


Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	1 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션


인체각막유사상피모델(MCTT HCE™)을 이용한 안자극시험법

In vitro eye irritation test with a reconstructed human
cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™

Ver 1.8

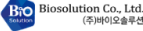


Biosolution Co., Ltd.
(주)바이오솔루션

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	2 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. <small>(주)바이오솔루션</small>

목차

용어정의	3
1. 서론	4
2. 목적	4
3. 재료	4
3.1 시험모델 : MCTT HCE™	4
3.2 품질관리기준	5
3.3 시험물질 및 용매	5
3.4 시험도구 및 장비	5
4. 방법	7
4.1 시험디자인 요약	7
4.2 시험물질 및 시약 준비	8
4.3 시험물질의 발색성 및 WST-1 반응성 확인	8
4.4 MCTT HCE™ 수령	12
4.5 전배양	12
4.6 시험물질의 처리	12
4.7 세척	14
4.8 후배양	16
4.9 WST-1 assay	17
4.10 흡광도 측정	18
5. 결과	19
5.1 조직생존율 계산	19
5.2 시험타당성기준	19
5.3 판정기준	20
6. 참고문헌	20
7. Annex	21
SOP 제/개정 기록서	28

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	3 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

용어정의

RhCE : Reconstructed human Cornea-like Epithelium, 인체 각막과 생화학적 및 생리학적 특성과 매우 유사한 인체각막유사상피모델

EIT : Eye Irritation Test, 안자극시험법

UN GHS : United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN 의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템

UN GHS Category 1 : 심한 안손상, 단일물질 또는 혼합물에 눈이 노출된 후 21 일 이내에 완전히 회복되지 않는 안 조직 손상 또는 시력의 심각한 손상

UN GHS Category 2 : 안자극, 단일물질 또는 혼합물에 눈이 노출된 후 21 일 그리고 7 일 내 완전히 회복할 수 있는 손상

UN GHS No Category : UN GHS Category 1 또는 2 (2A 또는 2B)로 분류되지 않은 화학물질로 '미분류(Not Classified)'와 바꾸어 사용

RT : Room temperature, 상온

ET-50 : Effective Time-50, 세포생존율이 50%로 감소하는데 걸리는 시간

OD : Optical Density, 흡광도

NC : Negative Control, 음성대조군

PC : Positive Control, 양성대조군

T : Test substance, 시험물질 처리군

OD_{blank} : 각 well 에서 WST-1 용액의 OD 값

OD_{NCraw} : 각 음성대조군 OD값

OD_{PCraw} : 각 양성대조군 OD값

OD_{Traw} : 각 시험물질 처리군 OD값

OD_{NC} : 각 음성대조군의 보정된 OD 값($OD_{NCraw} - \text{Mean } OD_{blank}$)

OD_{PC} : 각 양성대조군의 보정된 OD 값($OD_{PCraw} - \text{Mean } OD_{blank}$)

OD_T : 각 시험물질 처리군의 보정된 OD 값($OD_{Traw} - \text{Mean } OD_{blank}$)

Mean %NC : 음성대조군의 최종 조직생존율

Mean %PC : 양성대조군의 최종 조직생존율

Mean %T : 시험물질 처리군의 최종 조직생존율


DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca^{2+} and Mg^{2+}

WST-1 : 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, 조직생존율 측정 시약

%NSC_{living} : Non-Specific colour in living tissues (%), 생존하는 조직에서의 비특이적 색상(%)

%NSC_{killed} : Non-Specific colour in killed tissues (%), 죽은 조직에서의 비특이적 색상(%)

%NSWST-1 : Non-Specific WST-1 reduction (%), 비특이적 WST-1 환원(%)

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	4 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

1. 서론

「인체각막유사상피모델을 이용한 안자극 또는 심한 안손상으로 분류되지 않는 물질 판별법」은 인체각막유사상피모델(Reconstructed human Cornea-like Epithelium, RhCE)에 시험물질을 노출시켜 얻어진 조직생존율을 근거로 하여 '안자극 또는 심한 안손상으로 분류되지 않는 물질(UN GHS No Category)'을 판별하기 위한 시험방법이다.

시험법 명은 「인체각막유사상피모델(MCTT HCE™)을 이용한 안자극시험법(MCTT HCE™ EIT)」으로 줄여서 사용한다.

2. 목적

본 시험법은 「인체각막유사상피모델(MCTT HCE™)을 이용한 안자극시험법(MCTT HCE™ EIT)」을 수행하여 '안자극 또는 심한 안손상으로 분류되지 않는 물질(UN GHS No Category)'을 판별하기 위함이다.

3. 재료

3.1 시험모델 : MCTT HCE™

MCTT HCE™는 사람의 각막상피세포를 이용하여 각막의 상피를 재현한 인체각막유사상피 모델로서, 기저층(basal cell), 날개세포층(wing cell), 표면편평상피세포층(squamous cell)으로 구성된 다층의 각막 상피 모델이다. MCTT HCE™는 「인체각막유사상피모델을 이용한 안자극 또는 심한 안손상으로 분류되지 않는 물질 판별법」(OECD TG 492)에 등재된 모델로서 '안자극 또는 심한 안손상으로 분류되지 않는 물질'의 판별에 대한 신뢰성이 입증된 모델이다.

MCTT HCE™는 배양된 각막상피세포를 외경 12 mm(0.67 cm²) Millicell®(Millipore, USA)에 배양하여 제작되어 공급된다.

제조사: Biosolution Co., Ltd.

Tel : (+82)-2-3446-8884

Fax : (+82)-2-3445-1390

Homepage : http://www.keraskin.co.kr/product/mucosal_model.asp

3.2 품질관리기준

MCTT HCE™는, 각 Lot의 품질보증 지표로서 세포생존율의 OD값, ET-50, Histology를 이용하여 사후 품질관리를 진행하며, QC Certificate of Analysis는 제조사에서 제공한다 (Table 1).

Table 1. 품질관리기준

기준	품질관리 인정 하한값	품질관리 인정 상한값
Viability (OD ₅₇₀)	0.8	1.2
ET-50 (min)	17.6	41.0

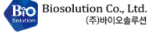
3.3 시험물질 및 용매

본 시험의 시험물질은 물질 자체를 사용하는 것을 원칙으로 한다. 희석이 부득이한 경우 적절한 용매(예: DPBS 등)를 사용하되 그 과학적 근거를 제시하도록 한다.

3.4 시험도구 및 장비

Table 2. 시험과정별 도구 및 장비

시험과정	장비와 시약명	제조사/공급업체	사용목적
공통	micropipette and tip		시험과정 전체 사용
	Water bath at 37°C		Assay medium, DPBS 가온
	Pipette aid and serological pipette		세척
	Forceps		모델 취급
	Sterile gauzes		외부 잔여 물질 제거
	General laboratory materials (latex gloves, paper towel, 70% EtOH etc.)		-
배양	Laminar flow cabinet		무균상태 시험
	CO ₂ incubator		조직 배양(37°C, 5% CO ₂)
	6 well plate		조직 배양
	Assay medium	Biosolution	조직 배양

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	6 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

물질처리 및 세척	DPBS without Ca ²⁺ and Mg ²⁺		음성대조물질, 세척 용액
	Methyl acetate [CAS No. 79-20-9]	Sigma	양성대조물질
	Balance		고체물질 무게측정
	6 well plate		조직배양
	Stop-watches/Timers		시험물질 처리 및 세척
	500 mL beaker		세척
	50 mL beaker		고체 세척
	12 well plate		세척
	Cotton swab		세척
WST-1 assay	WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) [CAS No. 150849-52-8]	Roche	조직생존율 측정
	DPBS without Ca ²⁺ and Mg ²⁺		WST-1 용액 조제
	24 well plate		WST-1 assay
	96 well plate		흡광도 측정
	Foil		Formazan 추출(차광)
	Centrifuge		Formazan 추출액 원심분리
	ELISA Plate reader (96 well)		흡광도 측정(450 nm)

4. 방법

4.1 시험디자인 요약

MCTT HCE™를 이용한 안자극시험을 수행하는 절차는 아래와 같다 (Fig. 1).

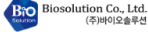
액체

Day 1	Day 2			Day 3
전배양	액체 시험물질 적용	1차 세척	후배양	WST-1 assay
0.9 mL medium 37°C 5% CO ₂ 22 ± 2 hrs	액체 시험물질 40 µL 37°C 5% CO ₂ 10 ± 1 min	DPBS 내부 4 mL over-flowing, 1분 정체	0.9 mL medium 37°C 5% CO ₂ 16 ± 1 hrs	WST-1 용액 300 µL 37°C 5% CO ₂ 3 hrs ± 5 min
		2차 세척		흡광도 측정
		DPBS 내부 10 mL		200 µL/well, 450 nm
		3차 세척		
		DPBS 내부 4 mL over-flowing, 1분 정체 및 shaking		
		4차 세척		
		DPBS 10 mL 내·외부 세척 및 잔여 물질 제거		

고체

Day 1	Day 2			Day 3
전배양	고체 시험물질 적용	1차 세척	후배양	WST-1 assay
0.9 mL medium 37°C 5% CO ₂ 22 ± 2 hrs	DPBS 40 µL + 고체 시험물질 40 mg 3 hrs ± 5 min	DPBS 내부 10 mL	0.9 mL medium 37°C 5% CO ₂ 16 ± 1 hrs	WST-1 용액 300 µL 37°C 5% CO ₂ 3 hrs ± 5 min
		2차 세척		흡광도 측정
		DPBS 내부 10 mL		200 µL/well, 450 nm
		3차 세척		
		DPBS 내·외부 10 mL		
		4차 세척		
		50 mL 비이커에서 5-10회 shaking		
		5차 세척		
		DPBS 내·외부 10 mL 세 척 및 잔여 물질 제거		

Figure 1. 시험디자인

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	8 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

4.2 시험물질 및 시약 준비

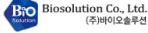
- 모든 시험물질 및 시약은 휘발성 여부, 상온에서 시험물질 성상 등의 차이가 있을 수 있으므로 시험 직전에 준비한다.
- Pipetting 가능한 물질은 액체로 간주하여 사용하고, pipetting 불가능한 물질은 고체로 간주하여 사용한다.
- 성상이 불분명하거나 왁스, 크리스탈 제형 등 칭량이 용이하지 않은 물질의 경우에는 37°C 항온조에 15분 동안 유지시킨 후, 액체 또는 고체 성상분류는 pipetting 가능 여부에 따라 결정된다.
- 액체시험물질은 2 well에 처리할 수 있는 충분한 양인 200 μl 를 갈색 유리병에 분주한다 (Fig. 2).
- 고체시험물질은 40 mg씩 유산지에 칭량하여 물질 당 2개를 준비한다 (Fig. 2). 고체시험물질이 고운 가루 형태가 아닌 경우에는 막자사발을 이용하여 곱게 갈아 칭량한다.
- 칭량 후 사용 전까지 차광상태로 준비한다.
- WST-1 용액은 WST-1을 항온조에서 37°C로 가온 한 DPBS에 1:25로 희석하여 조제한다 (예: WST-1 100 μl 를 DPBS 2400 μl 에 희석함). 조제 후에는 튜브를 호일로 감싸 차광한다 (Fig. 2).



Figure 2. 시험물질 및 시약준비

4.3 시험물질의 발색성 및 WST-1 반응성 확인

시험물질에 따라 발색을 보이거나 WST-1 용액에 반응하는 경우가 있어, 시험물질 처리 전에 이를 확인한다 (Fig. 3).

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	9 / 28
2024.01		 (주)바이오솔루션

4.3.1 시험물질의 발색성 시험

- 1) 1 ml 증류수와 시험물질 40 μ l (액체) 또는 40 mg (고체)을 넣고 60 \pm 1 분 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 반응시킨다.
- 2) 반응시킨 용액을 200 μ l씩 duplicate로 취하여 96 well plate로 옮긴다.
- 3) 450 nm에서 측정한 평균 OD 값이 0.1 초과인 경우 본 시험법의 4.3.3 1) 또는 3)에 따라 살아있는 조직을 이용하여 보정시험을 수행한다.

4.3.2 WST-1 반응성 확인 시험

- 1) DPBS에 1:25로 희석한 1 ml WST-1 용액을 넣고 시험물질 40 μ l (액체) 또는 40 mg (고체)을 넣은 상태로 3 시간 \pm 5 분 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 후에 색 변화가 있는지 육안으로 확인한다.
- 2) WST-1 용액이 노란색으로 변한 경우 시험물질이 WST-1을 환원시킬 수 있으므로, 본 시험법의 4.3.3 2) 또는 3)에 따라 보정시험을 시행한다.


4.3.3 조직생존율의 보정

보정값이 5% 미만인 경우 보정값을 적용하지 않으며, 30% 이상인 경우는 본 시험과 양립할 수 없다고 판단한다. 본시험에서 시험물질이 'No prediction can be made'로 예측될 경우 보정하지 않는다.

1) 시험물질이 발색성만 가진 경우

살아있는 조직으로 본 시험법의 4.5~4.10에 따라 시험을 동일하게 진행하되, WST-1 용액 처리 단계에서 WST-1이 없는 DPBS를 사용한다. 살아있는 조직을 사용하는 것이므로 매 시험마다 duplicate로 실시해야 한다. %NSC_{living}은 본 시험의 음성대조군을 기준으로 계산한다. 최종 조직생존율은 보정 전 조직생존율(%Tissue viability)에서 %NSC_{living}을 감해준다.

$$\text{최종 조직생존율(\%)} = \% \text{ Tissue viability} - \% \text{NSC}_{\text{living}}$$

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	10 / 28
2024.01		 (주)바이오솔루션

2) 시험물질이 발색성은 없지만 WST-1을 직접 환원시키는 경우

동결사멸 조직으로 본 시험법의 4.6~4.10에 따라 시험을 동일하게 진행한다. 동결사멸 조직은 세포의 대사 능력만 상실되고 흡수나 시험물질과의 결합능력은 유지되어 있는 상태이다. 냉동 보관 되어있는 동결사멸 조직을 새로운 assay medium이 담겨 있는 6 well plate 에 옮겨와 약 10 분 동안 실온에서 안정화한 후에 시험물질을 처리한다. 동결사멸 조직을 사용하므로 각 시험물질에 대해 duplicate로 단회 수행한다. %NSWST-1은 본 시험의 음성대조군을 기준으로 계산한다. 최종 조직생존율은 보정 전 조직생존율(%Tissue viability)에서 %NSWST-1을 감해준다.

$$\text{최종 조직생존율(\%)} = \% \text{ Tissue viability} - \% \text{NSWST-1}$$

3) 시험물질이 발색성과 WST-1 환원성을 동시에 갖는 경우

이 경우에는 4.3.3 1)과 2)에 따라 두 단계의 보정 과정을 거치면 되지만 시험물질이 살아 있는 조직과 동결사멸 조직 모두에서 흡수될 수 있으므로 발색성에 대한 부분이 이중으로 보정될 수 있다. 동결사멸 조직을 사용하여 본 시험법의 4.6~4.10에 따라 시험을 동일하게 진행하되, WST-1 용액 처리 단계에서 WST-1이 없는 DPBS를 사용한다. 동결사멸 조직을 사용하므로 각 시험물질에 대해 duplicate로 단회 수행한다. 동결사멸 조직을 사용하므로 각 시험물질에 대해 duplicate로 단회 수행한다. %NSC_{killed}는 본 시험의 음성대조군을 기준으로 계산한다. 최종 조직생존율은 보정 전 조직생존율(%Tissue viability)에서 %NSC_{living}와 %NSWST-1를 감해주고 %NSC_{killed}을 더해준다.

$$\text{최종 조직생존율(\%)} = \% \text{ Tissue viability} - \% \text{NSC}_{\text{living}} - \% \text{NSWST-1} + \% \text{NSC}_{\text{killed}}$$

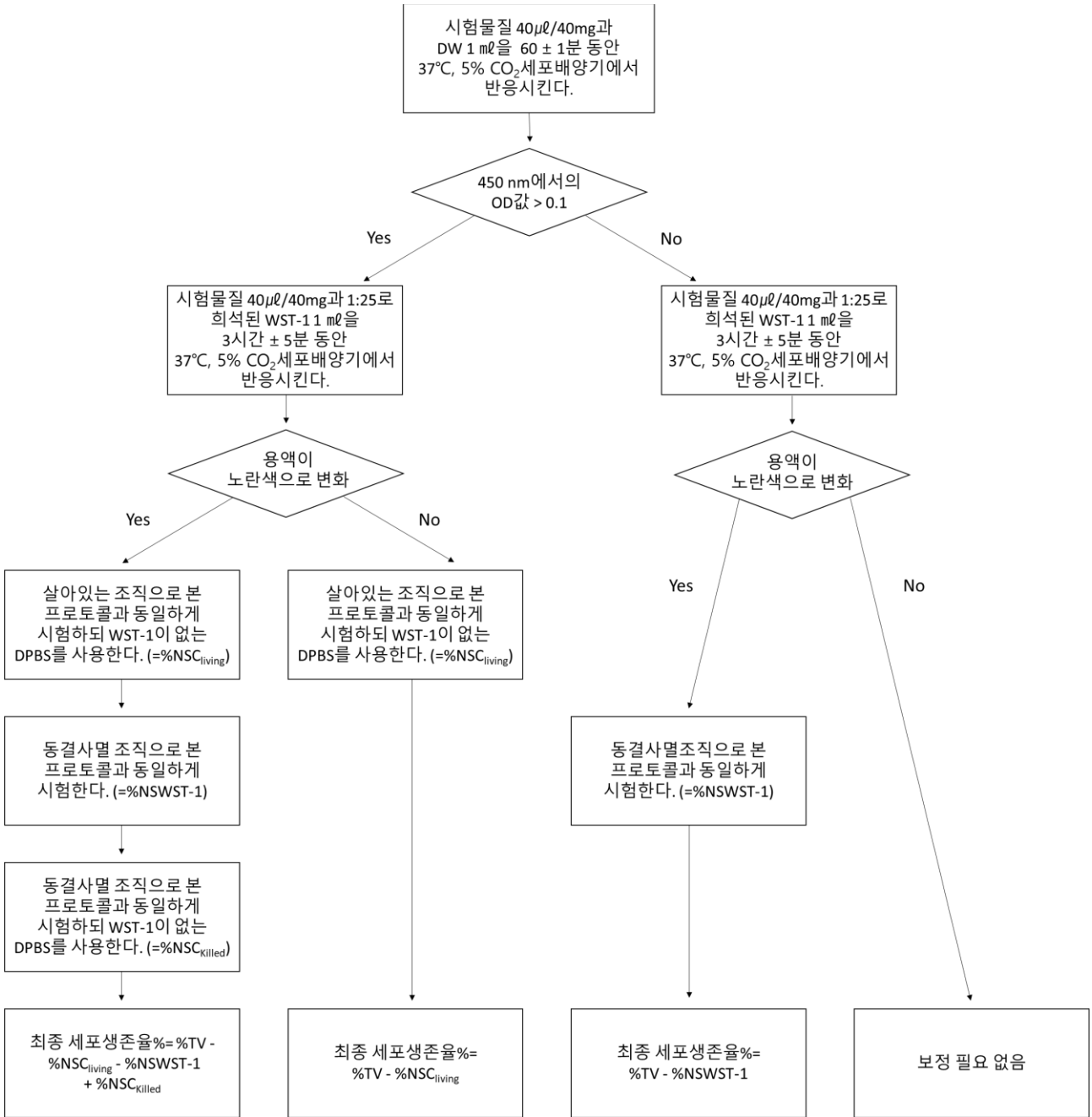
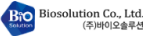


Figure 3. 시험물질 색간섭 흐름도

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	12 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

4.4 MCTT HCE™ 수령

- 수령 후 조직 및 assay medium 상태를 확인한다. 이때 조직의 표면이 편평한지, 수분이 없는지, 조직 아래에 공기방울이 없는지, agarose gel의 형태가 유지되는지 등의 여부를 확인한다.
- Assay medium을 항온조에서 37 °C로 가온 한 후 사용한다.
- 동결조직 수령 후 상태를 확인하고 냉동 조건에서 보관한다.

4.5 전배양

- 1) 항온조 안에서 가온 한 assay medium을 micropipette을 이용하여 6 well plate에 well 당 0.9 mL을 넣는다.
- 2) 멸균된 거즈를 이용하여 조직 외부에 묻은 agarose gel을 제거 후, 공기방울이 생기지 않도록 조직을 기울이면서 각 well에 조심스럽게 옮긴다 (Fig. 4).
- 3) 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 22 ± 2 시간 동안 배양한다.

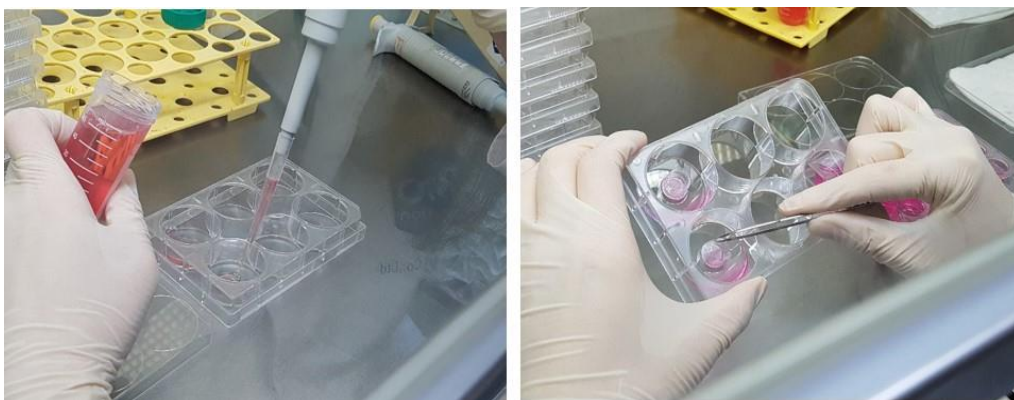
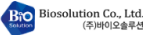


Figure 4. 전배양 과정

4.6 시험물질의 처리

- 조직은 시험물질 처리 직전에 꺼내어 사용한다.
- 시험물질은 성상에 따라 액체와 고체의 처리방법을 달리한다.
- 시험물질을 처리하는 시간 간격은 시험자에 따라 조절이 가능하지만 액체는 30 초, 고체는 1분 간격으로 처리하는 것을 권장한다.
- 시험물질 별로 plate를 구분하며, 각 시험물질 당 2 well씩 처리한다.
- 한 번에 3개의 시험물질을 하나의 그룹으로 설정하여 6 well 단위로 시험물질을 처리한다.

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	13 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

4.6.1. 액체

- 4) 시험물질 40 μ l를 micropipette으로 취하여 조직의 안쪽 중앙에 천천히 떨어뜨린 후 조직을 잡고 돌려주어 전체 표면에 골고루 처리되도록 한다 (Fig. 5).
- 5) 6 well 단위로 시험물질 처리가 끝나면 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에 넣고, 시간은 시험물질 처리 시작을 기준으로 10 ± 1 분 동안 처리한다.

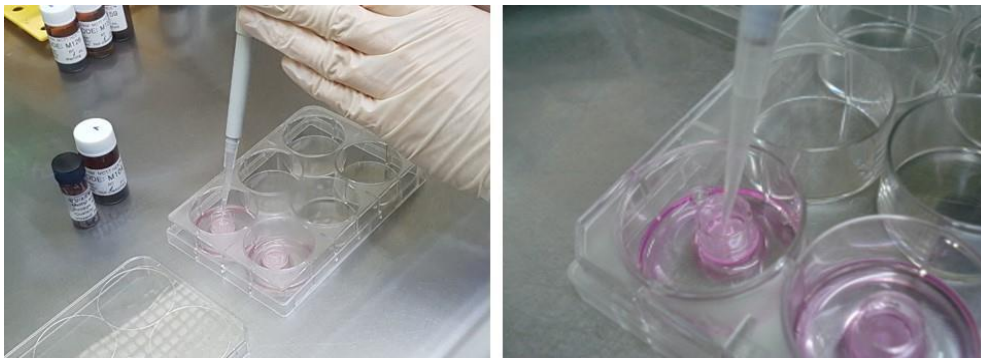


Figure 5. 액체 시험물질 처리

4.6.2. 고체

- 1) 조직을 6 well plate cover에 올려놓고 처리한다 (Fig. 6).
- 2) Micropipette을 이용하여 DPBS 40 μ l로 조직 표면을 골고루 적신 다음, 시험물질 40 mg을 중앙에 떨어뜨려 넣고 조직을 잡고 살짝 흔들어 주어 시험물질이 전체 표면에 골고루 퍼질 수 있도록 한다.
- 3) 6 well 단위로 시험물질 처리가 끝나면 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에 넣고, 시간은 시험물질 처리 시작을 기준으로 3 시간 ± 5 분 동안 처리한다.

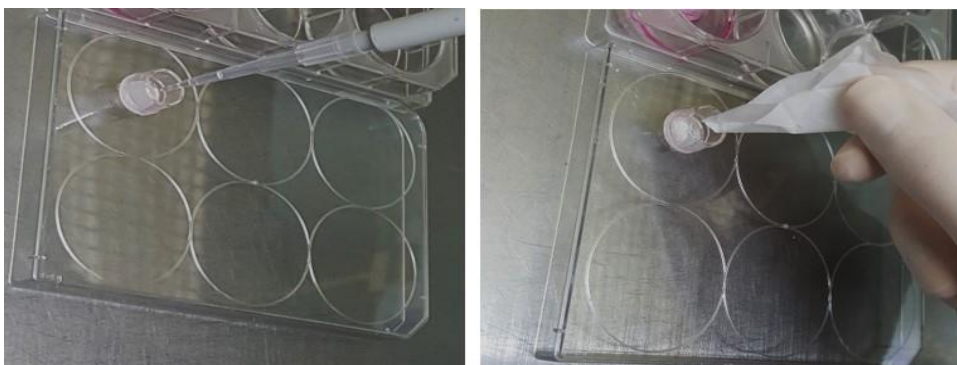
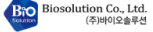


Figure 6. 고체 시험물질 처리

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	14 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

4.7 세척

- 시험물질의 성상에 따라 세척방법을 달리한다.
- 세척은 20 분 내에 마쳐야 한다 (6 well 단위 기준).
- 세척용 DPBS는 37°C 항온조에서 가온 한 후 사용한다.
- 세척 시 well간 DPBS 세척 간격은 물질 처리 간격과 동일하게 적용한다.
- 세척 시 조직과 serological pipette간의 간격은 2~3 cm 전후로 조직을 기울여 벽면을 향해 DPBS를 분사하고, 세척할 때 DPBS를 중간에 떨어내지 않고 마지막에 한 번에 떨어낸다.
- 본 시험에서의 DPBS를 이용한 세척은 1 ml/sec의 속도를 유지하도록 한다.

4.7.1. 액체

- 1) 각 well 당 pipette aid를 이용하여 조직 내부에 DPBS를 4 ml씩 넣고, 조직 내부의 물질이 밖으로 넘치도록 over-flowing 한 후 약 1 분 동안 정체한다. 포셉으로 조직을 잡고 뒤집어서 조직 내부의 물질을 떨어낸다 (Fig. 7).
- 2) Pipette aid로 DPBS 10 ml을 취하고 포셉으로 조직을 들어 조직 내부에 DPBS를 처리하여 세척한다 (Fig. 7).
- 3) 12 well plate에 6개 조직을 각 well에 넣어 순서대로 10 초 간격으로 조직 내부에 DPBS 4 ml을 overflowing 하여 약 1 분 동안 정체한 후, well 안에서 5회 shaking하고 잔여 물질을 제거하여 조직을 12 well plate cover 위에 올려둔다 (Fig. 7).

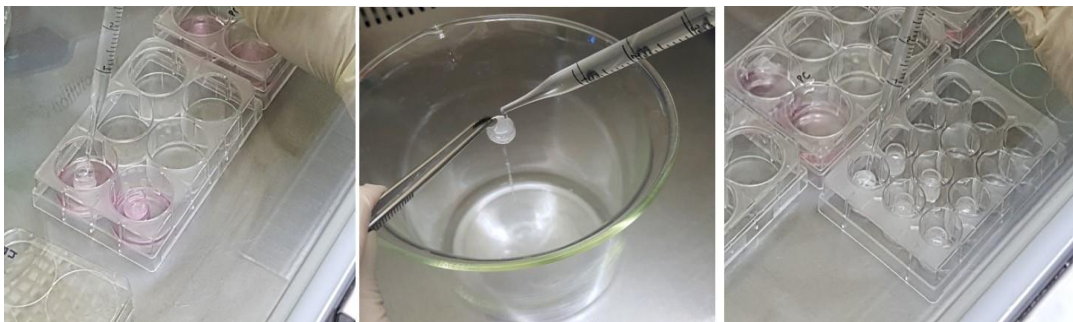
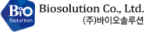


Figure 7. 액체 시험물질 세척과정 (1~3차)

- 4) 포셉으로 조직을 잡고 pipette aid로 DPBS 10 ml을 취한다. 조직의 내·외부가 번갈아 가며 노출되도록 조직을 앞뒤로 돌려주면서 DPBS를 처리하고, 내·외부의 잔여 물질이 모두 제거되도록 세척한다 (Fig. 8).

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	15 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

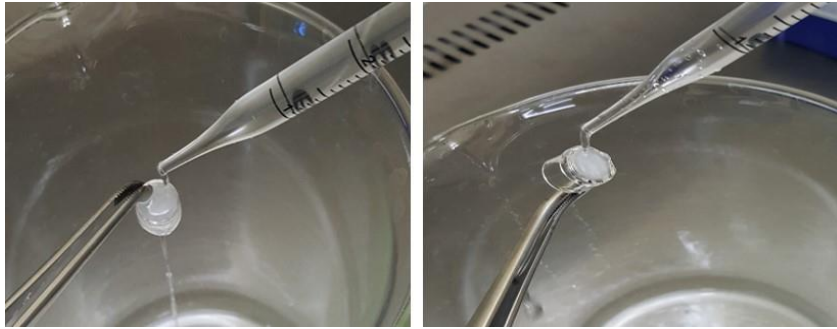


Figure 8. 액체 시험물질 세척과정 (4차)

- 5) 조직을 포셉으로 잡고 micropipette으로 내부의 DPBS를 제거하고, 멸균된 거즈에 잔여 물질을 흡수시켜 외부의 DPBS를 제거한다 (Fig. 9).

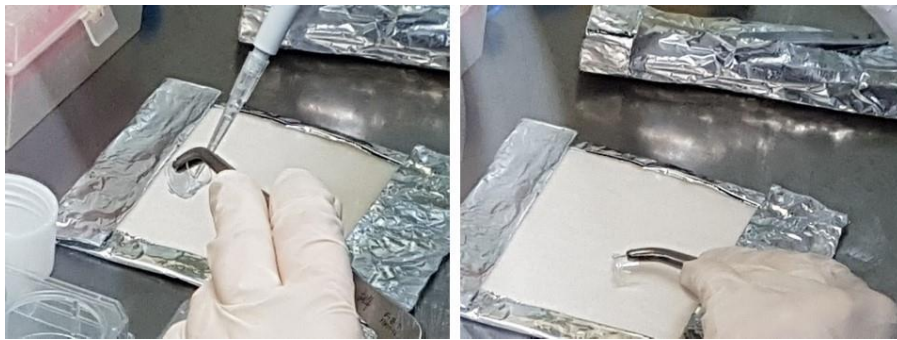


Figure 9. 잔여 물질 제거

4.7.2. 고체

- 1) Pipette aid로 DPBS 10 ml을 취한다. 포셉으로 조직을 들어 내부에 DPBS를 처리하고 내부의 물질이 제거되도록 세척한다 (Fig. 10).

* 이 과정에서 고체 물질이 다량 잔류하는 경우 멸균된 면봉으로 고체 물질만 살짝 닦아내되, 각막 표면에 손상을 줄 정도로 힘주어 긁어내지 않는다 (Fig. 10).

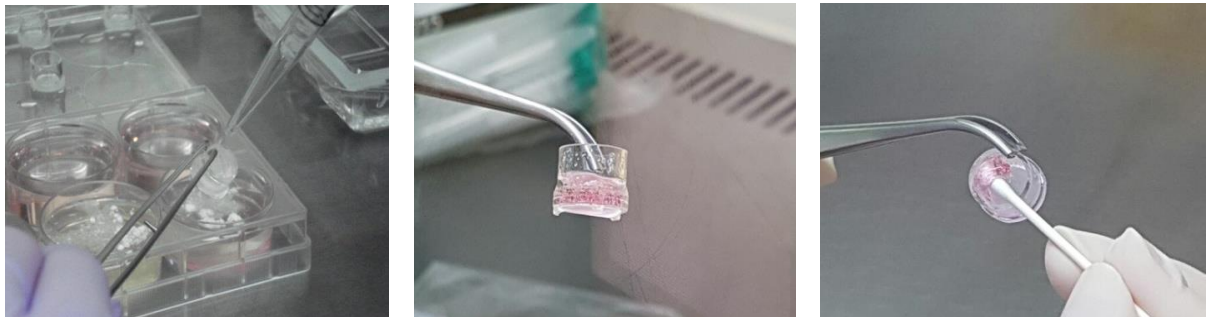
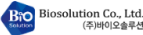


Figure 10. 고체 1차 세척과정

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	16 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

- 2) 조직 내부에 DPBS 10 mL를 처리하고 내부의 물질이 제거되도록 1회 더 세척한다.
 - 3) 포셉으로 조직을 잡고 pipette aid로 DPBS 10 mL를 취한다. 조직의 내·외부가 번갈아가며 노출되도록 조직을 앞뒤로 돌려주면서 DPBS를 처리하고, 내·외부의 잔여 물질이 모두 제거되도록 세척한다 (Fig. 8).
 - 4) 포셉으로 조직을 잡고 DPBS 30 mL이 들어있는 50 mL 비이커에 넣어 5회 shaking하여 잔여 물질을 제거한다. 매회 DPBS에서 조직을 shaking하고 뒤집어서 내부의 액체를 버리는 과정을 반복한다 (Fig. 11).
- * 육안으로 확인하여 고체가 남아있는 경우에는 이 단계에서 충분히 세척하되, 10회까지 세척해도 제거되지 않는다면 조직의 손상을 방지하기 위해 더 이상의 세척은 하지 않는다.
- * 비이커는 시험물질 별로 구별하여 사용한다.

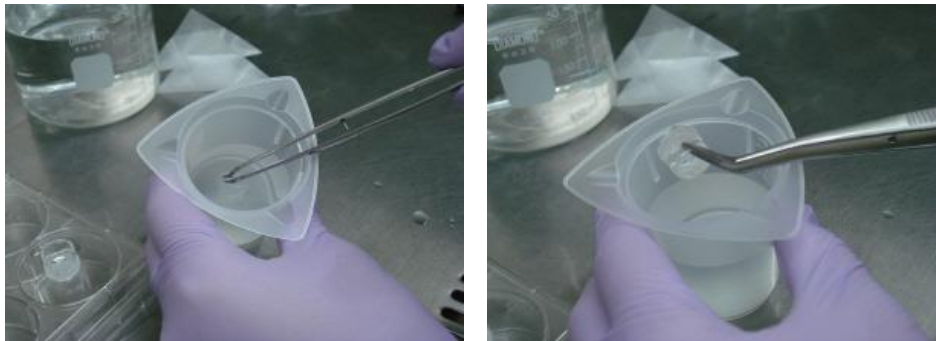


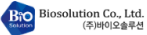
Figure 11. 고체 4차 세척과정

- 5) 포셉으로 조직을 잡고 pipette aid로 DPBS 10 mL를 취한다. 조직의 내·외부가 번갈아가며 노출되도록 조직을 앞뒤로 돌려주면서 DPBS를 처리하고, 내·외부의 잔여 물질이 모두 제거되도록 세척한다 (Fig. 8).
- 6) 포셉으로 조직을 잡고 micropipette으로 조직 내부의 DPBS를 제거하고, 멸균된 거즈에 잔여 물질을 흡수시켜 조직 외부의 DPBS를 제거한다 (Fig. 9).

4.8 후배양

- 1) 세척과정에 들어가기 전에 assay medium을 항온조에서 37 °C로 가온 한 후 사용한다.
- 2) 6 well plate에 well당 0.9 mL의 assay medium을 넣어 준비한다.
- 3) 물질 처리 후 세척이 끝난 조직은 2)에서 준비한 plate에 옮겨 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 16 ± 1시간^a 동안 후배양을 실시한다.

^a 각 plate간 시간 차이가 크게 나지 않게 하기 위함.

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	17 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

4.9 WST-1 assay

- 1) 후배양 후 조직을 꺼내어 포셉으로 잡고 micropipette을 이용하여 내·외부의 잔여 물질을 제거한다 (Fig. 12).



Figure 12. 잔여 물질 제거

- 2) Well 마다 WST-1 용액(1:25 희석) 200 μl 씩 분주한 24 well plate에 조직을 옮긴 후, WST-1 용액 100 μl 를 조직 내부에 처리한다 (Fig. 13).

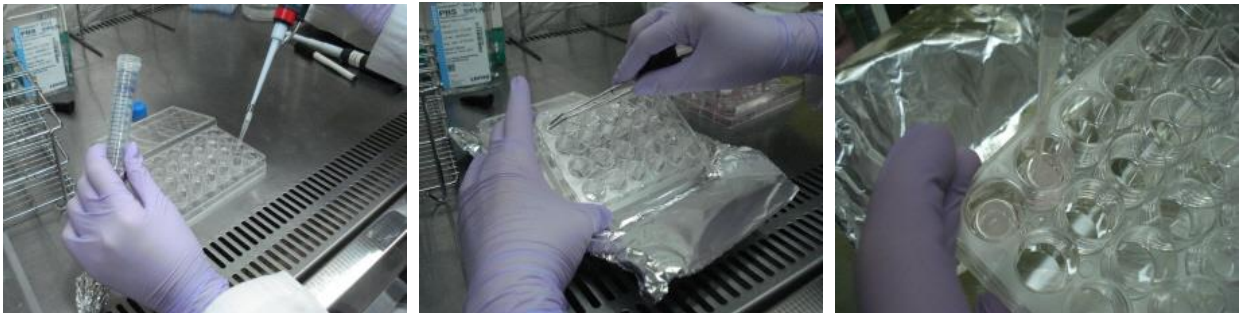


Figure 13. WST-1 용액 처리 과정

- 3) WST-1 용액을 처리한 24 well plate는 호일로 감싸 차광상태 (Fig. 14)로 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 3 시간 \pm 5 분^b 동안 배양한다.



Figure 14. WST-1 용액 처리 후 차광


^b WST-1은 반응 시간에 따른 차이가 크므로 각 well 간 반응 시간 차이를 최소화하기 위함.

4.10 흡광도 측정

- 1) WST-1 처리가 끝나면 micropipette을 이용하여 조직 내·외부의 formazan 결정체가 보이지 않을 정도로 24 well plate 내에서 pipetting한다. 모든 well의 용액을 각각의 micro tube에 넣어 원심분리(200 g, 3 분)한 후에 상등액을 취한다.
- 2) Well당 상등액 200 μl 를 96 well plate로 옮겨준다.
- 3) 96 well plate 분광광도계(파장 450 nm)를 이용하여 OD를 측정하고, 96 well plate 배치는 아래의 예시를 참고한다 (Fig. 15).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blank	Blank	empty	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	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	empty	
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	

Figure 15. OD 측정 배치 예시

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	19 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

5. 결과

5.1 조직생존율 계산

조직생존율은 음성대조군의 흡광도 값을 기준으로 양성대조군 그리고 시험물질 처리군의 평균조직생존율을 계산한다. 각 조직 별 최종 조직생존율 산출과정은 다음과 같다.

- 1) 각 조직의 OD 측정값에서 OD_{blank} 평균 측정값을 뺀다.
 - ① 음성대조군 (OD_{NC}) = OD_{NCraw} - Mean OD_{blank}
 - ② 양성대조군 (OD_{PC}) = OD_{PCraw} - Mean OD_{blank}
 - ③ 시험물질 처리군 (OD_T) = OD_{Traw} - Mean OD_{blank}

- 2) 음성대조군 대비 각 조직 별 조직생존율을 백분율로 계산한다.
 - ① 음성대조군 (%NC) = [OD_{NC} / Mean OD_{NC}] x 100
 - ② 양성대조군 (%PC) = [OD_{PC} / Mean OD_{NC}] x 100
 - ③ 시험물질 처리군 (%T) = [OD_T / Mean OD_{NC}] x 100

- 3) 각 조직의 조직생존율을 평균하여 최종 조직생존율을 계산한다.
 - ① 최종 음성대조군 조직생존율 (Mean %NC) = [%NC1 + %NC2] / 2
 - ② 최종 양성대조군 조직생존율 (Mean %PC) = [%PC1 + %PC2] / 2
 - ③ 최종 시험물질 처리군 조직생존율 (Mean %T) = [%T1 + %T2] / 2

5.2 시험타당성기준

- 1) 음성대조군의 평균 흡광도 값이 1.6 미만이거나 3.0 초과일 경우
- 2) 양성대조군의 조직생존율 값이 35 % 초과일 경우
- 3) 음성대조군, 양성대조군, 시험물질 처리군의 각 조직 2개의 조직생존율 값의 차이가 20 % 를 초과할 경우

5.3 판정기준

음성대조군의 조직생존율을 100%로 설정하고, 액체물질의 경우 조직생존율이 35% 초과인 경우는 '안자극 또는 심한 안손상으로 분류되지 않는 물질(No Category)'로 예측하며, 35% 이하인 경우는 '단독으로 예측할 수 없다(No prediction can be made)'. MCTT HCE™을 이용한 안자극시험법은 UN GHS Category 1과 2를 구별할 수 없다 (Table 3).

고체물질의 경우 조직생존율이 60% 초과인 경우는 '안자극 또는 심한 안손상으로 분류되지 않는 물질(No Category)'로 예측하며, 60% 이하인 경우는 '단독으로 예측할 수 없다(No prediction can be made)'. MCTT HCE™을 이용한 안자극시험법은 UN GHS Category 1과 2를 구별할 수 없다 (Table 3).

Table 3. 시험물질의 판정기준

	Prediction model	Classification ^c
Liquid	Mean tissue viability is \leq 35%	No prediction can be made
	Mean tissue viability is $>$ 35%	No Category
Solid	Mean tissue viability is \leq 60%	No prediction can be made
	Mean tissue viability is $>$ 60%	No Category

조직생존율 평균값이 액체는 30% 이상 40% 미만, 고체는 55% 이상 65%미만일 경우 (borderline test substance), 두 번째 시험을 수행해야 하며 수행된 두 시험 간의 결과가 일치하지 않는 경우에는 세 번째 시험을 하고, 과반의 결과로 최종 판정한다.


6. 참고문헌

OECD. (2023). Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Test guideline No. 492, OECD, Paris.

^c Protocol ver1.7에서 사용된 Irritant는 no prediction can be made로, non-irritant는 no category를 의미함.

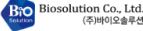
7. Annex

Annex 1 : Example of the Data Sheet of MCTT HCE™

Data Sheet – Delivery																																								
Test No.	20 . .	Test Date	20 . .																																					
Delivery [Day 1 – 20 . .]																																								
Receipt of MCTT HCE™ tissues			Condition of MCTT HCE™ tissues																																					
Date	Time	Recipient	# Lot no.:																																					
20 . .	h min		# Number of tissue: tissue (24 tissue/plate)																																					
KIT checklist			[Plate A]																																					
<input type="checkbox"/> 조직 MCTT HCE™ 수량: well Lot No.:			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>C</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>				1	2	3	4	5	6	A							B							C							D						
	1	2	3	4	5	6																																		
A																																								
B																																								
C																																								
D																																								
<input type="checkbox"/> 동결조직 MCTT HCE™-KT 수량: well Lot No.:			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td></td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>5</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>B</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>C</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>D</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>				1	2	3	4	5	6	A							B							C							D						
	1	2	3	4	5	6																																		
A																																								
B																																								
C																																								
D																																								
<input type="checkbox"/> Assay medium 용량: ml Lot No.:			# Checking point - air bubbles : (a) - flat surface : (f) - extensive moisture on the surface : (e) - condition of agarose gel : (c) - no finding: (-) # Draw a diagonal line on the unused plate diagram 																																					

Study Personnel		Signature		Date	20 . .
Study Director		Signature		Date	20 . .

MCTT HCE™_EI/Sheet/001-v1.8

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	22 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

Data Sheet – Pre-incubation

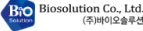
Test No.		Test Date	20 . .
----------	--	-----------	--------

Pre-incubation [Day 1 ~ Day 2 – 20 . . ~ 20 . .]

Start of pre-incubation time	:	Study Personnel	(sign)	Date	20 . .
End of pre-incubation time	:	Study Personnel	(sign)	Date	20 . .

Study Personnel		Signature		Date	20 . .
Study Director		Signature		Date	20 . .

MCTT HCE™_EI/Sheet/002-v1.8

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	23 / 28
2024.01		 (주)바이오솔루션

Data Sheet – Treatment

Test No.		Test Date	20 . .
----------	--	-----------	--------

Treatment [Day 2 – 20 . .]


Test substance Application

No of test substance: total samples with NC and PC

Code	Liquid(L) /Solid(S)	Treatment time		Start of Rinsing		Post-incubation	Remarks
		Well 1	Well 2	Well 1	Well 2		
NC		: :	: :	: :	: :	:	
PC		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	
		: :	: :	: :	: :	:	

Study Personnel		Signature		Date	20 . .
Study Director		Signature		Date	20 . .

MCTT HCE™_EI/Sheet/003-v1.8

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	24 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

Data Sheet – Post-incubation

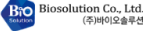
Test No.		Test Date	20 . .
----------	--	-----------	--------

Post-incubation [Day 2 ~ Day 3 – 20 . . ~ 20 . .]

Start of post-incubation time	:	Study Personnel	(sign)	Date	20 . .
End of post-incubation time	:	Study Personnel	(sign)	Date	20 . .

Study Personnel		Signature		Date	20 . .
Study Director		Signature		Date	20 . .

MCTT HCE™_EI/Sheet/004-v1.8

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	25 / 28
2024.01		 (주)브이오솔루션

Data Sheet – WST-1 assay

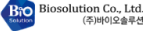
Test No.		Test Date	20 . .
----------	--	-----------	--------

WST-1 assay [Day 3 – 20 . .]

Application [# No of test substance: total		samples with NC and PC]			
Code	End of post-incubation	Start of WST-1 incubation	End of WST-1 incubation	OD reading	Remarks
NC	:	:	:	:	
PC	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		
	:	:	:		

Study Personnel		Signature		Date	20 . .
Study Director		Signature		Date	20 . .

MCTT HCE™_EI/Sheet/005-v1.8

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	26 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

Data Sheet - Preparation of materials

Test No.		Test date	20 . .
----------	--	-----------	--------

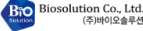
WST-1 [Day 3 - 20 . .]

[WST-1 solution in DPBS]

- ✓ Supplier:
- ✓ CAS No.:
- ✓ Lot No.:
- ✓ Expiration date:
- ✓ Volume:
- ✓ DPBS volume added:

Study Personnel		Signature		Date	20 . .
Study director		Signature		Date	20 . .

MCTT HCE™_EI/Sheet/006-v1.8

Version 1.8	<i>In vitro</i> eye irritation test with a reconstructed human cornea-like epithelium Test Method, MCTT HCE™	27 / 28
2024.01		 Biosolution Co., Ltd. (주)바이오솔루션

Data Sheet - Record of test substance

Test substance name or code			
Description of Physical consistence (color etc.)			
Total weight test substance and vial(g)			
Storage condition		Storage No	
Receipt date	20 . .	Expiration date	20 . .

Date	Initial quantity	Used quantity	Residual quantity	Study personnel
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				
20 . .				

Study director		Signature		Date	20 . .
----------------	--	-----------	--	------	--------

MCTT HCE™_EI/Sheet/007-v1.8

SOP 제/개정 기록서

제·개정 번호	제·개정일자	개정사유
1.0	2014. 06. 15	
1.1	2014. 10. 20	· 시험물질 색간섭 시험 추가
1.2	2015. 10. 17	· 자극판정 cut-off 변경
1.3	2015. 11. 30	· 시험물질 처리시간 변경
1.4	2016. 05. 20	· 자극판정 및 양성대조군 cut-off 변경 · 시험물질의 간섭 확인 과정 변경 등
1.5	2016. 09. 28	· 시험물질 처리시간 변경 등
1.6	2017. 08. 01	· 양성대조군의 변경
1.7	2020. 04. 27	· 색간섭 보정 식 등 변경
1.8	2024. 01. 22	· 시험법 명칭 변경 · 조직생존율 계산 및 판정기준 변경 · 색간섭 보정 내용 변경 등