].



[Fig 17. 흡광도 측정 준비]

96 well plate 분광광도계로 측정된 OD 값은 시험기초자료로서 출력하여 보관한다. 흡광도 측정을 위한 96 well plate에 배치순서는 아래와 같다[Table 3].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blank	Blank	Blank	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	
B	NC1	PC1	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	Tissue 1
C	NC2	PC2	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	Tissue 2
D	NC3	PC3	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	Tissue 3
E	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	
F	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	
G	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	
H	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	

- 1) Blank: Isopropanol solution is used as blank (triplicate)
- 2) NC, Negative Control: Formazan extract solution of DPBS-treated tissues (triplicate/NC)
- 3) PC, Positive Control: Formazan extract solution of 5% SDS-treated tissues (triplicate/PC)
- 4) T, Test substance: Formazan extract solution of each test substance-treated tissues (triplicate/Test substance)

[Table 3. 96 well plate sample 배치]

## 5. 결과 (Results)

### 5.1 세포생존율

세포생존율은 음성대조물질 DPBS의 OD 값을 기준으로 각 시험물질의 OD 값으로 산출한다.

- 1) Blanks( $OD_{blank}$ ): 각 plate의 3개  $OD_{blank}$ 의 평균값을 산출한다.
- 2) 음성대조물질( $OD_{NC}$ ): 각 plate의 3개 음성대조물질 OD 값( $OD_{NCraw}$ )에서  $OD_{blank}$ 를 뺀 값들의 평균값을 산출한다( $OD_{NC}$ ). 산출식은 'Mean  $OD_{NC} = \text{Mean of } (OD_{NCraw} - OD_{blank})$ '이다. 음성대조물질의 세포생존율은 100%가 된다.
- 3) 양성대조물질( $OD_{PC}$ ): 각 plate의 3개 양성대조물질 OD 값( $OD_{PCraw}$ )에서  $OD_{blank}$ 를 뺀 값들의 평균값을 산출한다( $OD_{PC}$ ). 산출식은, ' $OD_{PC} = OD_{PCraw} - OD_{blank}$ '이다. 양성대조물질 3개 조직의  $OD_{PC}$  평균값을 평균  $OD_{NC}$  값으로 나눠 세포생존율을 구한다. 산출식은, 'Cell viability(%) of Positive control =  $(\text{Mean } OD_{PC} / \text{Mean } OD_{NC}) \times 100$ '이다.
- 4) 시험물질( $OD_T$ ): 각 시험물질 OD 값( $OD_{Traw}$ )에서  $OD_{blank}$ 를 뺀 값들의 평균값을 산출한다 ( $OD_T$ ). 산출식은 ' $OD_T = OD_{Traw} - OD_{blank}$ '이다. 시험물질 3개 조직의  $OD_T$  평균값을 평균  $OD_{NC}$  값으로 나눠 세포생존율을 구한다. 산출식은, 'Cell viability(%) of Test substance =  $(\text{Mean } OD_T / \text{Mean } OD_{NC}) \times 100$ '이다.

## 5.2 피부자극의 판정기준

음성대조물질의 세포생존율을 100%으로 하고, 세포생존율이 50% 초과인 경우는 비자극물질로, 50% 이하인 경우는 자극물질로 판정한다[Table 4].

Prediction model	Classification
Mean tissue viability is $\leq$ 50%	Irritant (I)
Mean tissue viability is $>$ 50%	Non-Irritant (NI)

[Table 4. 피부자극 판정기준]

## 5.3 재시험 기준

- 1) 음성대조물질의 흡광도 값이 0.7 미만이거나 1.6 초과일 경우
- 2) 양성대조물질의 세포생존률 값이 40% 초과일 경우
- 3) 음성대조물질, 양성대조물질, 시험물질 처리 조직 3개의 표준편차 값이 18%를 초과할 경우
- 4) 세포생존율 평균값이 45% 이상 55% 미만일 경우 (borderline chemical)