

아비브 콤포트 선블락 프로텍션 튜브의
인공각막모델 MCTT HCE™을 이용한
안점막 자극시험

2022년 01월 17일

(주)바이오솔루션

제 출 문

(주)바이오솔루션은 (주)포컴퍼니에서 의뢰한 "아비브 콤포트 선블락 프로텍션 튜브의 인공각막모델 MCTT HCE™을 이용한 안점막 자극시험"을 위탁받고, 바이오솔루션 부설연구소 표준시험방법(SOP)에 따라 시험을 성실히 수행하여 그 결과를 다음과 같이 보고합니다.

2022. 01. 17

연구수행기관 : (주) 바이오 솔루션

대표이사

장 송 선



연구책임자 : (주) 바이오 솔루션

수석연구원

이 수 현



연구담당자 : (주) 바이오 솔루션

책임연구원

김 설 영

: (주) 바이오 솔루션

주임연구원

곽 은 지

: (주) 바이오 솔루션

주임연구원

이 건 희

: (주) 바이오 솔루션

과 장

장 지 혜

: (주) 바이오 솔루션

과 장

김 원 길

: (주) 바이오 솔루션

대 리

김 수 지

최종보고서

시험제목	아비브 콤포트 선블락 프로텍션 튜브의 인공각막모델 MCTT HCE™을 이용한 안점막 자극시험	
연구책임자	성명	공학박사 이 수 현 (인)
	소속	(주)바이오솔루션
	주소	서울특별시 노원구 공릉동 서울테크노파크 516
시험기간	2021.12.06 – 2022.02.05	
보고일	2022년 01월 17일	
의뢰기관	의뢰일	2021년 12월 06일
	기관명	(주)포컴퍼니
	소재지	서울시 송파구 백제고분로9길 14, 3층
	담당자	이 지 혜
	주소	서울시 송파구 백제고분로9길 14, 3층 Mobile : 010-9972-0695 E-mail : jihaelee.21@fourco.co.kr
시험기관	기관명	(주)바이오솔루션
	기관장	대표이사 장 송 선 (인)
	소재지	서울특별시 노원구 공릉동 서울테크노파크 803호
	담당자	김설영 팀장
	주소	서울특별시 노원구 공릉동 서울테크노파크 803호 TEL: 02-3446-8884, FAX: 02-3445-1380 E-mail: tjfud2735@biosolutions.co.kr

연구기관실태조사서

연구기관	연구기관명: (주)바이오솔루션
	주소: 서울특별시 노원구 공릉동 서울테크노파크 803
	연구기관장: 대표이사 장 송 선 (인)
	연락처: TEL) 02-3446-8884 FAX) 02-3445-1390
연구기관의 설립목적	본 기관은 화상, 욕창, 궤양 등의 피부손상의 치료제로 쓰일 인공피부 개발을 그 목적으로 설립되었고 현재 2건의 화상치료용 피부 세포치료제를 개발하여 식약처로부터 품목허가 받아 화상환자의 치료에 적용하고 있다. 피부 조직의 형태학적, 분자생물학적, 생리학적 기초 지식등 피부 세포 기반의 독자적이고 창의적인 실험 기술을 보유, 개발하고 있으며 이를 기반으로 피부 관련 바이오 스크리닝 기술과 제품을 개발과 동물대체시험 모델로서의 인공피부, 인공각막 등을 개발하고 있는 연구기관이다.
연구기관의 연구분야	- 사람피부세포 일차배양: 상피세포, 섬유아세포, 멜라닌세포, 혈관세포 - in vitro 스크리닝 모델 개발; : 상피세포로 구성된 케라스킨 : 상피세포와 섬유아세포로 구성된 케라스킨_FT : 상피세포와 멜라닌세포로 구성된 멜라스킨 - 피부세포와 스크리닝 모델을 이용한 피부관련 연구(피부 분화, 피부 노화, 콜라겐 합성, 콜라게네이즈 활성 측정, 피부 미백효과, 모낭 분화 기전 연구등) 수행 - 생분해성 지지체 개발 연구 - 인공피부를 이용한 피부자극 동물시험대체법 국제 표준화 연구 - 인공각막을 이용한 안점막자극시험 동물대체법 국제 표준화 연구 - 인공피부를 이용한 피부감작, 광독성, 유전독성 등 동물대체법 개발 연구
연구기관의 주요시설 및 장비	GMP system (약 100평), FACS, Inverted Microscope, CO ₂ incubator, Chemical hood bench, Deep freezer, Centrifuge, Freeze dryer, Fume Hood, Clean bench, Scrub Sink, Vacuum Oven, Vacuum pump, Cold trap bath
연구책임자	수석연구원 이 수 현 (인)
연구원	김설영, 곽은지, 이건희, 장지혜, 김원길, 김수지

연구책임자이력

성명	공학박사 이 수 현				
소속	(주)바이오솔루션				
학력	2012 - 2016 건국대학교공학박사 1998 - 2000 건국대학교공학석사 1994 - 1998 건국대학교공학학사				
경력	2000 - 현재 (주)바이오솔루션 수석연구원				
정부과제 수행실적	사업명	과제명	사업기간	참여유형	지원기관
	세포치료제 안전관리연구	세포치료제 용기적합성에 관한 연구	2009.05~ 2010.04	연구책임자	식품의약품 안전평가원
	동물대체시험 법국제조화연 구	국내 인공피부모델을 이용한 피 부자극성 대체시험법 사전검증 연구	2018.02~ 2019.11	연구책임자	식품의약품 안전평가원
	글로벌코스메 틱 연구개발 사업	한국인 피부전증모델을 활용한 기능성 화장품 효능평가 동물실 험 대체기술개발	2013.11.~ 2017.11	위탁책임자	보건복지부
	보건의료 연 구개발사업	상처치유를 위한 하이드로겔 창 상피복재 개발	2009.05~ 2011.03	연구원	보건복지부
	보건의료 연 구개발사업	난치성안구질환치료를위한인공각 막 및 인공결막개발	2008.11~ 2010.10	연구원	보건복지부
	독성물질관리 연구	동물대체시험법개발및검증연구-안 점막자극시험,피부감작성시험,피부 흡수및투과시험대체시험법연구	2009.3~ 2009.11	연구원	식품의약품 안전평가원
	독성물질관리 연구	국제조화 및 인증추진을 위한 동 물대체시험법 연구	2010.3~ 2010.11	연구원	식품의약품 안전평가원
	동물대체시험 법개발연구	국제협력을위한 동물대체시험법 검증 및 평가지원 연구	2012.2 ~ 2013. 11	연구원	식품의약품 안전평가원
	동물대체시험 법 평가기술 개발연구	화장품 안전성평가 동물대체기술 개발 연구	2013.2. ~ 2015.11	연구원	식품의약품 안전평가원
	동물대체시험 법 국제조화	인체 인공각막 모델을 이용한 안	2016.2. ~	연구원	식품의약품

	연구	자극시험법 검증 연구	2017.11		안전평가원
등록특허	1. Method for estimating skin whitening effect of material using human skin melanization model (Korea Patent No. 101778153) 2. Method for mimicked extracellular matrix and cosmetic composition comprising the same (Korea Patent No. 101764614) 3. Manufacturing method for 3D human skin model and method for estimating human toxicoid chemicals using the same (Korea Patent No. 101770983) 4. Method for Isolating Primary Epithelial Cells and Reconstructing Skin Equivalents or Dermis Equivalents with Primary Culture Cells (Korea Patent No. 100712724) 5. In vitro Cell Training Method for the Purpose of Cell Therapy of Reconstructing 6. Bioartificial Dermis or Bioartificial Skin (Korea atent No. 100432584) 7. Pharmaceutical Compositions for Cell Therapy of Pigmentation Disorders (International Application No. PCT/KR2006/002366, Korea Patent No. 100806695) 8. Tissue sheet of Cornea or Conjunctiva using Nasal mucosa epithelium (Korea Patent No. 100996846)				
논문	1. Me-too validation study for in vitro skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, KeraSkin™ for OECD test guideline 439 (Regul Toxicol Pharmacol. 2020) 2. Development and validation of UPLC method for WST-1 cell viability assay and its application to MCTT HCE™ eye irritation test for colorful substances (Toxicol. In Vitro. 2019) 3. Me-too validation study for in vitro eye irritation test with 3D-reconstructed human cornea epithelium, MCTT HCETM (Toxicol. In Vitro. 2019) 4. The epithelial zinc transporter ZIP10 epigenetically regulates human epidermal homeostasis by modulation histone acetyltransferase activity. (Br. J. Dermatol. 2019) 5. Nervonoylceramide (C24:1Cer), a lipid biomarker for ocular irritants released from the 3D reconstructed human cornea-like epithelium, MCTT HCE™ (Toxicol. In Vitro. 2018) 6. ZIP10 coordinates p63 activation during skin epidermis morphogenesis. (PNAS, 2017) 7. Pre-validation trial for a novel in vitro eye irritation test using the reconstructed human cornea-like epithelial model, MCTT HCE™ (Toxicol. In Vitro. 2017) 8. Establishment of immortalized primary human foreskin keratinocytes and their application to toxicity assessment and three dimensional skin culture construction. (Biomol. Ther. 2017) 9. An acrodermatitis enteropathica-associated Zn transporter, ZIP4,				

	regulates human epidermal homeostasis (J. Invest. Dermatol. 2017) 10. PAL 12, a new anti-aging hexapeptoid, inhibits UVB induced photoaging in human dermal fibroblasts and 3D reconstructed human full skin model, Keraskin FT™. (Arch Dermatol Res. 2017) 11. Evaluating the micronucleus induction potential for the genotoxicity assay using the human skin model, KeraSkinTM (J. Soc. Cosmet. Sci. Korea 2016) 12. Evaluation of eye irritation potential of solid substance with new 3D reconstructed human cornea model, MCTT HCETM (Biomol. Ther. 2015) 13. KeraskinTM-VM: A novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests (Toxicol. in Vitro, 2014) 14. Identification of cornifelin and early growth response-a gene as novel biomarkers for in vitro eye irritation using 3D reconstructed human corneal model MCTT HCETM (Arch. Toxicol, 2014) 15. Evaluation of permeability and irritancy of transdermal tranexamic acid formulation using a reconstructed human epidermis, KeraskinTM (Journal of alternatives to Animal experiments, 2012) 16. A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test (Toxicol. in Vitro, 2011) 17. Evaluation of moisturizing activity of Lipid-coated powder using a reconstructed human epidermis (Journal of alternatives to Animal experiments, 2011) 18. Inter-laboratory validation of KeraskinTM-VM for replacement of skin irritation test (Journal of alternatives to Animal experiments, 2010) 19. Ocular surface reconstruction with autologous nasal mucosa in cicatricial ocular surface disease. (Am. J. Ophthalmol. 2009) 20. Establishment of in vitro nasal epithelial model for alternative toxicity test and clinical applications (Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2009) 21. Efficacy of reconstituted human corneal model to assess the ocular irritating test (Journal of alternatives to Animal experiments, 2009) 22. The validation of alternative methods of reconstructed human skin equivalents for the assessment of skin irritation (Journal of alternatives to Animal experiments, 2008)
--	---

시험담당자이력

성명	이학석사 김 설 영				
소속	(주)바이오솔루션				
학력	2006. 3. ~ 2008. 2. 조선대학교 이학석사 2002. 3. ~ 2006. 2. 조선대학교 이학학사				
경력	2012.06 ~ 현재 (주)바이오솔루션 선임연구원 2009.12 ~ 2012.05 전남대학교 의과대학교 연구원				
정부과제 수행실적	사업명	과제명	사업기간	참여유형	지원기관
	화장품 안전 성평가 동물 대체기술 개 발 연구	점막자극 독성평가 기술 개발연 구	2013.02~ 2015.11	연구원	식품의약품 안전처
	융합기반기술 지원	한국인 피부전증모델을 활용 한 신규 기능성 화장품 피부 효능 평가 동물실험 대체기술 개발	2013.11~ 2017.10	연구원	한국보건산 업진흥원
	대체시험법 개발·검증 기 반 구축 연구	인체 인공각막 모델을 이용한 안 자극시험법 검증연구(1)	2016.02~ 2017.11	연구원	식품의약품 안전처
	대체시험법 개발·검증 기 반 구축 연구	국내 인공 피부 모델 조직을 이용한 피부자극성 시험 대체 시험법 사전검증 연구(2)	2018.02~ 2019.11	연구원	식품의약품 안전처
등록특허	1. Manufacturing method for 3D human skin model and method for estimating human toxicoid chemicals using the same (Korea Patent No. 101770983) 2. Method for mimicked extracellular matrix and cosmetic composition comprising the same (Korea Patent No. 101764614)				
논문	1. Me-too validation study for in vitro skin irritation test with a reconstructed human epidermis model, KeraSkin™ for OECD test guideline 439 (Regul Toxicol Pharmacol. 2020) 2. Development and validation of UPLC method for WST-1 cell viability assay and its application to MCTT HCE™ eye irritation test for colorful substances. (Toxicol In Vitro. 2019 Oct;60:412-419) 3. The epithelial zinc transporter ZIP10 epigenetically regulates human				

	epidermal homeostasis by modulating histone acetyltransferase activity. (Br J Dermatol. 2019 Apr;180(4):869-880) 4. Me-too validation study for in vitro eye irritation test with 3D-reconstructed human cornea epithelium, MCTT HCE™. (Toxicol In Vitro. 2019 Mar;55:173-184) 5. Nervonoylceramide (C24:Cer), a lipid biomarker for ocular irritants released from the 3D reconstructed human cornea-like epithelium, MCTT HCE™. (Toxicol In Vitro. 2018 Mar;47:94-102) 6. Identification of cornifelin and early growth response-1 gene as novel biomarkers for in vitro eye irritation using a 3D reconstructed human cornea model MCTT HCE™.(Arch Toxicol. 2015 Sep;89(9):1589-98) 7. Evaluating the Micronucleus Induction Potential for the Genotoxicity Assay Using the Human Skin Model, KeraSkin™ (in Toxicology Letters 221:S139)
--	---

결과보고서 요약문

시험제목	아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브의 인공각막모델 MCTT HCE™을 이용한 안점막 자극시험	
시험기관 : (주)바이오솔루션	연구관리번호 : BS-RMS-211206	
시험기간 : 2021.12.06 – 2022.02.05		
시험방법	시료	아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브(1종)
	처리 농도	As is
	시험방법	1. 화장품 위해평가 가이드라인(식약처, 2013) 2. 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인 IX : 인체 각막 유사 상피모델을 이용한 안자극시험법(식약처, 2016) 3. Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Method for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 492 (OECD, 2019)
시험결과	(주)포컴퍼니에서 의뢰한 아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브의 인공각막모델 MCTT HCE™을 이용한 안점막 자극시험 결과, 아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브 적용 후 인공각막모델의 세포생존률은 102.8%로 비자극물질로 평가되었다.	
첨부자료	보고서	

1. 연구 제목

아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브의 인공각막모델 MCTT HCE™을 이용한 안점막 자극시험

2. 연구목적

본 시험은 인공각막모델 MCTT HCE™를 이용하여 아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브의 안점막 자극성을 평가하였다.

3. 연구과제 수행기간

2021.12.06 – 2022.02.05

4. 실험방법

4-1. 시험계

(1) 종류

- 인공각막모델 MCTT HCE™

(2) 선택 이유

- 기존의 OECD TG 405 (Draize eye irritation test)에 등재된 실험동물을 이용한 안점막 자극시험을 대체하기 위함이다. MCTT HCE™는 사람의 각막상피세포를 이용하여 각막의 상피를 재현한 인공각막모델로서 기저층(basal cell), 날개세포층(wing cell), 표면편평상피세포층(squamous cell)으로 구성된 다층의 각막 상피모델이다. 인체 각막과 생화학적·물리적 특성이 유사하게 제작되었다. 본 시험은 인공각막모델인 MCTT HCE™에 시료 처리 후 나타나는 안점막 세포의 생존율을 측정하여 안점막 자극 가능성을 예측하고자 한다.

(3) 공급원

- (주)바이오솔루션 (서울시 노원구 공릉로 232 서울테크노파크 803호)

(4) 크기

- 직경 9 mm (면적 0.6 cm²)

(5) 사용조건

- 37°C, 5% CO₂의 세포배양기에서 22±2시간동안 전배양 한 후 시험에 사용한다.

4-2. 시험물질 처리

(1) 시험물질

[Table 1] 시험물질

	물질명	CAS No.	입수량	농도	보관조건	공급원
1	DPBS ¹ (음성대조군)		20 mL	as is	실온	WELGENE
2	Methyl acetate ¹ (양성대조군)	79-20-9	20 mL	as is	실온	Sigma-Aldrich
3	아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브	-	50 mL	as is	실온	(주)포컴퍼니

¹: OECD TG 492 (OECD, 2019)



[Fig. 1] 아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브

(2) 시험계의 준비

- 배양액을 6 well plate에 well 당 0.9 mL씩 넣는다. 그 후 MCTT HCE™를 공기 방울이 생기지 않도록 조심스럽게 옮긴다. 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 약 22±2시간 동안 안정화한다.

(3) 시험물질의 색간섭 확인시험

- 시험물질에 따라 발색을 보이는 물질이 있거나, WST-1과 직접적으로 반응하여 formazan을 환원시키는 경우가 있어 시료 적용 전 이를 확인한다.

① 발색성시험

시험물질 40 µL를 1 mL의 증류수에 넣고 1시간동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 후에 450nm에서 흡광도를 측정한다. 흡광도가 0.1을 초과한 경우 MCTT HCE™에서 functional check를 시행한다.

- ② 환원성시험
 시험물질 40 μl 를 1 mL의 WST-1 용액에 넣고 3시간동안 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양한 후에 색 변화가 있는지 확인한다. WST-1용액이 노란색으로 바뀐 경우 동결사멸조직에서 functional check를 시행한다.
- (4) 시험물질의 적용 및 세척
 - ① 물질의 준비
 음성대조물질로는 DPBS, 양성대조물질로는 methyl acetate를 사용한다. 시료는 원액을 사용하며, 시험적용 직전까지 차광하여 준비한다.
 - ② 물질의 적용
 시험물질적용은 각 시험물질당 2개 well씩 적용한다. 40 μl 의 시험물질을 MCTT HCE™ 상부 중앙에 천천히 적용한 후 멸균된 포셉으로 insert를 잡고 표면에 전체적으로 적용되도록 한다. 시험물질 적용은 적용 시작을 기준으로 10±1분간 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 반응시킨다.
 - ③ 세척
 DPBS를 이용하여 인서트 내외부에 시험 물질이 모두 제거되도록 세척한다.
 - ④ 후배양
 세척 후 후배양을 위해 미리 준비해둔 plate에 조직을 옮겨 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 16±1시간 동안 배양한다.

4-3. WST-1 assay

- ① 후배양 후 인서트를 포셉으로 꺼내어 잡고 마이크로피펫을 이용하여 MCTT HCE™ 내·외부의 배지를 제거한다.
- ② 1:25로 희석된 WST-1 용액을 새로운 24 well plate에 200 μl /well씩 넣고 MCTT HCE™를 그 위에 옮긴 후, WST-1 용액 100 μl 를 인서트 내부에 처리한다.
- ③ WST-1을 적용한 24 well plate는 호일로 감싸 차광상태로 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 3시간±5분 동안 배양을 한다.

4-4. 흡광도 측정

- ① 마이크로피펫을 이용하여 인서트 내·외부의 WST-1 용액을 합한 후에 균질해지도록 24 well plate 내에서 피펫팅한다.
- ② Well 당 200 μl 를 96 well plate 로 옮겨준 다음, 각 well 안에 공기방울이 있는지 확인한다. 공기방울이 있는 경우 26G 혹은 그보다 얇은 주사바늘을 이용하여 공기방울을 제거한다.
- ③ 96 well plate 분광광도계를 이용하여 450nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

4-5. 흡광도 분석

① 세포생존율

세포생존율은 음성대조물질 DPBS의 흡광도 값을 기준으로 각 시험물질의 흡광도 값을 산출한다.

② 용매대조군 (OD_{blank})

각 plate의 2개 OD_{blank} 의 평균값을 산출한다.

③ 음성대조물질(OD_{NC})

각 plate의 2개 음성대조물질 흡광도 값(OD_{NCraw})에서 OD_{blank} 를 뺀 값들의 평균값을 산출한다(OD_{blank}). 산출식은 ' $OD_{NC} = OD_{NCraw} - OD_{blank}$ '이다. 음성대조물질의 세포생존율은 100%가 된다.

④ 양성대조물질 (OD_{PC})

각 plate의 2개 양성대조물질 흡광도 값 (OD_{PCraw})에서 OD_{blank} 를 뺀 값들의 평균값을 산출한다(OD_{PC}). 산출식은 ' $OD_{PC} = OD_{PCraw} - OD_{blank}$ '이다. 양성대조물질은 처리한 2개 조직의 OD_{PC} 평균값을 평균 OD_{NC} 값으로 나눠 세포생존율을 구한다. 산출식은 '양성대조군의 세포생존율 (%) = (평균 OD_{PC} / 평균 OD_{NC}) X 100'이다.

⑤ 시험물질 (OD_T)

각 시험물질 흡광도 값 (OD_{Traw})에서 OD_{blank} 를 뺀 값들의 평균값을 산출한다(OD_T). 산출식은 ' $OD_T = OD_{Traw} - OD_{blank}$ '이다. 시험물질을 처리한 2개 조직의 OD_T 평균값을 평균 OD_{NC} 값으로 나눠 세포생존율을 구한다. 산출식은 '시험물질의 세포생존율 (%) = (평균 OD_T / 평균 OD_{NC}) X 100'이다.

OD_{blank} = 용매대조군 흡광도 값

OD_{NCraw} = 음성대조물질 흡광도 값

OD_{NC} = 음성대조물질 흡광도 값

OD_{PCraw} = 양성대조물질 흡광도 값

OD_{PC} = 양성대조물질 흡광도 값

OD_{Traw} = 시험물질 흡광도 값

OD_T = 시험물질 흡광도 값

4-6. 안자극의 판정기준

음성대조물질의 세포생존율을 100 %으로 한다. 액체 시험물질의 경우 세포생존율이 35% 초과인 경우는 비자극 물질로, 35 % 이하인 경우는 안자극 물질로 판정하며, 고체 시험물질의 경우 세포생존율이 60% 초과인 경우는 비자극 물질로, 60% 이하인 경우는 안자극 물질로 판정한다.

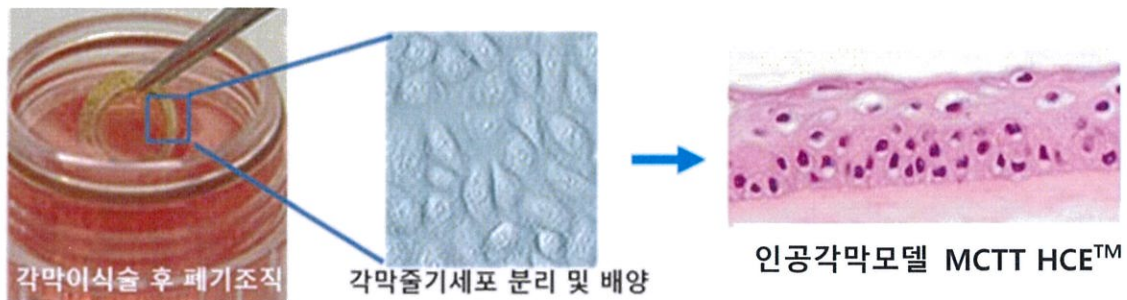
[Table 2] 안자극의 판정기준

	Prediction model	Classification
Liquid	Mean tissue viability is $\leq$ 35%	Irritant (I) R38
	Mean tissue viability is $>$ 35%	Non-Irritant (NI)
Solid	Mean tissue viability is $\leq$ 60%	Irritant (I) R38
	Mean tissue viability is $>$ 60%	Non-Irritant (NI)

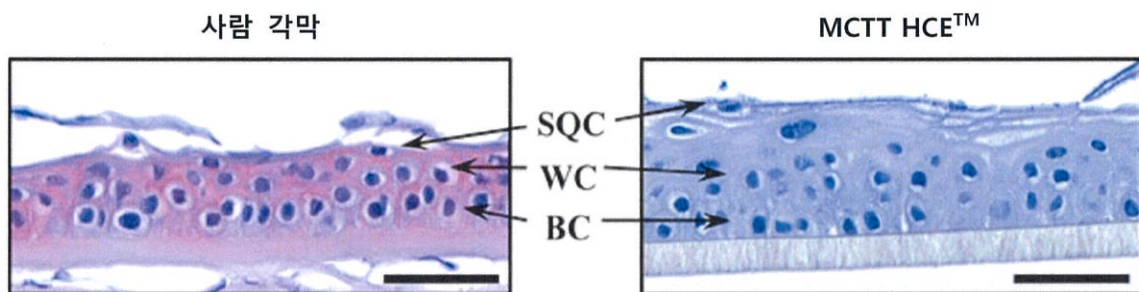
5. 실험결과

5-1. 인공각막모델 MCTT HCE™

MCTT HCE™는 각막이식술 후 폐기조직으로부터 각막줄기세포를 분리 배양하여 3차원 인공각막모델을 재건한 것으로 실제 사람 각막과 형태학적으로 매우 유사하다[Fig. 2][Fig. 3].



[Fig. 2] 사람 각막줄기세포를 이용한 인공각막모델 재건

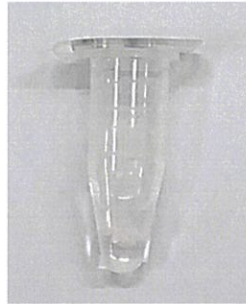


[Fig. 3] 인체 안점막모델 MCTT HCE™의 조직병리

BC: Basal cell, WC: Wing cell, SQC: Squamous cell

5-2. 시험물질의 색간섭확인시험

시험물질이 세포생존을 측정 시약인 WST-1을 환원시켜 반응하거나, 물질 자체의 색상으로 인한 세포생존을 측정 시 간섭 유무를 확인하기 위하여 안점막자극시험 표준 프로토콜의 색간섭확인시험 절차에 따라 발색성과 환원성을 확인하였다. 그 결과, 시료의 발색성 OD값은 0.050으로 발색성은 없었으며, 환원성도 확인되지 않았다[Fig. 4].



발색성 : OD 0.050 ($0.1 \leq OD$)

환원성 : 색 변화 없음

[Fig. 4] 아비브 콤포트 선블락 프로텍션 튜브의 색간섭확인시험 결과

5-3. 시험물질 처리

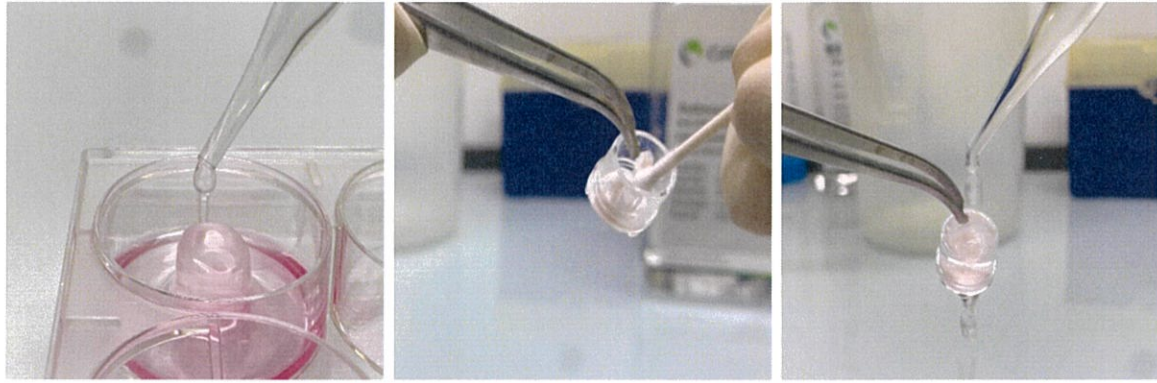
시험물질이 MCTT HCE™ 표면에 고르게 퍼지도록 처리한다[Fig. 5].



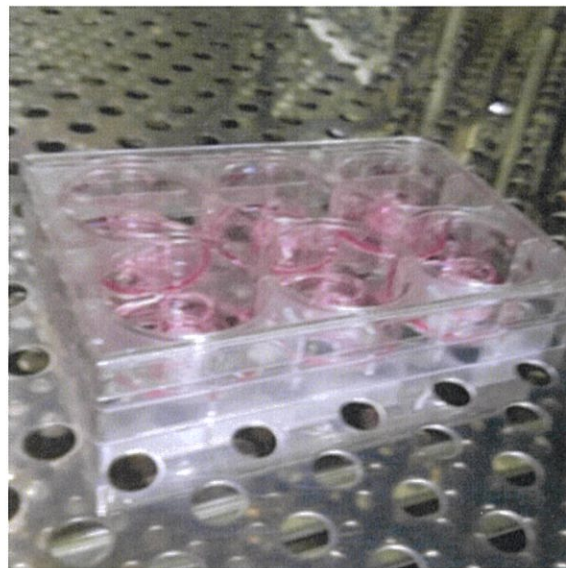
[Fig. 5] 시료 처리

5-4. 세척 및 후배양

시험물질 적용을 마친 MCTT HCE™ 표면을 DPBS로 세척하고[Fig. 6], 조직에 남아있는 물질을 멸균된 면봉으로 닦아낸 후 DPBS로 한 번 더 세척하였다. 조직 표면에 있는 물기는 멸균거즈로 제거하여 후배양 하였다[Fig. 7].



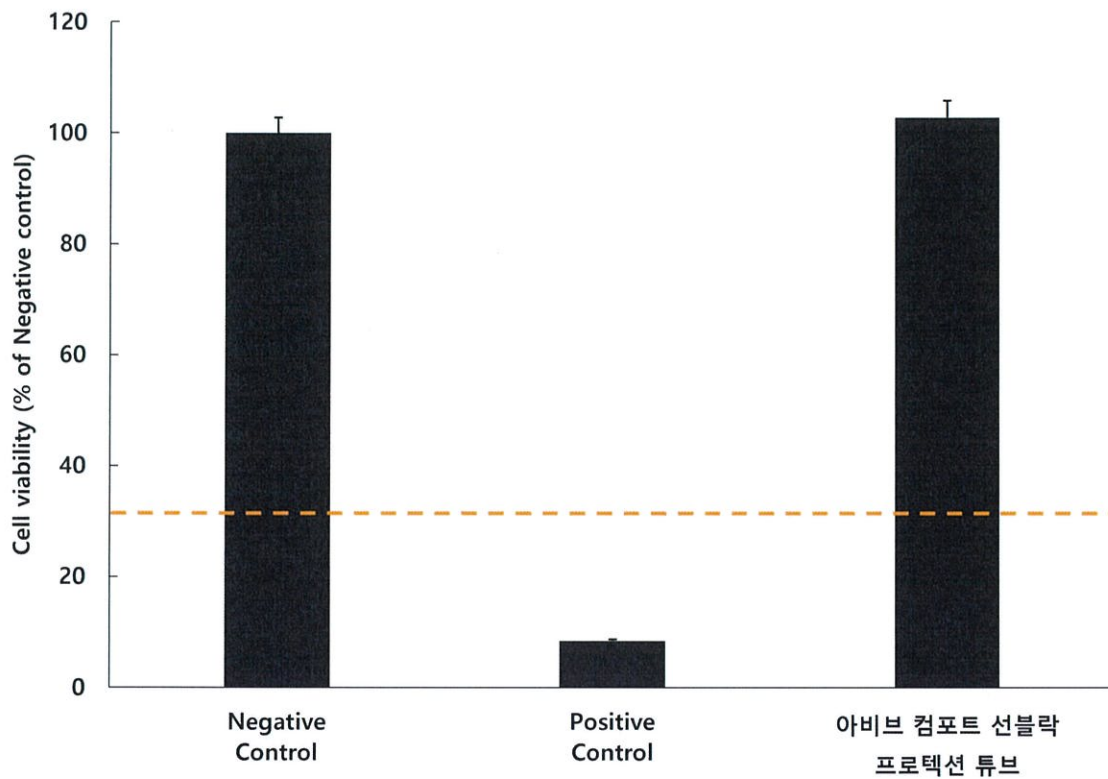
[Fig. 6] MCTT HCE™ 표면의 시험물질 세척



[Fig. 7] 시험물질 세척 후 37°C CO₂ 세포배양기에서 후배양

5-5. 세포생존율의 측정

음성대조물질의 세포생존율은 100%, 양성대조물질의 세포생존율은 8.5%로 시험이 적절히 수행되었다. 아비브 콤포트 선블락 프로텍션 튜브의 발색성과 환원성은 확인되지 않았다. 아비브 콤포트 선블락 프로텍션 튜브의 최종 세포생존율은 102.8%로 산출되었다[Fig. 8], [Table 4].



----- : 액체물질의 자극/비자극 cut-off

[Fig. 8] 시험물질을 처리한 MCTT HCE™의 세포생존율

6. 결론

[Table 4] 안점막 자극시험 결과 판정

No.	Test material	Cell viability (%)	Prediction
		Mean ± SD	
1	DPBS (NC)	100.0 ± 2.7	비자극
2	Methyl acetate (PC)	8.5 ± 0.3	자극
3	아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브	102.8 ± 3.1	비자극

본 시험에서는 인공각막모델을 이용하여 아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브에 대한 안점막 자극평가를 실시하였다. 그 결과 아비브 컴포트 선블락 프로텍션 튜브의 세포생존율은 102.8%로 안점막 자극이 없음을 확인하였다[Table 4].

7. 참고문헌

Kyoung-Mi Jung, Su-Hyon Lee, Yang-Hwan Ryu, Won-Hee Jang, Ju-Hee Han, Seung-Hyeok Seok, Jae-Hak Park, Youngsook Son, Young-Ho Park, Kyung-Min Lim. A new 3D reconstituted human corneal epithelium model as an alternative method for the eye irritation test. *Toxicol. in vitro*, 25, 403-410 (2011).

Seunghye Choi, Miri Lee, Su-Hyon Lee, Seol-Yeong Kim, Tae-Young Chung, Tae-boo Choe, Young-Jin Chun, Kyung-Min Lim. Identification of cornifelin and early growth response-1 gene as novel biomarkers for in vitro eye irritation using a 3D reconstructed human cornea model MCTT HCE™, *Arch Toxicol.* 89(9), 1589-1598 (2015)

Won-hee Jang, Kyoung-mi Jung, Hye-ri Yang, Miri Lee, Su-Hyon Lee, Miyoung Park, Kyung-Min Lim. Evaluation of Eye Irritation Potential of Solid Substance with New 3D Reconstructed Human Cornea Model, MCTT HCE™, *Biomol. Ther.* 23(4), 379-385 (2015)

Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Method EpiOcular™ Eye Irritation Test Described in TG 492. Series on Testing and Assessment No. 216, OECD. (2015).

Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Method for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 492, OECD. (2019)