

인공피부를 이용한 피부자극 대체시험법 소개

김 배 환[†]

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

The introduction of alternative method of reconstructed human skin equivalents for the assessment of skin irritation

Kim, Bae-Hwan

Dept. of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University

Abstract

Because many materials for skin application can induce the skin irritation, we should evaluate the primary skin irritation test. Recently, several alternative in vitro methods to Draize skin irritation test using rabbits have been developed. The most promising alternative method for skin irritation is the using of reconstituted human skin equivalent model(RhE). In this study, we introduce the development status of RhE model, principle and procedure of test method, and validation method. Further studies are in progress to improve the test protocols and the validation studies for KeraSkinTM developed by Korea in order to be certified internationally.

Keywords: Skin irritation, Alternative method, RhE, KeraSkin

[†] 교신담당저자: 김배환

• 접수일자 : 2011년 2월 7일

E-mail: kim9399@kmu.ac.kr

• 수정일자 : 2011년 4월 30일

Tel: 053-580-5933

• 게재 확정일자 : 2011년 5월 4일

I. 서론

여러 화장품이나 연고제 등의 피부용 의약품은 피부접촉에 의해 피부자극을 일으킬 수 있기 때문에 이에 대한 안전성 평가는 필수적이다. 그러나 최근 동물실험에 대한 윤리적인 개념이 강화되어 지고 있어, 화장품 분야의 안전성 평가부분에 대한 동물실험이 우선적인 타겟이 되어지고 있는 실정이다. 특히 2009년 화장품원료에 대한 동물실험 전면 금지에 대한 규정이 EU연합을 중심으로 전세계적으로 퍼져 나가고 있는 추세이기 때문에 (7th Amendment to the EU Cosmetics Directive), 화장품 안전성 평가의 중요한 분야인 국소독성 시험법에 대한 대체시험법 개발은 가장 시급한 사안으로 떠오르고 있다(Robinson et al, 2002). 동물대체법(alternative methods to animal studies)이란 개념은 미지물질의 인간에 대한 유해영향을 예측하기 위해, 시험대상으로 whole body로서의 포유동물을 사용하지 않고 생물재료 또는 비생물재료를 주로 사용하는 것을 일컬으며 (Hofer et al, 2004), 동물의 수나 고통의 감소하는 것도 포함하고, Russell과 Burch(1959)가 1959년 제안한 3R(replacement, reduction, refinement) 개념에 기초를 두고 있다.

피부자극의 평가는 Draize(1959)에 의해 개발되어 지금까지도 유용한 방법으로 사용되어 지고 있으나, 이 방법은 토끼 등의 동물에게 고통을 초래할 수도 있고, 또한 최근 유럽을 중심으로 화장품 안전성 평가분야의 시급한 대체시험법 연구분야로 떠오르고 있는 국소독성 시험법의 대표적인 방법이기 때문에 이 연구분야 중 중요도가 가장 크다고 할 수 있다.

현재 많은 연구를 통해 몇몇의 유용한 대체시험 방법이 최근 OECD guideline(2010)에 등재되어지

고 있지만, 아직 동물실험 및 임상결과와의 상관성이 높은 시험법으로 등록되기 위해서는 진행되어야 할 validation 과정이 많이 남아 있다.

이미 유럽은 ECVAM(European Center for the Validation of Alternative Methods)을 중심으로 새로운 대체시험법 개발, validation 및 시험법 등록에 많은 비용을 투자하고 있으며(Zuang et al, 2002), 미국은 NICEATM (The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)과 ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)을 중심으로, 일본은 JACVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods)을 중심으로 대체시험법 개발에 박차를 가하고 있는 실정이다. 우리나라도 늦었지만 2009년 11월 3일에 KoCVAM (Korean Center for the Validation of Alternative Methods)을 설립하여 새로운 대체시험법 연구, validation 및 시험법 등록을 위해 박차를 가하고 있다.

피부일차자극 시험의 대체시험법으로 가장 많은 연구가 되어지고 있는 부분은, 사람 피부의 표피를 이루는 주요 세포인 각질세포(keratinocytes)를 air-liquid interphase에서 분화유도시킴으로써 3차원적으로 사람의 표피를 재구성한 인공피부모델 (RhE, Reconstituted human skin equivalent model)을 이용한 방법인데, 대체시험법으로서의 가능성은 가장 높다고 보고 되고 있다(Fentem et al, 2001). 이미 ECVAM에서는 EPISKIN™, EpiDerm™, SkinEthic™ 등과 같은 인공피부모델에 대한 다양한 validation 연구를 통해 피부자극 대체법으로서의 유용성을 인증하여 OECD guideline에 등재하고 있다. 미국이나 일본에서도 많은 인공피부모델이 다양한 validation을 통해 그

유용성을 인정해 나가고 있는 실정이지만, 아직 국내 연구는 이제 시작단계에 있다고 할 수 있다. 그러나 국내에서도 최근 (주)엠씨티티의 KeraSkin™ 이나 (주)태고사이언스의 NeoDerm 등의 모델이 개발되어 활발한 연구가 진행되고 있다. 본 논문에서는 토끼를 이용한 피부일차자극시험법인 Draize 방법을 대체할 수 있는 인공피부모델에 대한 세계적인 모델들과 국내 연구동향을 소개하고 평가 방법에 대해 간단히 소개하는 것을 목적으로 하였다.

II. 피부자극 평가시험법의 현황

1. 토끼를 이용한 피부일차자극 평가

토끼를 이용한 피부일차자극시험 평가방법은 OECD guideline(TG 404)(1992)에도 명시되어져 있고, 국내 식품의약품안전청 「의약품등의 독성 시험기준」(고시 제 2009-116호)에도 명시되어져 있으며, 간단한 시험방법은 다음과 같다.

토끼(New Zealand White rabbit)의 등부위 털을 가로세로 약 10 cm 정도의 크기로 제모한 후 척추를 중심으로 왼쪽은 시험물질 적용부위, 오른쪽은 대조물질 적용 부위로 하고, 각 적용부위는 찰과 부위와 비찰과 부위를 두어 실험을 실시한다(Fig. 1). 시험물질은 적절한 농도로 조제하여 각 부위당 0.5 ml씩 도포하여 24시간 폐쇄접촉한다. 시험물질 적용부위는 24시간째와 72시간째에 관찰을 하며 피부반응의 평가는 「의약품등의 독성시험기준」(식품의약품안전청고시 제 2009-116호)의 “피부반응의 평가기준”에 따라 평점으로 평가하여, 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize(1959)의 P.I.I. (Primary Irritation Index)의 산출 방법에 따른다

(Table 1).

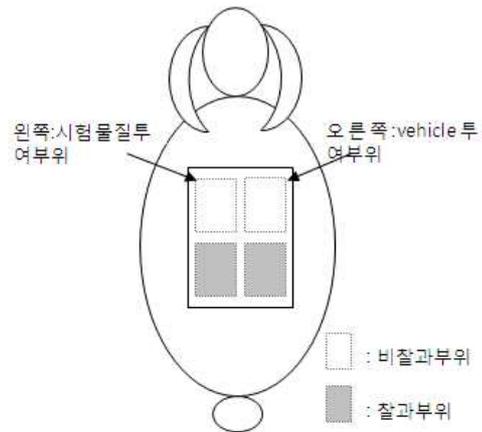


Fig. 1. The test sites of NZW rabbit

Table 1. The criteria of primary skin irritation test

홍반 및 기피형성		
홍반이 전혀 없음		0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 겨우 식별할 정도)		1
뚜렷한 홍반		2
약간 심한 홍반		3
심한 홍반 (심한 발적)과 가피 형성		4
부종 형성		
부종이 전혀 없음		0
아주 가벼운 부종 (육안으로 겨우 식별할 정도)		1
경증의 부종		2
(뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 구별될 경우)		
중증의 부종 (약 1mm 정도 부어올랐을 경우)		3
심한 부종 (1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 경우)		4
안전성	피부일차자극지수(P.I.I.)*	판정
0 -0.50	Non irritant (무자극)	사용가능
0.51-2.00	Mildly irritant (경자극)	사용농도조정
2.01-5.00	Moderately irritant (중자극)	사용불가
5.01 이상	Severely irritant (강자극)	사용불가

*P.I.I.: Primary irritation index, $\frac{\sum \text{Total Score of erythema and edema}}{(\text{Animal No.} \times 4)}$

2. 피부자극시험의 대체법 연구현황

초기의 피부자극의 대체 시험법은 마우스의 피부의 integrity를 평가하는 방법이 많이 활용되어져 왔는데, 피부 각질층의 integrity를 평가하는 방법으로는 표피수분손실량(TEWL, trans-epidermal water

loss)과 표피의 전기저항성(TER, transcutaneous electrical resistance)을 평가하는 방법이 사용되어졌다.



Fig. 2. The picture of Tewameter(A), Vapometer(B) and Electrical resistance system(C)

TEWL 방법은 Tewameter (Fig. 1-A)나 Vapometer (Fig. 1-B)를 이용하여 피부에서 수분의 증발량을 측정하는데 손실된 피부 일수록 수분 증발량은 증가하게 된다(Ostacolo et al, 2007). TER 방법은 피부가 손상되면 전기 저항성이 떨어진다는 원리를 이용하여 피부의 손상여부를 장치(Fig. 1-C)를 이용하여 평가하는 방법이다(Lewis and Basketter, 1995). 이 두 방법은 아직도 피부상태를 평가하는 방법으로 많이 활용되고는 있지만 정확성이 그다지 높지 않다는 이유로 최근에는 피부자극시험을 대체할 수 있는 방법으로까지는 고려되지 않고 있다. 그러므로 최근에는 사람 표피 유래의 세포로 만들어진 인공피부를 이용한 평가방법이 가장 많이 사용되어지고 있는 추세이다(Alépée et al, 2010).

3. 인공피부 모델의 원리

사람 피부의 표피를 이루는 주요 세포인 각질세포(keratinocytes)를 air-liquid interphase에서 분화유도시킴으로써 3차원적으로 사람의 표피를 재구성하여 만든 모델이 인공피부모델(Reconstituted human skin equivalent model)이다. 인공피부모델이 되기 위해서는 정상적인 사람의 피부에서 보여지는 표피의 5개층(Stratum of basale, spinosum, granulosum, lucidum and corneum)의 분화가 관찰되어야 하며, 외부 물질에 대해 기능적으로 방어할수 있는 능력을 가져야만 된다(Fig. 3). 이와 같은 성질은 인공피부모델의 quality control (QC) 평가시 고려되어진다.

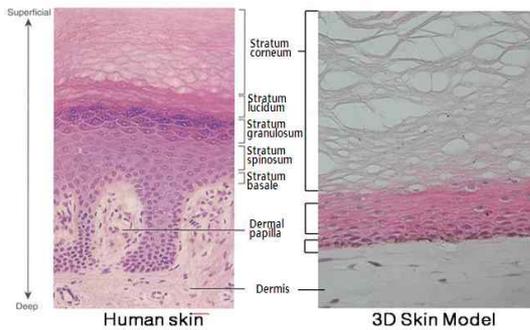


Fig. 3. The structural comparison of human skin and 3D cultured reconstituted human skin equivalent model

III. OECD guideline TG 439에 의한 인공피부모델 시험법 소개

1. 시험법 판정의 기본원칙

OECD guideline TG 439에서는 인공피부를 이용한 피부일차자극 시험을 수행함에 있어 기본적인 원칙을 제시하고 있다. 시험물질 한 농도당 적어도 3개의 cell을 사용하여 인공피부 위쪽 표면에 도포하여야 하며, 시험물질 처치시 세포에 충분히 적용되도록 하기 위해서는 최소 $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 정도는 처치하여야 하고, 고체인 물질을 처치할 경우에는 증류수를 이용하여 습윤시켜 주어야 한다. 시험물질 처치 시간은 15분~60분 정도 되도록 하고, 배양 온도는 $20\sim 37^\circ\text{C}$ 가 유지되도록 하며 시험물질 처치시 반드시 양성대조물질과 음성대조물질 군을 두어야 한다. 시험물질 처치 후 배양을 할 경우 42시간 동안 하도록 권장하고 있으며, 후배양후 세포활성은 MTT assay를 실시하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포활성도가 50% 이하일 경우 자극성 있는 물질로 평가하도록 하고 있다.

2. 세포 생존을 측정방법(MTT assay)

피부자극시험평가를 위한 인공피부모델의 세포 생존을 측정은 MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue; CAS number 298-93-1, Sigma Co.] assay를 이용한다. Post-incubation을 거친 인공피부를 24 well plate에 옮긴 후 $0.3\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 조제된 MTT를 0.3ml 씩 처리한 후 37°C , 5% CO_2 incubator에서 3시간 동안 배양한다. 배양 후 PBS로 시험물질 적용 시와 동일한 방법으로 3회 세척하고, MTT formazen을 추출하기 위해 isoprophyl alcohol을 2ml 씩 처리하여 2시간 동안 실온에서 교반 후, 추출액을 540nm에서 흡광도를 측정한다(Watanabe et al, 2002).

3. 인공피부의 QC 평가에 필요한 사항

1) Viability: 만들어진 인공피부모델이 시험하기에 적합하도록 세포들이 적정수준 이상으로 생존해 있는지를 평가하는 방법으로 일반적 용매인 PBS를 처치한 후 MTT assay를 실시하여 OD값이 일정 수준 범위내에 존재해야 한다(Table 2).

2) Barrier function: 세포독성이 있는 물질을 적정한 농도나 일정기간 동안 노출 시켰을 때, 인공피부모델이 실제 피부와 같은 방어막 기능을 나타내는지 여부를 알아보기 위한 평가 방법이다. 이때도 역시 세포독성을 MTT assay를 이용하여 평가하며, 측정방법으로는 계면활성제인 SDS (sodium dodecyl sulfate)를 인공피부모델에 18시간동안 처리하여 IC50 (inhibitory concentration, 세포가 50% 생존하는 농도) 수치를 측정하거나,

Triton X-100 1%를 처리하여 ET50 (effective time, 세포가 50% 생존하는 시간)을 측정하여 기준으로 삼는다(Table 3).

Table 2. Acceptability ranges for negative control OD values of commercial RhE kits

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiSkin™	≥0.6	≤1.5
EpiDerm™	≥1.0	≤2.5
SkinEthic™	≥1.2	≤2.5

Table 3. Acceptability ranges for IC50 or ET50 values of commercial RhE kits

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiSkin™ (18 hours treatment with SDS)	IC50 = 1.0mg/ml	IC50 = 3.0mg/ml
EpiDerm™ (1% Triton X-100)	ET50 = 4.8 hours	ET50 = 8.7 hours
SkinEthic™ (1% Triton X-100)	ET50 = 4.0 hours	ET50 = 9.0 hours

3) Morphology: 인공피부모델을 조직처리하여 H&E 염색을 실시하였을 때, 각질층의 5개층이 잘 분화되어져 있는지 여부를 관찰하며, 그 두께를 측정하였을 때 50 μm 이상이 되는지를 확인한다.

4. 새로운 인공피부모델 validation 시험을 위한 performance standards 소개

새로 개발한 인공피부모델이 세계적으로 인정 받는 모델이 되기 위해서는 OECD에서 제시한 기본적인 사항들을 충족시키면서 실험을 실시하여야 하며, 그 외에 다양한 validation 시험을 통하여 정확도가 있음을 제시하여야 한다.

1) 시험물질: 최소한 ECVAM에서 추천된 20개 물질(Table 4)을 이용하여 실험을 실시하여야 한다.

2) 실험실내(within-laboratory) 및 실험실간(between-laboratory) 재현성 실험: 실험실내에서 20개 물질을 이용하여 3회 반복실험을 했을 때, 결과의 재현성이 90%이상으로 평가되어야 하며, 실험실간 재현성은 80% 이상이 일치 하여야 된다.

Table 4. Minium list of reference chemicals for determination of accuracy and reliability values for similar or modified RhE skin irritation test methods

Chemical	CAS Number	Physical state	In vivo score	VRM in vitro Cat.	UN GSH in vivo Cat.
1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	Liquid	0	Cat. 2	No Cat.
diethyl phthalate	84-66-2	Liquid	0	No Cat.	No Cat.
naphthalene acetic acid	86-87-3	Solid	0	No Cat.	No Cat.
allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	Liquid	0.3	No Cat.	No Cat.
isopropanol	67-63-0	Liquid	0.3	No Cat.	No Cat.
4-methyl-thio-benzaldehyde	3446-89-7	Liquid	1	Cat. 2	No Cat.
methyl stearate	112-61-8	Solid	1	No Cat.	No Cat.
heptyl butyrate	5870-93-9	Liquid	1.7	No Cat.	No Cat. (Optional Cat. 3)
hexyl salicylate	6259-76-3	Liquid	2	No Cat.	No Cat. (Optional Cat. 3)
cinnamaldehyde	104-55-2	Liquid	2	Cat. 2	No Cat. (Optional Cat. 3)
1-decanol ²	112-30-1	Liquid	2.3	Cat. 2	Cat. 2
cyclamen aldehyde	103-95-7	Liquid	2.3	Cat. 2	Cat. 2
1-bromohexane	111-25-1	Liquid	2.7	Cat. 2	Cat. 2

2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxy-pyridine HCl	86604-75-3	Solid	2.7	Cat. 2	Cat. 2
di-n-propyl disulphide	629-19-6	Liquid	3	No Cat.	Cat. 2
potassium hydroxide (5% aq.)	1310-58-3	Liquid	3	Cat. 2	Cat. 2
benzenethiol, 5-(1,1-dimethyl-ethyl)-2-methyl	7340-90-1	Liquid	3.3	Cat. 2	Cat. 2
1-methyl-3-piperazine	5271-27-2	Solid	3.3	Cat. 2	Cat. 2
heptanal	111-71-7	Liquid	3.4	Cat. 2	Cat. 2
tetrachloroethylene	127-18-4	Liquid	4	Cat. 2	Cat. 2

VRM, Validated Reference Method; UN GHS, United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals

3) 실험정확도(accuracy) 평가: 민감도(sensitivity)는 reference에서 제시된 자극성 있는 물질이 자극성으로 평가되는 비율을 말하며, 특이도(specificity)는 자극성이 없는 물질이 자극성이 없는 물질로 평가되는 비율을 말한다. 이들 민감도와 특이도의 평균이 실험의 정확도(accuracy)라고 일컬어진다. 20개 물질의 validated reference method(VRM)기준으로 볼 때, 민감도는 80%이상, 특이도는 70%이상, 정확도는 75%이상으로 되어져야 수용기준(acceptance criteria)에 포함된다고 할 수 있다.

IV. 고찰 및 결론

인공피부모델은 피부 각질세포를 배양하여 실험에 사용하기 때문에 kit의 유효기간이 길지 않아 공급받는 즉시 실험을 수행해야 하며, 배달도중 세포에 문제가 생겨 결과를 사용하지 못하는 경우도 종종 발생한다. 그러므로 국내에서 피부일차자극 시험을 수행하기 위해서는 kit를 수입하여 사용하는 것보다 국내에서 개발된 모델을 사용하

는 것이 여러 면에서 이롭기 때문에, 이 모델의 국산화가 절실히 필요하다고 할 수 있다. EU, 미국, 일본의 경우에는 상품화 되어 판매되는 인공피부 모델이 다수 존재하며, 아직까지 국내에서는 validation 수준에 머물러 있지만 (주)엠씨티티의 KeraSkin™이나 (주)태고사이언스의 NeoDerm 등이 활발한 연구가 진행되고 있는 제품이다.

KeraSkin™ 모델의 경우 식약청 과제를 통해 다양한 방법으로 OECD guideline의 performance standard에서 제시된 방법에 맞춰 validation을 진행 중에 있다. 먼저 인공피부모델이 시험에 적합한지 여부를 확인하기 위해 quality control을 점검할 수 있는 기준을 확립해야 하며, 이를 위해 viability, barrier function, morphology 등을 각 batch 마다 확인하여 일정수준의 범주안에 들도록 확인해야 한다. 모델을 만들 때 세포의 배양기간에 따라 너무 짧게 만들어지면 특이도(specificity)가 감소하고, 너무 두껍게 만들어지면 민감도(sensitivity)가 감소하게 되므로 적절한 배양기간을 통해 적합한 범주안에 드는 모델을 만드는 것이 중요하다 하겠다. 기준에 적합한 인공피부모델이 공급되어지면 똑같은 조건하에서 같은 결과도 출되어져야 하기 때문에 시험진행에 적합한 여러 조건이 확립되어져야 하는데, OECD guideline에서 제시한 범주에 벗어나지 않는 조건내에서 시험물질의 처치방법, 처치시간 및 세척방법 등의 조건을 확립해서 이 모델에 맞는 표준작업지침서(SOP, standard operating procedure)를 제시해야 한다.

적절한 SOP와 시험계획서가 작성되면 3개 실험실이 참여하여 OECD가 제시하는 20개 물질에 대해 3번 반복 실험을 통해 재현성과 정확도가 OECD 기준에 적합한지를 확인하여 그 결과가 ECVAM 등의 세계적인 기관들에 의해 인정 되어

지면 공식적인 모델로 인정받게 된다.

20개 물질을 이용한 시험 진행시 양성대조물질로 20% SLS를 음성대조물질로 PBS를 사용하며 (Portes et al, 2002), 자극성의 판정에 유용한 지표로 알려진 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 α 를 함께 측정하면 위음성으로 판정된 물질을 자극성으로 좀 더 정확하게 판정 할 수도 있다(Coquette et al, 2003; Matinez et al, 2006; Tornier et al, 2006). 또한 기존 OECD에 의해 검증된 모델인 EpiDermTM이나 EPISKINTM의 결과와의 비교를 통해서도 그 가능성을 입증해 나가는 것도 좋은 방법이라 할 수 한다.

이와 같이 다양한 시도와 보완을 통해 국내에서도 세계적으로 인정받는 인공피부모델이 개발되어, 피부일차자극 시험의 대체시험법으로 자리 매김 하기를 기대해 본다.

참고문헌

Alépée N, Tornier C, Robert C, Amsellem C, Roux MH, Doucet O, Pachot J, Méloni M, de Brugerolle de Fraissinette A: A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. *Toxicol In Vitro* 24(1):257-266, 2010.

Coquette A, Berna N, Vandenbosch A, Rosdy M, De Wever B, Poumay Y: Analysis of interleukin-1(IL-1) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis or the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicology in Vitro* 17: 311-321, 2003.

Draize JH: 'Appraisal of the safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics - Dermal Toxicity'.

Association of Food and Drug Officials of the United States. pp. 46-59, 1959.

Fentem JH, Briggs D, Chesne C, Elliott GR, Harbell JW, Heylings JR, Portes P, Roguet R, van de Sandt JJM, Botham PA: A prevalidation study on in vitro test for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 15: 57-93, 2001.

Hofer T, Gerner I, Gundert-Remy U, Liebsch M, Schulte A, Spielmann H, Vogel R, Wettig K: Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation. *Arch Toxicol* 78(10):549-64, 2004.

Lewis RW, Basketter DA: Transcutaneous electrical resistance: application in predicting skin corrosives. *Curr Probl Dermatol* 23:243-55, 1995.

Martinez V, Corsini E, Mitjans M, Pinazo A, Vinardell MP: Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro end points as alternatives to the in vitro assays. *Toxicology Letter* 164(3): 259-267, 2006.

OECD Guidelines for the testing of chemicals TG 404; Acute Dermal Irritation/Corrosion (adopted on 17th July 1992), OECD, Paris, France

OECD Guidelines for the testing of chemicals TG 439; In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method (adopted on 22th July 2010), OECD, Paris, France

Ostacolo C, Sacchi A, Bernardi A, Laneri S, Brunetta A, Pantini G: Perfluoropolyether phosphate: skin exfoliation after a topical pre-treatment, TEWL and skin elasticity, by in-vivo non-invasive methods. *Int J Cosmet Sci* 29(5):391-8, 2007.

- Portes P, Grandidier M-H, Cohen C, Rogue R: Refinement of the Episkin protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, *Toxicology in Vitro* 16:765-777, 2002.
- Robinson MK, Cohen C, de Brugerolle de Fraissinette A, Ponc M, Whittle E, Fentem JH: Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food and chemical Toxicology* 40:573-592, 2002.
- Russell WMS, Burch RL: Principle of humane experimental technique. Charles C Thomas, Springfield, 111, 1959.
- Tornier C, Rosdy M, Maibach HI: In vitro skin irritation testing on reconstituted human epidermis: Reproducibility for 50 chemicals tested with two protocols. *Toxicology In Vitro* 20(4):401-416, 2006.
- Watanabe T, Hasegawa T, Takahashi H, Ishibashi T, Itagaki H, Sugibayashi K: Utility of MTT assay in three-dimensional cultured human skin model as an alternative for draize skin irritation test: approach using diffusion law of irritant in skin and toxicokinetics-toxicodynamics correlation. *Pharm Res* 19(5):669-75, 2002.
- Zuang V, Balls M, Botham PA, Coquette A, Corsini E, Curren RD, Elliott GR, Fentem JH, Heylings JR, Liebsch M, Medina J, Roguet R, van de Sandt JJM, Wiemann C, Worth AP: Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. *ATLA* 30:109-129, 2002.