

Interlaboratory Validation Study of *In Vitro* Alternatives to the Draize Eye Irritation Test : HET- CAM Test and Cytotoxicity Test for 20 Cosmetic Ingredients

이 호, 김주현, 홍진천¹, 김기문², 박문익³, 류창석⁴, 정민석⁵, 김종일

㈜태평양 기술연구원 피부과학연구소,¹나드리화장품㈜ 기술연구소,

²㈜보령메디앙스 화장품연구센터,³㈜LG 화학 화장품연구소,

⁴㈜코리아나화장품 화장품연구소,⁵한국화장품㈜ 기술개발연구소

Abstract

피부 전용 제재 개발을 위해 요구되는 동물 대체 시험법 중 가장 적극적으로 연구가 행하여지고, 실제 실용화가 예상되는 것은 안점막 자극 시험으로 지금까지 여러 가지 방법이 개발되었지만 그 중 계란 유정란의 용모요막(CAM)을 이용한 방법이 현재 가장 활발히 진행되고 있다. 이 방법이 일부 국가에서 이미 안점막 자극 시험 동물 대체 시험법으로 공인되었으며 현재까지도 validation 연구를 활발히 진행하고 있다. 본 연구에서도 국내에 적합한 안점막 자극 시험 동물 대체 시험법의 공인 시험법 개발 및 validation study를 목표로 계란 유정란의 용모요막을 이용한 방법 중 HET-CAM 방법을 시행하였으며 안점막 동물 대체 시험법으로 확립하고자 하였다. HET-CAM 방법의 보완을 위해 배양된 세포를 통해 자극도를 측정할 수 있는 방법인 Cytotoxicity test를 도입하여 시행하였으며 두 방법의 data들을 분석하여 validation study를 수행하였다. 국내 유수의 6개 장업

사가 본 연구에 참가하여 20 가지의 화장품 전용제제를 대상으로 1 차, 2 차 validation study 를 진행하였다. HET-CAM test, Draize eye irritation test, Cytotoxicity test 측정결과 HET-CAM 의 “Q” 수치는 대부분 강자극 수치인 2 이상이었고 10 % sodium hydroxide 가 가장 높은 수치를 보였으며 Tween 20(sorbitanpolyoxyethylene monolaurate) 100%가 가장 낮은 수치를 보였다. In vivo 의 경우 10% sodium hydroxide 가 가장 높은 수치를 보였으며 30% propylene glycol 이 가장 낮은 자극수치를 보였다. HET-CAM test 와 Draize eye irritation test, Cytotoxicity test 간의 상관성 분석은 linear correlation coefficient 와 rank correlation coefficient 를 구하여 비교하였으며 6 개 장업사(A-F)의 실험실에서의 HET-CAM test 결과를 취합하여 각각 두 실험실간의 상관관계(linear correlation)를 분석하였다. Linear correlation coefficient 분석 결과를 보면 전반적으로 상관관계가 0.589 ~ 0.954 의 범위였으며, 특히 A사와 B사 사이의 경우 0.954 이었으며, E사와 F사 사이의 경우 0.942 로 높은 상관관계를 보였다. 그 외에도 A사와 D사 사이의 경우(0.589)와 B사와 D사 사이의 경우(0.638)를 제외하고는 대체로 높은 상관관계를 나타내었다.

Introduction

화장품은 인체에 대한 작용이 경미한 것을 전제로 하기 때문에 일반적으로 안자극 측면에서 크게 위협하지 않다고 생각한다. 그러나 피부 장애가 일어날 수 있는 것도 사실이고 과학기술의 발달에 따라 지금까지 발생하지 않았던 안전성의 문제가 제기되기도 한다. 화장품에 새로 사용되는 원료의 안전성을 확보하기 위하여 1 차 피부자극 시험, 안점막 자극 시험, 광독성 시험 등 여러 가지 시험 법이 요구되는데 대부분의 시험이 동물을 이용한 것이다. 그러나 유럽을 중심으로 화장품의 개발에 동물실험의 수행은 많은 비난을 받고 있다. 실제로 유럽의 화장품 회사는 동물 대체 시험법 개발을 진행하여 1980 년 이후에 validation 작업을 통하여 일부의 시험법에 대하여는 대체에 관한 논의가

진행되고 있으며 1990년대 이후에는 연구성과에 대한 가시적인 보고가 등장하고 있다. 또한 산업사회의 발달 및 환경과 동물보호운동 등의 시대적 요구에 의해 의약 및 화장품 등의 피부전용제제의 개발 시 보다 안전하고 효과 있는 물질을 선정하는 방법에 있어서 동물실험의 감소 또는 대체 *in vitro* 시험법 개발의 필요성이 증대되고 있는 실정이다 (Guillot, 1992 ; Wilcox and Bruner, 1990). 이러한 세계적 추세에 동참하고 앞서나가는 것만이 피부전용제제 산업을 세계와 어깨를 나란히 할 수 있는 수출산업으로 발전시킬 수 있는 방법이다. 그래서 본 연구는 피부전용제제의 안전성평가를 위해 국내 우수 장업사간에 컨소시엄을 구성하여 본 연구를 수행하고 공인될 수 있는 *in vitro* 대체시험법을 개발하여化妆품을 포함한 피부 전용제제의 개발을 촉진하는 것을 그 목표로 한다. 안점막 자극 시험법인 Draize eye irritation assay(Atterwill and Steele, 1987 ; Borenfreund and Borrero, 1984 ; Reinhardt *et al.*, 1985)의 대체법 개발을 위해 1988년에 West Germany에서 수종의 자극성 물질에 대해 가장 이상적이라 여겨진 두 가지 대체 시험법을 이용해 validation study를 시작하였다. 그 두 가지 방법으로 유정란의 용모요막을 이용한 HET-CAM assay (Luepke, 1985)와 neutral red/kenacid blue assay(NR/KR)(Borenfreund and Puerner, 1985)이 선택되었다. 그 이후 여러 나라의 연구진들이 대체 시험법에 대한 많은 연구를 진행하였으며 international 또는 interlaboratory research program을 통해 validation study를 진행시켜 오고 있다.

재료 및 방법

Validation study를 위한 조직구성

Validation study를 위해 국내 6개의 cosmetic industry corporations이 참가하였다. 6개 cosmetic industry corporations이 HET-CAM assay를 first, second validation steps로 시험을 진행하였으며 1개 cosmetic industry corporation이 cytotoxicity assay를 first, second validation

steps 로 수행하였다. Study director group 은 태평양 기술연구원이 맡아서 시험을 주도 하였고 확립한 공통된 standard operating procedure(SOP)를 이용하여 모든 과정을 수행하였다.

안점막 자극 *in vitro* 대체 시험법

안점막 자극 대체 시험법으로써 HET-CAM assay 와 cytotoxicity 를 채택하였다. HET-CAM assay 는 유정란의 용모요막을 이용한 안점막 자극시험 동물대체 시험법으로 유럽에서는 동물대체 시험법으로써 가장 신뢰 받는 시험법중의 하나로서, 현재까지 계속해서 유럽을 중심으로 일본 등에서 대학, 기업체 등 연구 기관들과 위원회를 구성하여 validation 연구를 활발히 진행하고 있으며 국내에서도 이를 목표로 국내 장업사들과 공동으로 동일한 20 가지 시험물질을 대상으로 HET-CAM 방법을 실시함으로써, 동물 대체 시험법으로서의 타당성 여부를 연구하였다.

HET-CAM assay 의 보충적인 시험으로서 cytotoxicity assay 를 수행하였으며 cytotoxicity assay 로서 mouse fibroblast cell(NIH 3T3)과 Human skin keratinocyte cell(HaCaT)을 이용한 neutral red uptake assay 를 실시하였고, 그 data 를 기초로 각 시험물질에 대한 LC50 값을 구하였다.

시험 물질의 선정 및 준비

본 연구를 위해 시험물질은 화장품에서 피부전용제재로서 사용되는 원료 중 surfactants 및 alcohol 총 20 가지 물질을 사용하였다. 시험 물질의 구성은 18 종의 surfactants 와 1 종의 alcohol 그리고 1 종의 acid 로 구분되며 모두 water-soluble 한 물질로서 liquid solution 으로 시험을 수행하였다. 시험 물질이 액상으로 물질적용 후 CAM 반응 관찰이 가능하므로 HET-CAM score 인 “Q” 값을 reaction-time method 에 의해 산출하였다.

In vivo 시험법(Draize eye irritation test)

In vivo data 는 통상적인 Draize 방법을 사용하여 수행하였다. Draize 방법은 화학물질 중

에서 우발적 또는 의도적으로 사람의 점막에 접촉 가능성이 있는 것에 대해서 토끼의 안 점막에 접촉 후 국소적으로 나타나는 안자극성을 검토하는 시험으로 되도록 사람에게 실제 접촉되는 상황에 준하여 실시한다. 실험동물은 체중 2.5 ~ 3.5 kg의 New Zealand White Rabbit 을 이용하였으며 적용하고자 하는 농도의 시료 0.1 ml 을 투여량으로 하였다. 토끼의 아래 눈꺼풀(하안검)을 안구로부터 멀리 당겨 컵 모양을 형성시키고, 이 결막낭 (conjunctiva sac)에 시료를 점안하고 약 1 초간 눈을 감은 상태로 유지시켜 시료의 손실을 막는다. 눈 밖으로 나온 시료를 휴지로 제거하고 시료를 투여하지 않은 다른 눈을 대조로 했다. 적용 후 1 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간째에 각막의 혼탁 및 혼탁 된 각막의 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물 유무 등의 변화를 육안으로 관찰하였다. Draize score 는 각 시험물질에 대해서 MAS(maximum average score), MMAS(modified MAS ; 24 시간 이상 관찰기간 중 나타나는 최대반응을 계산하였다. MMAS, MAS 는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{MMAS} = 5 \times (\text{SCORE}_{\text{opacity}} \times \text{SCORE}_{\text{area}}) + 5 \times \text{SCORE}_{\text{iris}} + 2 \times (\text{SCORE}_{\text{erythema}} + \text{SCORE}_{\text{chemosis}} + \text{SCORE}_{\text{discharge}})$$

HET-CAM test

HET-CAM 방법은 유정란의 용모요막을 이용한 안점막 자극시험 동물 대체 시험법으로 시험물질의 점막에 대한 급성 자극정도를 평가하기 위한 방법이다. 일반적으로 알려진 품종인 White Leghorn 이 낳은 신선하고 고유의 형태를 지닌 종란을 이 시험에 이용하였다. 계란을 배양기에 넣기 전에는 양단 중 뾰족한 곳이 밑으로 향하고 완만한 각을 가진 곳이 위로 향하게 하여 난좌에 배치한다. 수정된 계란(White leghorn)을 자동전란 기능이 있고 37.5±1℃, 40-60% humidity 를 유지하는 유정란 배양기(Pyungnong Co.)에 배양시킨 후 10 일째에 시험물질 0.3 ml를 CAM 에 적용하였다. 시험 물질 적용 후 parameter 인 hemorrhage, lysis, coagulation 반응이 일어나는 최초의 시간을 초단위로 측정하여 reaction-time method 에 의해 결과를 산출하였고 측정 후 각 반응에 대하여 weighting factor 인 g1

과 g2 및 시험물질의 score 를 컴퓨터 프로그램화된 식에 의하여 환산하였다. 최종 score 인 "Q"값은 관찰된 시험물질의 score 에 대한 positive 표준 reference 물질(sodium magnesium lauryl-myristyl-6-ethoxysulfate ; Texapon ASV, anionic surfactant) 에 대한 비율로 나타낸 값이다.

Cytotoxicity test

Cytotoxicity test 로 neutral red uptake assay 를 실시하였다. 이 방법은 수용성 vital dye 인 NR(3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride)를 이용하는 viable cell count 방법이다. NR(3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride)은 intact plasma membrane 을 통과해서 viable cell 의 lysosome 에 축적되며 cell surface 와 lysosomal membrane 에 damage 를 주는 물질은 dye incorporation 을 막으므로 viable cell count 에 용이하다. 시험 세포 주는 mouse fibroblast cell(NIH 3T3)와 humane skin keratinocyte(HaCaT)를 이용하였으며 DMEM 배지(10% FBS 함유)에서 37°C, 5% CO₂ humidified incubator 조건하에서 배양한 후, 선정된 20 가지 물질을 24 시간 동안 처치한 후 viable cell 을 OD 로 측정하고 그 data 를 기초로 각 시험물질에 대한 LC₅₀ 값을 구하였다.

In vivo/in vitro correlation

1) HET-CAM test 및 Cytotoxicity test 와 Draize eye irritation 과의 validation study

HET-CAM 결과인 "Q"값 및 Cytotoxicity test 의 결과인 LC₅₀ 값과 Draize 법의 결과인 MMAS, MAS 에 대해서 linear correlation 과 rank correlation 정도를 각각 분석하였고, 안점막의 각 부위 별에 따른 결과에 대해서도 동일한 방법으로 상관정도를 분석하였다. 또한, HET-CAM 결과의 "Q"값과 Cytotoxicity test 결과의 LC₅₀ 와도 동일한 방법으로 상관정도를 분석하였다. Cytotoxicity test 결과 중 cell line 간의 상관정도를 분석하기 위해 각 cell line 들의 LC₅₀ 들을 비교하여 linear correlation 을 분석하였다.

2) HET-CAM test 의 Interlaboratory Validation Study

모두 6 개의 국내 장업사 실험실에서 HET-CAM test 결과에 대하여 각각 linear correlation 및 rank correlation 을 구하여 각 실험실간의 상관관계를 분석하였다.

결과 및 고찰

HET-CAM test 및 Cytotoxicity test 와 Draize eye irritation 과의 상관관계 분석

Prevalidation 을 거쳐 1 차 validation 에 사용된 시료는 화장품에 사용되는 원료로서 비이온 계면활성제(11 종), 양이온 계면활성제(1 종), 음이온 계면활성제(7 종), 산(1 종), 알코올(1 종)로 구성된 20 가지였으며(Table 2), 이에 대하여 Draize eye irritation, HET-CAM, Cytotoxicity test 를 실시하였다. Draize eye irritation 의 결과에 대한 비교 parameter 로는 3 가지로 1) 최대치의 평균값 중 1 시간 측정결과를 제외한 MMAS, 2) 각 측정시간대별(1 시간포함) 측정 평균값 중 최대치인 MAS, 3) 안점막 부위에 따라 각막, 홍채, 결막별로 maximum score 를 측정하였다. HET-CAM 의 “Q” 수치는 대부분 강자극수치인 2 이상이었고 10% sodium hydroxide 가 가장 높은 수치를 보였으며 Tween 20(sorbitanpolyoxyethylene monolaurate) 100 %가 가장 낮은 수치를 보였다. *In vivo* 의 경우 10% sodium hydroxide 가 가장 높은 수치를 보였으며 30% propylene glycol 이 가장 낮은 자극수치를 보였다. Cytotoxicity test 의 경우는 10% benzalkonium chloride 가 자극이 가장 높게 나왔고 30% PEG 400 의 경우 자극이 가장 낮게 나왔다.

HET-CAM 결과인 “Q”값 및 Cytotoxicity test 의 결과인 LC₅₀ 값과 Draize 법의 결과인 MMAS, MAS 에 대해서 correlation 과 rank correlation 정도를 각각 분석하였고, 안점막의 각 부위 별에 따른 결과에 대해서도 동일한 방법으로 상관정도를 분석하였다. 또한, HET-CAM 결과의 “Q”값 및 Cytotoxicity test 의 결과인 LC₅₀ 와 동일한 방법으로 상관정도를 분석하였다(Table 3). HET-CAM test 와 MMAS, MAS 와의 linear correlation coefficient 와 rank

correlation coefficient 는 각각 1 차 0.71541, 0.659, 2 차, 0.740, 0.754 그리고 1 차 0.720, 0.623, 2 차 0.747, 0.657 이었으며, Cytotoxicity test 와 MMAS, MAS 와의 linear correlation coefficient 와 rank correlation coefficient 는 NIH-3T3 세포주의 경우 각각 1 차 -0.386, -0.766, 2 차 -0.289, -0.792 그리고 1 차 -0.415, -0.788, 2 차 -0.315, -0.818 이었다. HaCaT 세포주의 경우 -0.317, -0.873 그리고 -0.347, -0.884 였다(Table 3, Figure 1, 2).

HET-CAM 과 MMAS 의 상관관계에서 좋은 상관성을 보이는 것은 전체 20 개 시료 중 55%였으며 상관성이 좋지않은 시료는 15% 정도였다. 상관성이 좋지 않은 시료의 경우, MMAS 에서는 slightly irritating 을 보였지만 HET-CAM 에서는 severely irritating 을 나타내는 물질로서 polyoxyethylene(15)nonylphenyl ether, α -olefin sulfonate, sodium cocoylglutamate 가 있었다.

W. Steiling 등은 97 가지 시료를 대상으로 한 prevalidation study 에서 POE group 을 가진 fatty alcohol ether 가 상관성에서 벗어나는 시료라고 이야기 하고 있고, 좋은 상관성을 보이는 것은 약 94%에 이른다고 보고하였다. 그리고 주로 formulation 을 위주로 한 validation study 에서, slightly irritating 물질은 90%의 좋은 상관성을 보였으나 severely irritating potential 을 가지는 물질의 경우는 53%가 일치하였으며 MMAS 에 대해 과소 평가 되는 경향을 보였다(W. Steiling *et al*). 본 시험 결과와 비교해 볼 때 본 결과의 상관성이 더 낮게 나왔고 MMAS 에 대해 과대 평가되는 경향을 보였다. 그러나 false positive 반응을 나타내는 Triton X-100, sodium lauryl sulfate 는 비교적 상관성이 좋게 나타났고 상관성이 좋지 않은 3 가지 시료 중 2 가지 시료는 Cytotoxicity data 로서 보완이 되어 HET-CAM 과 Cytotoxicity 를 고려한 battery system 으로 동물 안점막 자극 시험을 대체할 수 있는 가능성을 보여 주었다. 이런 결과는 시료의 종류 및 동물 개체차를 고려해 볼 때 나타날 수 있는 문제점이지만 추후 보완될 필요성이 있는 것으로 보인다.

HET-CAM test, Cytotoxicity test 와 Draize 법의 각 부위별 correlation

HET-CAM 법과 Draize 법의 각막, 홍채, 결막의 correlation coefficient 는 linear correlation

coefficient 가 1 차 0.602, 0.481, 0.724 였으며 2 차 0.604, 0.567, 0.768 이었다. Rank correlation coefficient 는 1 차 0.542, 0.358, 0.623 이었고 2 차 0.584, 0.476, 0.631 이었다. 이 중 24 시간 결막에 대한 상관성이 0.768 로 가장 높았고, Cytotoxicity 와 Draize 법의 각 부위별 상관관계에서도 각막, 홍채, 결막에 대해 linear correlation 의 경우 0.269, 0.261, 0.311 이었고 rank correlation 의 경우 0.669, 0.576, 0.793 의 상관성을 보여 역시 결막에서 가장 높은 상관성을 보였다(Table 3). 이런 결과는 대부분의 물질이 결막에 대해 반응을 보이지만 특별히 각막이나 홍채에 대해서만 반응을 나타내지 않기 때문인 것으로 생각된다.

HET-CAM test 의 Interlaboratory Validation Study

모두 6 개의 국내 장업사 실험실(A ~ F)에서의 HET-CAM test 결과를 취합하여 각각 두 실험실 간의 결과를 각각 linear correlation 및 rank correlation 을 구하여 각 실험실간의 상관관계를 분석하였다(Table 1).

Linear correlation coefficient 분석 결과를 보면 전반적으로 상관관계가 0.589 ~ 0.954 의 범위였으며, 특히 A사와 B사 사이의 경우 0.954 이었으며, E사와 F사 사이의 경우 0.942 로 높은 상관관계를 보였다. 그 외에도 A사와 D사 사이의 경우(0.589)와 B사와 D사 사이의 경우(0.638)를 제외하고는 대체로 높은 상관관계를 나타내었다(Table 4, Table 5). 장업사 사이의 상관성은 1 차 validation 에서 보다 2 차 validation 에서 좋아지고 있지만 A와 D 그리고 A와 E 간에는 오히려 상관성이 나빠졌다. 이러한 영향을 주는 중요한 요인은 유정란의 종류, 반응관찰의 숙련도가 있고 이외에도 유정란의 무게, 유정란 보관온도 및 시간, vehicle 의 종류 등이 있다. 앞으로 이런 실험에 영향을 줄 수 있는 요소에 대해 보완한 뒤 보다 상관성 있는 HET-CAM data 가 나오고 안점막자극 대체시험법으로써 HET-CAM 자체만으로 부족한 부분을 다른 대체 시험법으로 보완될 수 있는지, 그리고 이런 battery system 으로 안점막 자극 시험을 대체할 수 있는지 검토되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Atterwill C. K. and Steele C. E. (Editors). (1987) *In Vitro Methods in Toxicology*. Cambridge University Press, Cambridge
2. Borenfreund E. and Borrero O. (1984) *In Vitro* Cytotoxicology assays. Potential Alternatives to the Draize Ocular Irritation Test. *Cell Biol. Toxicol.* 1, 55-65
3. Borenfreund E. and Puerner J. A. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alternations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.* 24, 119-124
4. Guillot R. (1992) Ocular irritation: Present cell culture models and perspectives. *ATLA* 20, 471-475
5. Leupke N. P. (1985) Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* 23, 287-291
6. Reinhart C. A., Bossard E. and Schlatter C. (1985) Irritation testing of skin and mucous membranes. *Fd Chem. Toxic.* 23, 135-138
7. Wilcox D. K. and Bruner L. H. (1990) in vitro alternatives for ocular safety testing; an outline of assays and possible future developments *ATLA*18, 117-128
8. W. Steiling, M. Bracher, P. Courtellemont, O. de Silva. (1999) The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. *Toxicology In Vitro*, 375-384

Table 1. List of the co-operating organization for validation

Cosmetic industry corporation

주식회사 나드리 화장품

주식회사 보령 메디앙스

주식회사 LG 화학

주식회사 코리아나 화장품

주식회사 태평양

주식회사 한국 화장품

Table 2. List of the test substances and their characteristics

Sample No..	Test substances(Abbreviation)	Concentration	Classification	Nature	pH
S-1	Sorbitanpolyoxyethylenemonolaurate 20(Tween 20)	100 %	Nonionic SAA*	Liquid solution	4.7
S-2	Sorbitanpolyoxyethylenemonolaurate 80(Tween 80)	100 %	“	“	4.7
S-3	Sorbitanpolyoxyethylenemonolaurate 85(Tween 85)	100 %	“	“	4.5
S-4	Polyoxyethylene(10)nonylphenyl ether (Emalex NPL-10)	20 %	“	“	6.42
S-5	Polyoxyethylene(15)nonylphenyl ether (Emalex NPL-15)	20 %	“	“	5.8
S-6	Polyoxyethylene(10)octylphenyl ether (Emalex OP-10)	20 %	“	“	6.3
S-7	Polyoxyethylene(12)nonylphenyl ether (Emalex NP-12)	20 %	“	“	4.92
S-8	Sodium Lauryl sulfate(SLS)	10 %	Anionic SAA	“	4.92
S-9	Sodium laureth[3] sulfate(SLES)	10 %	“	“	3.2
S-10	Ammonium laureth[3] sulfate(ALES)	10 %	“	“	4.85
S-11	α -olefin sulfonate(AOS)	10 %	“	“	11.21
S-12	Sodium cocoyl glutamate (Amisoft CS-11)	10 %	“	“	5.64
S-13	Polyoxyethyleneoctylphenol (Triton X-100)	10 %	Nonionic SAA	“	6.2
S-14	Benzalkonium chloride(BKC)	10 %	Cationic SAA	“	5.5
S-15	Polyoxyethylene 23 lauryl ether (Brij 35)	20 %	Nonionic SAA	“	4.2
S-16	Propylene glycol(PG)	30 %	“	“	6.28
S-17	Polyethylene glycol 400 (PEG 400)	30 %	“	“	7.09
S-18	Triethanolamine(TEA)	10 %	Anionic SAA	“	10.4
S-19	Sodium lactate(SL)	20 %	“	“	7.97
S-20	Ethanol	30 %	Alcohol	“	6.2

Table 3. Correlation between the HET-CAM test, Cytotoxicity test and Draize eye irritation test

		Draize Eye Irritation				
		MMAS ^a	MAS ^b	Cornea	Iris	Conjunctiva
Linear Correlation Coefficient						
HET-CAM test (Q)	1 차	0.71541	0.720	0.602	0.481	0.724
	2 차	0.740	0.747	0.604	0.567	0.768
Cytotoxicity test (LC ₅₀)	NIH-3T3 1 차	-0.386	-0.415	-0.357	-0.346	-0.407
	NIH-3T3 2 차	-0.289	-0.315	-0.269	-0.261	-0.311
	HaCaT 1 차	-0.317	-0.347	-0.295	-0.287	-0.344
Rank Correlation Coefficient						
HET-CAM test (Q)	1 차	0.659	0.623	0.542	0.358	0.623
	2 차	0.754	0.657	0.584	0.476	0.631
Cytotoxicity test (LC ₅₀)	NIH-3T3 1 차	-0.766	-0.788	-0.741	-0.730	-0.709
	NIH-3T3 2 차	-0.792	-0.818	-0.669	-0.576	-0.793
	HaCaT 1 차	-0.873	-0.884	-0.741	-0.638	-0.856

^a, modified maximum average score

^b, maximum average score

Table 4. Correlation of the HET-CAM results between six laboratories (Pearson's linear)

A. 1-st validation

Correlation Coefficient (Linear)						
Labs.	A (↔)	B (↔)	C (↔)	D (↔)	E (↔)	F (↔)
A (↔)	1.000					
B (↔)	0.797	1.000				
C (↔)	0.755	0.797	1.000			
D (↔)	0.840	0.547	0.513	1.000		
E (↔)	0.933	0.771	0.786	0.880	1.000	
F (↔)	0.891	0.800	0.884	0.763	0.946	1.000

B. 2-st validation

Correlation Coefficient (Linear)						
Labs.	A (↔)	B (↔)	C (↔)	D (↔)	E (↔)	F (↔)
A (↔)	1.000					
B (↔)	0.954	1.000				
C (↔)	0.891	0.917	1.000			
D (↔)	0.589	0.638	0.726	1.000		
E (↔)	0.810	0.769	0.802	0.848	1.000	
F (↔)	0.852	0.802	0.816	0.798	0.942	1.000

Table 5. Correlation of the HET-CAM results between six laboratories (Spearman's rank)

A. 1-st validation

Correlation Coefficient (rank)						
Labs.	A (주)	B (주)	C (주)	D (주)	E (주)	F (주)
A (주)	1.000					
B (주)	0.293	1.000				
C (주)	0.091	0.226	1.000			
D (주)	0.646	0.028	0.436	1.000		
E (주)	0.642	0.111	0.538	0.938	1.000	
F (주)	0.599	0.192	0.489	0.783	0.899	1.000

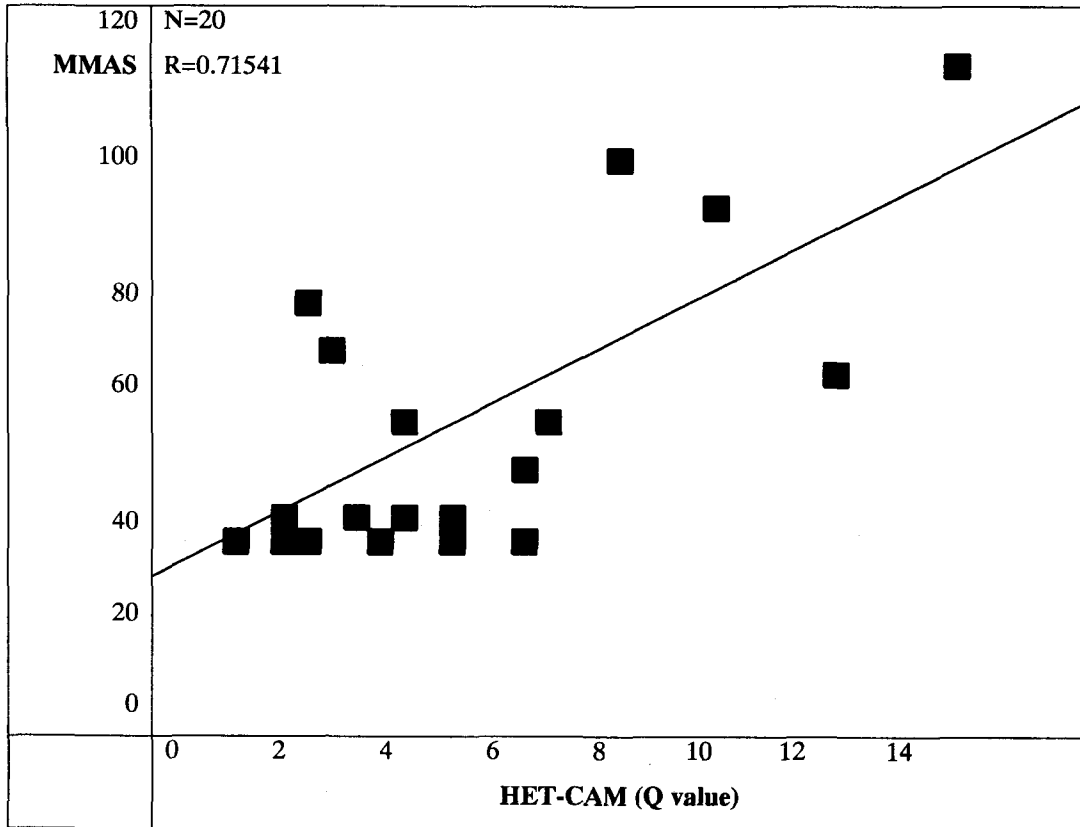
B. 2-st validation

Correlation Coefficient (rank)						
Labs.	A (주)	B (주)	C (주)	D (주)	E (주)	F (주)
A (주)	1.000					
B (주)	0.566	1.000				
C (주)	0.707	0.261	1.000			
D (주)	0.945	0.568	0.755	1.000		
E (주)	0.884	0.573	0.859	0.915	1.000	
F (주)	0.795	0.573	0.851	0.860	0.946	1.000

Table 6. Correlation of the interlaboratory cytotoxicity results

Correlation Coefficient (Linear)			
Cell lines	NIH-3T3 1 차	NIH-3T3 2 차	HaCaT 1 차
NIH-3T3 1 차	1.000		
NIH-3T3 2 차	0.648	1.000	
HaCaT 1 차	0.585	0.953	1.000

A. 1-st validation



B. 2-nd validation

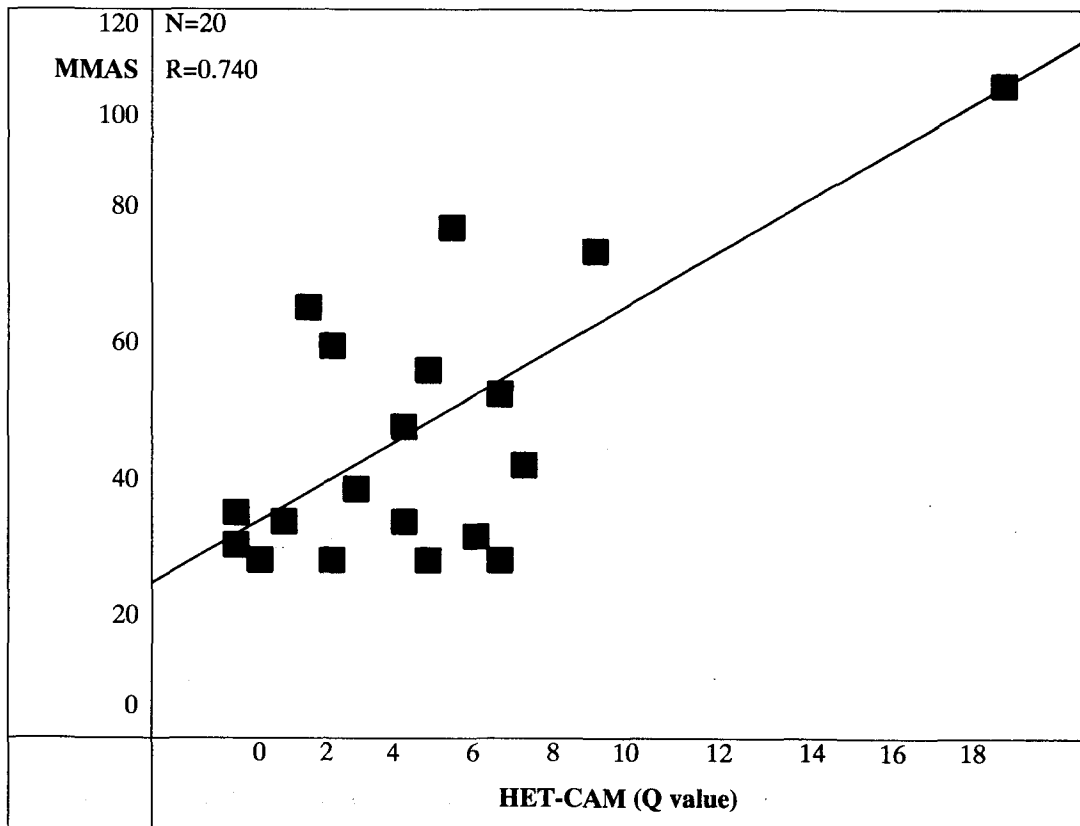
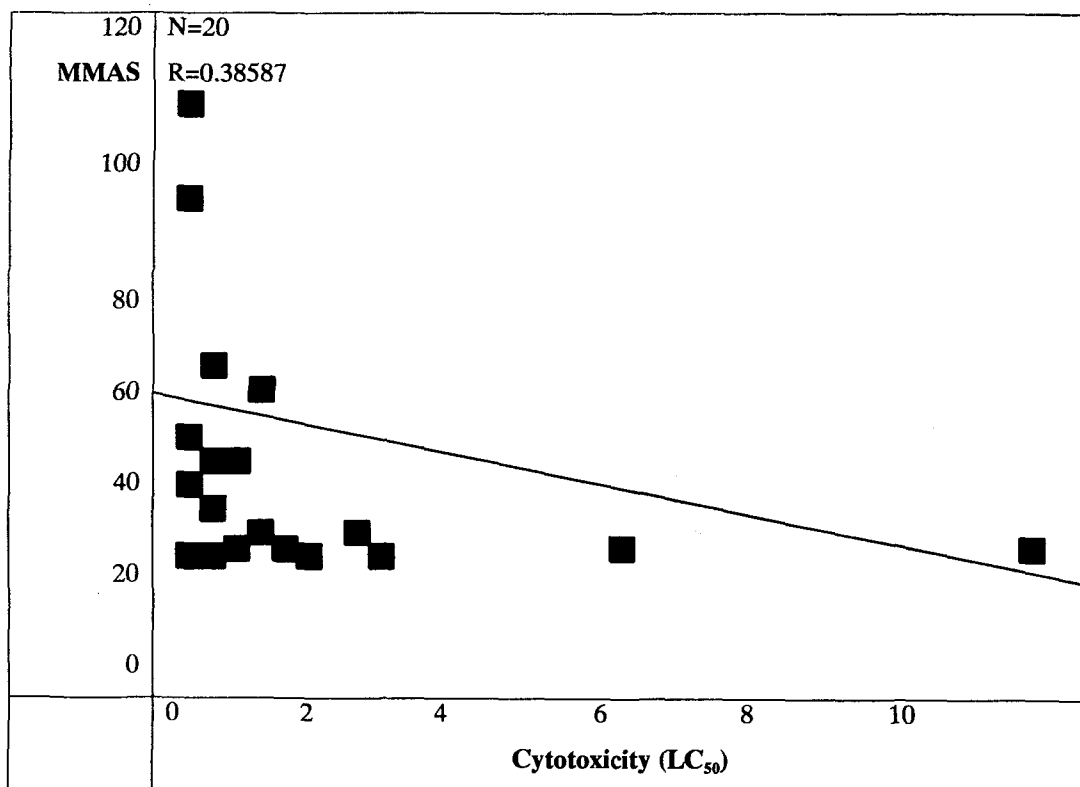


Figure 1. The relationship between the HET-CAM test score and modified maximum average score (MMAS) of Draize eye irritation.

A. 1-st validation



B. 2-nd validation

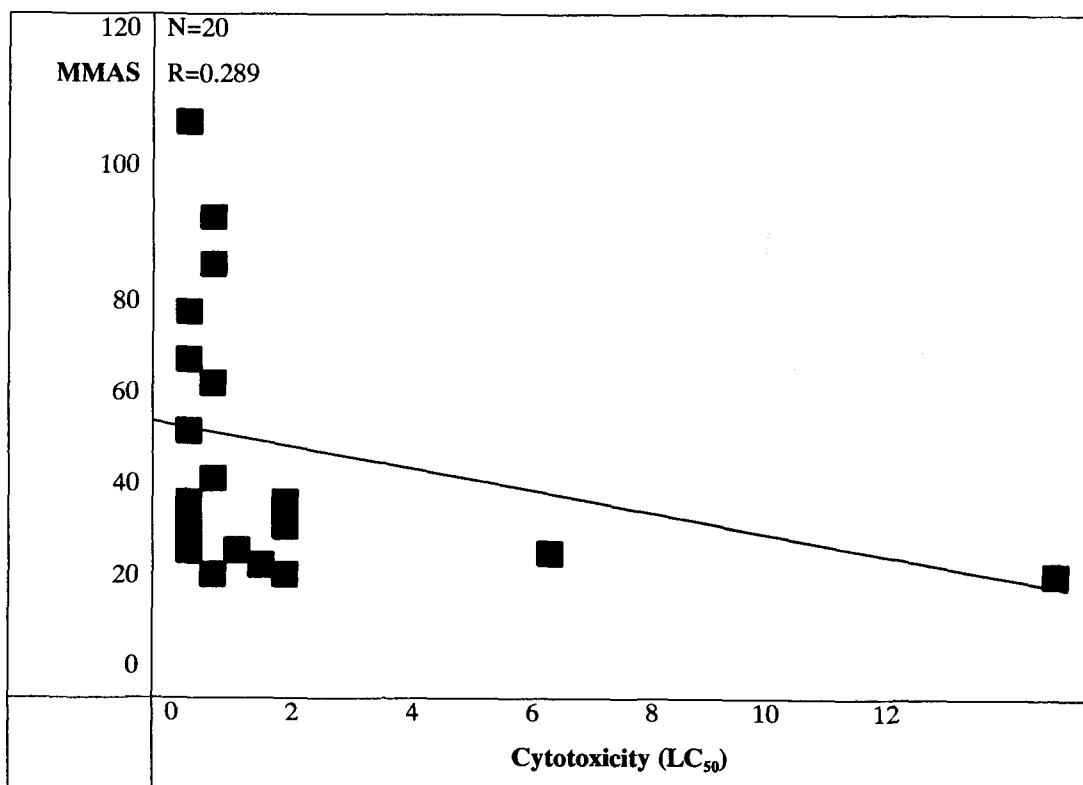


Figure 2. The relationship between the cytotoxicity test score and modified maximum average score (MMAS) of Draize eye irritation.