

# 화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(IV)

- 피부감작성 -  
skin Sensitization

DA법을 이용한 국소림프절시험  
(Local Lymph Node Assay: DA)

ELISA법을 이용한 국소림프절시험  
(Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA)

2013.03.

# 서론

## 1. 배경

가. 화장품 안전성 평가에 있어 국제적으로 동물대체시험법의 요구가 높아지고 있으며, 유럽에서는 화장품 안전성 평가 시 동물실험을 금지시키는 법안이 통과됨

나. 화장품 산업이 급속하게 과학화, 국제화가 추진되고 있어 화장품에 대한 과학적이고 효율적인 안전성 평가방법 가이드라인이 요구됨.

다. 이에 따라 화장품의 안전성 평가 시 국제적으로 대두되고 있는 동물대체시험법을 고려하여 동물대체시험법에 대한 가이드라인을 제정하고자 함.

## 2. 목적

가. 국제적 추세에 맞는 과학적이고, 객관적인 동물대체시험법을 제시함으로써 화장품 안전성 평가에 기여하고,

나. 표준화된 동물대체시험법 가이드라인의 제시로 화장품업계 및 독성시험 연구기관의 국제 경쟁력을 향상시키고자 함.

# 제1장 DA법을 이용한 국소림프절시험

Local Lymph Node Assay: DA

## I. 개요

1. 마우스를 이용한 피부감작성 시험인 국소림프절시험(Local Lymph Node Assay, LLNA)은 2002년 OECD에 의해 가이드라인으로 채택되었다.(1) LLNA는 방사선 동위원소인 티미딘(thymidine) 또는 요오드(iodine)를 사용하여 림프세포 증식을 측정하는 방법으로 방사능 물질의 획득, 사용, 폐기를 위한 별도의 시설이 필요하다는 제한점이 있었다.

2. Daicel Chemical Industries, Ltd에서 개발한 DA법을 이용한 국소림프절시험법(LLNA:DA)은 LLNA를 변형한 시험법으로 bio-luminescence법을 이용한 ATP(adenosine triphosphate) 정량을 통해 림프세포 증식을 측정한다.

3. 이 시험법은 동물을 이용하는 시험이나 기존 시험법에 비해 사용동물 수가 적고, 동물에 가해지는 고통을 경감시킨 시험법이라는 장점이 있다.

4. 이 시험법은 기존의 LLNA와 같이 피부감작성 반응 중 유도기(induction phase)에 나타나는 반응을 측정한 시험법으로 용량반응평가에 적절한 정량적 자료를 제공한다. 또한 방사성동위원소를 사용하지 않고 피부감작성을 확인하기 때문에 실험자가 방사성 동위원소에 노출될 가능성이 없으며, 방사성폐기물을 발생시키지 않는다는 장점이 있다.(10).

## II. 용어정의

1. 정확성(Accuracy) : 측정치가 참값에 근접해 있는 정도
2. 기준물질(Benchmark substance) : 이 물질은 비교의 기준으로 사용한다. 기준물질로 갖춰야 할 속성은 다음과 같다. (i) 반응의 일관성 (ii) 구조적, 기능적 유사성 (iii) 물리·화학적 특성 (iv) 효과 입증 자료 (v) 충분한 효력
3. 위음성(False negative) : 양성물질이 음성으로 판정되는 것
4. 위양성(False positive) : 음성물질이 양성으로 판정되는 것
5. 위해성(Hazard) : 인체 또는 생태학적으로 위해를 가할 수 있는 가능성. 위해는 충분한 수준에 노출되었을 때만 나타남
6. 실험실간 재현성(Inter-laboratory reproducibility, Between-laboratory reproducibility) :

다른 실험실에서 동일한 시험절차와 시험물질로 시험을 수행하였을 때 양적 또는 질적으로 유사한 결과를 생산할 수 있는지 측정하는 것으로서 시험법이 시험실간 전수될 수 있는지 여부를 나타내는 것

7. 실험실내 재현성(Intra-laboratory reproducibility, Within-laboratory reproducibility) : 동일한 실험실에서 자격을 갖춘 사람이 다른 시점에서 특별한 시험절차로 같은 결과를 생산할 수 있는 정도

8. 이상치(Outlier) : 집단에서 무작위로 채취한 샘플이 다른 수치와 상당히 다른 값을 보이는 것

9. 신뢰성 보증(Quality assurance) : 시험 수행과 독립된 개인이 실험실 시험 기준, 장비, 기록 보관 절차의 준수에 대한 관련 절차를 평가하는 것

10. 신뢰성(Reliability) : 동일한 시험절차를 사용하여 시험하였을 때 실험실 또는 실험실간 시험법 재현성 정도. 시험실내와 실험실간 재현성을 및 실험실내 반복성으로 평가

11. 피부 감작성(Skin sensitization) : 면역학적 과정으로 감수성 있는 사람이 화학적 항원에 국소적으로 노출되었을 때 나타나며, 화학적 항원은 접촉성 감작성(contact sensitization)을 발병시킬 수 있는 피부 면역반응을 촉발함.

12. 자극지수(Stimulation Index, SI) : 시험물질의 피부 감작 가능성을 평가하기 위해 산출된 값. 용매 대조군과 시험물질 처리군의 증식 정도의 비율.

13. 시험물질 (Test substance) : 단일물질 또는 여러 성분의 복합체(예: 완제품, 처방)로서 이 가이드라인에 따라 시험된 모든 물질.

### III. 유의사항

1. LLNA:DA는 피부감작성물질을 규명하기 위해 LLNA를 변형한 시험법이다. LLNA:DA가 LLNA나 기니픽을 이용한 시험법을 완전히 대체할 수는 없지만 양성이나 음성 결과에 대해서 추가 확인 시험을 수행하지 않아도 된다 (6, 7). 시험 수행에 앞서 시험물질에 대한 모든 자료를 고려해야 한다. 이 자료는 시험물질의 확인, 구조, 물리 화학적 성질, *in vivo* 또는 *in vitro* 독성시험 결과, 구조적으로 유사한 화학물질의 독성 시험 자료 등을 포함한다. LLNA:DA가 시험물질에 적절한 시험법인지와 시험물질

처리농도 선택을 위하여 이 자료를 고려해야 한다.

2. LLNA:DA는 *in vivo* 시험법이지만, 기니픽을 이용한 기존 감작성 시험보다 적은 수의 동물을 사용한다. 또한 LLNA:DA는 기존 기니픽 시험과 다르게 야기(challenge)를 통한 피부 과민반응을 유발하지 않으므로 동물의 고통을 경감시킨 방법이다. 하지만 LLNA:DA의 이런 장점에도 불구하고 기니픽을 이용한 시험을 수행해야하는 경우가 있으며, LLNA의 제한점은 LLNA:DA에도 적용된다. 또한 ATP 수준에 영향을 주거나 정확한 세포내 ATP 측정을 방해하는 물질의 경우 본 시험법을 적용할 수 없다. 이와 같이 알려진 제한점 외에 시험의 정확성에 영향을 줄 수 있는 물질 특성에 대한 고려가 시험 전에 이루어져야 한다. 또한 자극지수(SI, Stimulation Index)가 1.8에서 2.5사이 값을 나타낼 때 결과 해석에 주의해야 한다.  $SI \geq 1.8$ 을 양성판정 기준으로 적용하였을 때 검증연구에 사용된 44개 물질 중 32개의 감작성 물질은 LLNA와 같이 감작성 물질로 판정되었으나, 12개의 비감작성 물질 중 3개는 SI값 1.8과 2.5값 사이 값을 보이며 LLNA와 달리 감작성 물질로 판정되었다 (6). 그러나 SI값을 산출하고 시험법의 정확성을 계산하기 위해 LLNA와 같은 data set을 사용했기 때문에 기술된 결과는 실제 정확성에 비해 과대평가되었을 것이다.

#### IV. 시험원리

LLNA:DA는 감작성 물질이 적용 부위 림프절 내 림프세포 증식을 유도한다는 것을 기본 원리로 한다. 림프세포 증식은 물질의 농도와 감작능에 비례한다. 림프세포 증식은 감작성을 정량적으로 측정할 수 있는 방법이다. 용매 대조군(VC, Vehicle treated control)의 평균 증식 정도를 각 시험군의 평균 증식 정도와 비교하여 림프세포 증식 정도를 측정한다. 각 VC에 대한 시험군의 림프세포 증식 비율을 자극지수(SI)라고 하며,  $SI \geq 1.8$ 이면 감작성 물질로 판정한다. 이 시험법은 bio-luminescence법에 의한 ATP 양 측정을 통해 도포 부위 주변 이개(耳介)림프절(auricular lymph node)내에 증식된 림프세포 수를 평가한다 (11-13). Bioluminescence법은 ATP와 luciferin을 분해하여 빛을 내는 luciferase enzyme을 이용한다. Bioluminescence 반응은 다음과 같다.



방출되는 빛의 세기는 ATP 농도와 비례하며, luminometer를 사용하여 측정한다. Luciferin-luciferase 시험법은 ATP를 정량하는 민감한 방법으로 다양하게 적용된다 (14).

## V. 시험개요

### 1. 동물 종 선택

본 시험법은 마우스를 사용한다. LLNA:DA 검증연구는 LLNA 시험에 선호되는 종인 CBA/J 종으로 수행되었다 (8, 9). 출산 경험이 없고 임신하지 않은 젊은 성체 암컷 마우스를 사용하였다. 시험시작 시 마우스는 8-12주령이어야 하고, 동물의 체중 차이는 최소화해야하며 체중 차이가 평균 체중의 20%를 넘지 말아야 한다. LLNA:DA 반응에서 동물 종이나 성별에 의한 차이가 없다는 것을 증명할 충분한 결과가 있다면 CBA/J 종 대신에 다른 종이나 수컷도 사용할 수 있다.

### 2. 사육조건

마우스는 개별 사육해야하는 충분한 과학적 근거가 없다면 집단 사육한다 (15). 시험동물 사육실의 온도는  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지해야 한다. 상대습도는 최소 30%이상이어야 하며 70%를 넘지 않아야 하지만, 사육실 청소 시 외에는 50-60%로 조절해야 한다. 빛은 인공적으로 조절하며 명/암 주기를 12시간간격으로 설정한다. 일반적인 실험동물용 사료를 사용하며 사료와 물은 자유롭게 공급한다.

### 3. 실험동물 준비

무작위로 선택한 동물은 이표(耳標)외의 방법으로 개별 식별 표시를 하고 실험 환경에 순응시키기 위하여 시험물질 처리 전 최소 5일 이상 순화한다. 모든 동물은 물질 처치 전에 피부 병변 유무를 검사한다.

### 4. 시험물질 조제

고체 시험물질은 시험동물에 적용하기 전에 적절한 용매에 녹이거나 부유시켜야 한다.

액체 시험물질은 농도에 맞게 칭량하거나 희석하여 적용한다. 조제 시험물질에 대한 안정성 자료가 없다면 매일 조제해야 한다.

## 5. 신뢰성 확인

양성대조물질(PC, Positive control)은 본 시험이 적절히 수행되었는지를 확인하기 위하여 사용된다. 실험실의 시험수행 능력을 확인하고 실험실 내외 실험실간 재현성 비교를 위하여 적절한 양성대조물질을 포함하여 실험할 것을 권고한다. 주기적인 양성대조물질 시험 수행에 따른 추가 동물실험을 피하기 위하여 매 실험마다 양성대조군을 포함할 것을 권장한다. 양성대조군은 음성대조군과 비교하여 SI가 1.8이상 증가할 것으로 기대하는 농도에서 LLNA:DA 양성 반응을 야기해야한다. 양성대조군은 과도한 피부자극 또는 전신 독성을 나타내지 않고 재현성 있지만  $SI \geq 10$ 의 과도한 반응을 유발하지 않는 농도를 선택해야 한다. 아세톤:올리브 오일 (4:1, v/v)에 희석한 25% 헥실 신나믹 알데하이드 (CAS No 101-86-0)와 25% 유계놀 (CAS No 97-53-0)을 양성대조물질로 선호하지만 상황에 따라 정확한 판정을 위해 위에 조건에 부합하는 다른 양성대조물질을 사용할 수도 있다.

시험마다 양성대조군을 포함할 것을 권장하지만, 최소 한 달에 한번 이상 정기적으로 시험을 수행하거나 양성대조군에 대한 재현성 있고 정확한 결과를 생산해 낸다는 historical 데이터베이스를 확립하고 있는 실험실에서는 양성대조물질에 대한 주기적 시험(예: 6개월 미만 간격)도 가능하다. 일정 기간 동안 최소 10회의 양성대조물질에 대하여 독립적인 시험을 통한 일관된 양성 결과를 생산함으로써 LLNA:DA에 대한 숙련도를 증명할 수 있다.

LLNA:DA 시험절차를 변경할 때는 적절한 양성대조군이 항상 포함되어야 하고, 변경사항은 반드시 시험 보고서에 기록되어야 한다. 시험법 변경에 따라 양성대조물질에 대한 새로운 historical 데이터베이스 확립이 필요한가를 결정하기 위해서는 변경사항이 이전에 확립된 양성대조물질의 historical 데이터베이스에 미치는 영향에 대하여 고려해야 한다.

시험자가 양성대조군에 대하여 주기적으로 시험수행을 결정할 때에는 양성대조군의 시험 수행 간격 동안 적절한 양성대조군 없이 수행된 시험에서 산출된 음성 결과의 적절성과 수용가능성에 대한 영향을 고려하여야 한다. 예를 들어, 주기적인 양성대조군 시험에서 위음성 결과가 나왔다면, 최근에 양성 결과가 나온 양성대조물질에 대한 시험과



위음성 결과가 나온 양성대조물질에 대한 시험 간격 사이에 수행되고 음성으로 판정된 시험 결과에 대해 의문이 있을 수 있다. 매 실험마다 양성대조물질을 포함할 것인가 양성대조물질에 대한 주기적인 시험을 수행할 것인가를 결정할 때에는 이러한 시험결과에 미치는 영향에 대하여 고려해야 한다. 매 시험마다 양성대조군을 포함하여 수행할 때 더 적은 수의 동물을 사용하는 것을 고려해야 한다. 과학적으로 합당하고 historical 자료로 증명이 가능하면 양성대조군은 적은 수의 마우스를 사용하여 실험할 수 있다 (16).

양성대조물질은 일관된 반응을 유발한다고 알려진 용매를 사용하여 시험을 수행해야 하지만, 규제 상황에 따라 다른 용매를 이용한 실험이 요구될 수도 있을 것이다 (17). 만약 양성 대조물질을 시험물질과 다른 용매에 녹여 시험을 수행하였다면 양성대조물질에 대한 별도의 용매 대조군을 시험에 포함시켜야 한다.

특정한 화학 분류나 반응범위의 시험물질을 평가할 경우, 기준 시험물질은 해당 시험이 대상물질과 유사한 종류의 물질의 피부감작성을 평가하는데 적절하다는 것을 증명하는데 유용할 것이다. 적절한 기준 물질은 다음과 같은 특성을 가져야 한다.

- 구조적과 기능적으로 시험물질 군과 유사할 것
- 물리적/화학적 특성이 알려져 있을 것
- LLNA:DA 시험자료가 있을 것
- 다른 동물 모델이나 인체 시험 자료가 있을 것

## VI. 시험방법

### 1. 동물 수와 농도

최소한 군당 4마리 동물을 사용하고 시험물질군과 용매만을 처리한 음성대조군, 양성대조군을 포함하여 실험한다. 양성대조군은 실험실내 규정에 따라 매 시험마다 수행하거나 주기적으로 실험을 실시할 수 있다. 다양한 농도의 양성대조군에 대하여 시험을 할 것인가를 고려해야 하며, 특히 양성대조군에 대하여 간헐적으로 시험을 할 때 이를 고려해야한다. 대조군의 동물은 시험군과 동일하게 다루어야 한다.

시험물질 농도와 용매는 참고문헌(2, 18)에 근거하여 선택하여야 한다. 농도는

100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 등의 농도에서 연속되는 농도를 선택해야 한다. 농도 선택 시에는 충분한 과학적 근거가 수반되어야 한다. 최고 농도는 전신독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하는 농도를 피해야하기 때문에 시험물질 농도 선택 시 물질에 대한 모든 독성학적, 구조적, 물리화학적 정보를 고려해야하며(18, 19) 이런 정보가 없을 때에는 예비실험이 필요할 것이다.

용매는 시험결과에 영향을 주지 않고, 용해도가 가장 높은 용매를 선택하여야 한다. 아세톤:올리브 오일 (4:1 v/v), N,N-디메틸포름아마이드, 메틸에틸케톤, 프로필렌글라이콜과 디메틸 설펡사이드를 용매로 권장하며, 충분한 과학적 근거가 있다면 권장하는 용매 외에 다른 용매도 사용할 수 있다 (5). 어떤 경우 시험물질의 임상시험에서 사용하는 용매나 시험물질의 판매에 사용되는 상업적 조성물을 추가 대조군으로 두고 시험을 수행할 필요가 있다. 1% Pluronic<sup>®</sup> L92와 같은 가용화제가 포함된 용매에 녹인 친수성 물질은 도포할 때 피부가 젖고 즉시 스며들지 않기 때문에 특별한 주의가 필요하며, 완전한 수용성 용매는 피해야 한다.

개별 동물에 대한 시험결과를 수집함으로써 동물 간 편차를 평가할 수 있고, 시험물질과 용매대조군간의 차이의 통계학적 비교가 가능하며, 양성대조군에 사용되는 동물 수를 줄일 수 있는지를 평가할 수 있다 (16).

## 2. 예비시험

최고 농도를 결정하기 위한 다른 자료가 없다면, 예비시험을 통해 본 시험 농도를 결정해야 한다. 예비시험은 전신독성이나 과도한 국소 자극을 유발하지 않는 농도에 대한 정보가 없을 때 본 시험 최고 농도를 선택하기 위하여 실시된다. 예비시험에 사용되는 최고 농도는 액체 시험물질일 경우 100%이며, 고체 또는 부유액일 때는 용해되는 최대 농도이다.

예비시험은 본 시험과 동일한 조건으로 수행되지만 림프절 증식 측정은 하지 않으며 군당 동물 수가 적다. 이 가이드라인에서는 군당 한 마리 또는 두 마리 동물을 사용할 것을 제시한다. 매일 모든 동물에 대하여 전신 독성이나 적용부위에 과도한 국소독성이 나타나는 지 관찰해야하며 시험시작 전과 종료 전(Day 8)에 체중을 측정해야 한다. 각 동물의 양쪽 귀를 관찰하고 표 1에 따라 귀 부위의 홍반 반응을 점수화한다 (19). 귀 두께는 thickness gauge (예: digital micrometer 또는 Peacock Dial thickness gauge)를 이용하여 Day 1 (시험물질 적용 전), Day 3 (최초 시험물질 도포 약 48시간

후), Day 7 (시험 종료 24시간 전)과 Day 8에 측정한다. 또한, Day 8에 안락사한 동물의 귀를 편치하여 무게를 측정할 수 있다. 관찰 일에 홍반 점수 (erythema score)  $\geq 3$  이거나 귀 두께 증가율 (ear thickness)  $\geq 25\%$ 이면 과도한 국소 자극으로 판정한다 (20,21). 본 시험의 최고 농도는 예비시험에서 사용된 농도 중 전신독성이나 과도한 국소독성을 유발하지 않은 농도보다 한 단계 낮은 농도를 선택한다.

표 1. 홍반 평가표

평가 기준	점수
홍반이 나타나지 않음 (No erythema)	0
매우 미세한 홍반 [Very slight erythema (barely perceptible)]	1
뚜렷한 홍반 (Well-defined erythema)	2
중등도 이상의 홍반 (Moderate to severe erythema)	3
가피를 형성하는 새빨간 심각한 홍반 [Severe erythema (beet redness) to eschar formation preventing grading of erythema]	4

귀 두께가 25% 증가하는 것과 더불어, 대조군과 비교하여 처리군의 귀 두께가 통계학적으로 유의한 증가하는 것 또한 자극성 판정 지표로 사용할 수 있다 (22-27). 그러나 귀두께 증가가 25%보다 적을 때 통계학적으로 유의하더라도 과도한 국소자극과 관련이 없을 것이다 (23-27).

전신독성을 평가하기 위해 다음의 임상증상을 관찰해야 한다: 신경계 기능 변화 (예: 입모, 운동실조, 진전, 경련); 행동 변화 (예: 공격성, 털손질 행동 변화, 행동의 특이적 변화); 호흡 패턴 변화 (예: 호흡곤란, 헐떡임, 수포음과 같은 호흡 주기와 강도의 변화)와 음수 사료 섭취량 변화. 또한, 무기력 또는 무반응 증상과 통증 반응, Day 1과 Day 8에 측정된 체중의 5%이상 감소와 치사율을 고려해야 한다. 빈사 동물 또는 심한 고통을 느끼는 동물은 인도적으로 안락사 해야 한다 (28).

### 3. 본 시험 일정

시험일정은 다음과 같다:

- Day 1:

개별동물에 표식을 하고 체중을 측정하며 임상 증상을 관찰한다. 1% 라우릴황산 나트륨(sodium lauryl sulfate, SLS) 용액을 붓을 이용하여 마우스 귀 배측 전체에 4~5회 도포한다. SLS 처치 1시간 후 시험물질, 용매, 그리고 양성대조물질을 귀 배측에 각각 25  $\mu$ L씩 적용한다.

- Days 2, 3, 7:

Day 1과 같이 1% SLS를 전처치 하고 시험물질을 도포하는 것을 반복한다.

- Days 4, 5, 6:

시험물질을 처치하지 않는다.

- Day 8:

각 동물의 체중과 관찰된 임상 증상을 기록한다. Day 7째 시험물질을 적용하고 약 24~30시간 후 동물을 안락사 한다. 각 마우스의 이개림프절 (auricular lymph node)를 적출하고, 마우스 별로 PBS (phosphate buffered saline)에서 이후 시험을 수행한다. 림프절의 모식도와 해부학적 위치는 참고문헌에서 확인할 수 있다 (16). 본 시험에서 국소 피부 반응을 더 관찰하기 위해서는 귀의 홍반이나 두께와 같은 지표가 시험 프로토콜에 포함되어야 할 것이다.

### 4. 세포현탁액 준비

각 동물에서 적출한 양쪽 림프절을 두 개의 유리 슬라이드 사이에 넣고 약하게 압력을 가해 으깨어서 단일세포 (LNC; lymph node cell)로 만든다. 조직이 얇게 퍼진 것을 확인 후 슬라이드를 분리한다. 슬라이드 한 쪽은 페트리디쉬에 넣고 다른 한 쪽은 잡아 고정 후 PBS로 세척하면서 cell scraper로 슬라이드에 남아 있는 조직을 긁어낸다. 음성대조군 마우스의 림프절은 작기 때문에 자극지수에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 조심스럽게 조작해야 한다. 총 PBS 1 mL로 두 슬라이드 세척한다. Cell scraper로 페트리디쉬의 LNC 현탁액을 균질화한다. 피펫으로 림프절의 막을 취하지

않도록 주의하면서 LNC 현탁액 20  $\mu$ L를 조심스럽게 취하여 PBS 1.98 mL에 혼합하여 2 mL 시료를 만든다. 각 동물마다 두 개의 시료를 준비한다.

## 5. 세포증식 확인

ATP 측정 키트를 이용한 luciferin/luciferase 방법으로 림프절 내 ATP 양을 증가를 측정한다. ATP 측정 키트는 Relative Luminescence Units (RLU)으로 bioluminescence를 측정한다. 동물에서 ATP 양을 측정까지 걸리는 시간은 동일해야한다. ATP 양은 동물사망 후 점차적으로 감소하므로 사망 30분 이내 ATP 양을 측정해야 한다 (8). 그러므로 사전에 시험에 소요 시간을 확인해야 하며, 이개림프절 채취부터 ATP 측정까지 20분 이내로 완료하여야 한다. 각 동물로부터 만든 2 mL 샘플에서 ATP luminescence를 측정해야한다. 평균 ATP luminescence를 산출하고 자극지수를 구한다.

## VII. 관찰 항목

### 1. 임상증상

각 동물은 적용부위에 국소 자극 또는 전신독성이 나타나는지 최소 하루에 한 번 임상증상을 주의 깊게 관찰해야한다. 모든 관찰사항은 각 동물에 대하여 체계적으로 기록되어야한다. 관찰 계획에는 안락사를 위한 전신독성, 피부의 과도한 국소 자극 또는 부식을 확인하기 위한 기준이 포함되어야 한다 (28).

### 2. 체 중

시험 시작과 부검 전에 개별 동물의 체중을 측정해야한다.

## VIII. 결과 산출

각 시험군의 결과는 평균 자극지수(mean SI)로 표현한다. 자극지수는 시험군과 양성대조군의 평균 RLU(mean RLU/mouse)를 용매대조군의 평균 RLU로 나눈 값이다. 용매대조군의 평균 SI값을 1로 정한다.

$SI \geq 1.8$ 이면 양성으로 간주한다 (6). 그러나 용량-반응 관계가 확실하고 통계학적으로

유의하며 용매대조군과 양성대조군이 일관된 반응을 나타낸다면 경계범위( $1.8 \leq SI \leq 2.5$ )의 결과를 양성으로 판정할 수 있을 것이다 (2, 3, 29).

SI값이 1.8에서 2.5사이의 경계값을 보일 때 시험결과를 양성으로 판정하기 위해서 실험자는 용량-반응관계, 전신 또는 과도한 국소독성 반응, SI값의 통계학적 유의성과 같은 추가적인 정보를 고려해야한다 (6). 또한 알려진 감작성 물질과의 구조적 유사성, 피부자극 유발 정도, 관찰된 용량-반응 관계 등 시험물질의 다양한 특성에 대한 고려도 함께 이루어져야한다. 그 외에 고려사항에 대하여 (4)에 자세하게 논의되어 있다.

개별 동물에 대한 자료를 수집함으로써 용량-반응관계가 존재하는지와 그 정도의 통계학적 분석이 가능하다. 통계학적 평가는 용량-반응관계와 시험군의 적절성(예: 용매대조군에 대한 시험 용량군) 평가를 포함할 수 있다. 용량-반응 관계 평가를 위한 통계학 분석 방법으로는 선형회귀(linear regression), William's test를 사용할 수 있고, 쌍대비교(pair-wise comparison)를 위하여 Dunnett's test를 사용할 수 있다. 적절한 통계학 분석 방법 선택에 있어 자료 변환이나 비모수통계학(non-parametric statistical analysis)이 필요할 수 있는 분산의 부등식이나 다른 관련 문제의 가능성을 항상 인식해야한다. 어떤 경우 "이상치(outlier)"라고 부르는 특정 값을 포함 또는 포함하지 않고 SI 값을 계산하거나 통계학적 분석을 수행할 필요가 있다.

## IX. 자료보고

### 1. 자료

자료는 표 형식으로 요약되어야 하며, 각 동물의 RLU 값, 군별 평균 RLU값과 오차(예: SD, SEM), 용매대조군에 대한 각 시험군의 평균 SI값이 포함되어야 한다.

### 2. 시험보고서

시험보고서에는 다음과 같은 정보가 포함되어야 한다:

#### ○ 시험물질과 대조시험물질

- 물질 식별 정보 (예, CAS 번호, 가능하다면 원료; 순도; 알려진 불순물; lot 번호에

대한 정보);

- 물리적 성질과 물리화학적 특성 (예, 휘발성; 안정성; 용해도);
- 제제물(formulation)형태일 경우, 구성(composition)과 구성요소(component)의 상대적 분율

○ 용매

- 물질 식별 정보 (순도; 농도; 적절성; 사용된 용량)
- 용매 선택의 정당성

○ 시험 동물

- 마우스의 기원
- 동물의 미생물학적 상태
- 동물 수와 연령
- 동물 기원, 사육 환경, 사료 등

○ 시험조건

- ATP 키트의 lot 번호와 제조자의 품질보증(QA; Quality assurance)/품질관리(QC; Quality control) 자료
- 시험물질 제조와 적용에 대한 자세한 사항
- 용량 선택의 정당성 (예비시험 수행 시 예비시험 결과 포함)
- 용매와 사용된 시험물질 농도, 적용된 시험물질 총량
- 사료와 음수 품질에 대한 자세한 정보 (사료 형태/원료, 수원포함)
- 물질 처치와 샘플링의 자세한 일정
- 독성 평가 방법
- 양성 또는 음성으로 고려할 시험 기준 (criteria for considering studies as positive and negative)
- 시험 프로토콜 이탈에 대한 자세한 기록과 이탈이 시험 설계나 시험 결과에 미치는 영향에 대한 구체적인 설명

○ 신뢰성 확인

- 사용된 시험물질, 농도, 용매에 대한 정보를 포함한 신뢰성 확인을 위한 최근 시험 결과 요약
- 시험과 동시에 수행하거나 또는 historical 양성대조군과 음성 대조군 자료
- 양성대조군을 포함하여 시험하지 않았을 경우, 정당성을 뒷받침하기 위한 가장 최근 수행된 양성대조군 결과와 양성대조군의 자세한 historical 자료

○ 결과

- 투여 시작과 부검시점의 개별 동물 체중; 각 투여군의 평균 체중과 오차(예: SD, SEM)
- 투여 부위의 피부 자극을 포함한 개별 동물의 독성 증상과 발현 시점
- 개별 동물의 부검 시점과 ATP 측정 시간
- 개별 동물의 RLU값과 각 시험군의 SI값의 표
- 각 시험군의 RUL/mouse의 평균, 오차와 각 시험군의 이상치 분석 결과
- 시험군과 대조군에서 동물간 편차를 고려한 편차와 SI값
- 용량반응 관계
- 적절한 통계학 분석

○ 결과 고찰

- 시험물질을 피부감작성 물질 또는 비감작 물질로 고려하기 위한 결론과 결과, 용량 반응관계 적절한 통계 분석에 대한 간략한 해설



## 참고문헌

- (1) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem, Toxicol., 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem, Toxicol., 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-333.
- (5) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)
- (6) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]
- (7) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of

Environmental Health Sciences. Available at:  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRRept2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRRept2009.pdf)].

- (8) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
- (9) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
- (10) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (11) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (12) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (13) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (14) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (15) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (16) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC:

National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:  
[[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)]

- (17) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (18) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (19) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at:  
[<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (20) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (21) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:  
[<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (22) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (23) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitization and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (24) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (25) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the

murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

- (26) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (27) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (28) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (29) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

## **제2장 ELISA법을 이용한 국소림프절시험**

Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA

## I. 개요

1. 마우스를 이용한 피부감작성 시험인 국소림프절시험(Local Lymph Node Assay, LLNA; TG429)은 2002년 OECD에 의해 처음 가이드라인으로 채택되었고, 그 이후 한 차례 개정되었다 (1). LLNA 검증과 검토의 자세한 내용은 논문과 보고서의 형태로 발간되었다 (2-9). LLNA는 방사선 동위원소인 티미딘(thymidine) 또는 요오드(iodine)를 사용하여 림프세포 증식을 측정하는 방법으로 방사능 물질의 획득, 사용, 폐기를 위한 별도의 시설이 필요하다는 제한점이 있었다.

2. LLNA:BrdU-ELISA는 LLNA를 비방사선 방법으로 변형한 시험법으로 비방사선 물질인 5-브로모-2-데옥시우리딘 (BrdU) (CAS No 59-14-3)를 ELISA로 측정하여 림프세포 증식을 평가하는 방법이다. (10-12).

3. 이 시험법은 동물을 이용하는 시험이나 기존 시험법에 비해 사용동물 수가 적고, 동물에 가해지는 고통을 경감시킨 시험법이라는 장점이 있다.

4. 이 시험법은 기존의 LLNA와 같이 피부감작성 반응 중 유도기(induction phase)에 나타나는 반응을 측정한 시험법으로 용량반응평가에 적절한 정량적 자료를 제공한다. 또한 방사성동위원소를 사용하지 않고 피부감작성을 확인하기 때문에 실험자가 방사성 동위원소에 노출될 가능성이 없으며, 방사성폐기물을 발생시키지 않는다는 장점이 있다. (13).

## II. 용어정의

1. 정확성(Accuracy) : 측정치가 참값에 근접해 있는 정도
2. 기준물질(Benchmark substance) : 이 물질은 비교의 기준으로 사용한다. 기준물질로 갖춰야 할 속성은 다음과 같다. (i) 반응의 일관성 (ii) 구조적, 기능적 유사성 (iii) 물리·화학적 특성 (iv) 효과 입증 자료 (v) 충분한 효력
3. 위음성(False negative) : 양성물질이 음성으로 판정되는 것
4. 위양성(False positive) : 음성물질이 양성으로 판정되는 것
5. 위해성(Hazard) : 인체 또는 생태학적으로 위해를 가할 수 있는 가능성. 위해는 충분한 수준에 노출되었을 때만 나타남
6. 실험실간 재현성(Inter-laboratory reproducibility, Between-laboratory reproducibility) :

다른 실험실에서 동일한 시험절차와 시험물질로 시험을 수행하였을 때 양적 또는 질적으로 유사한 결과를 생산할 수 있는지 측정하는 것으로서 시험법이 시험실간 전수될 수 있는지 여부를 나타내는 것

7. 실험실내 재현성(Intra-laboratory reproducibility, Within-laboratory reproducibility) : 동일한 실험실에서 자격을 갖춘 사람이 다른 시점에서 특별한 시험절차로 같은 결과를 생산할 수 있는 정도

8. 이상치(Outlier) : 집단에서 무작위로 채취한 샘플이 다른 수치와 상당히 다른 값을 보이는 것

9. 신뢰성 보증(Quality assurance) : 시험 수행과 독립된 개인이 실험실 시험 기준, 장비, 기록 보관 절차의 준수에 대한 관련 절차를 평가하는 것

10. 신뢰성(Reliability) : 동일한 시험절차를 사용하여 시험하였을 때 실험실 또는 시험실간 시험법 재현성 정도. 시험실내와 시험실간 재현성을 및 시험실내 반복성으로 평가

11. 피부 감작성(Skin sensitization) : 면역학적 과정으로 감수성 있는 사람이 화학적 항원에 국소적으로 노출되었을 때 나타나며, 화학적 항원은 접촉성 감작성(contact sensitization)을 발병시킬 수 있는 피부 면역반응을 촉발함.

12. 자극지수(Stimulation Index, SI) : 시험물질의 피부 감각 가능성을 평가하기 위해 산출된 값. 용매 대조군과 시험물질 처리군의 증식 정도의 비율.

13. 시험물질 (Test substance) : 단일물질 또는 여러 성분의 복합체(예: 완제품, 처방)로서 이 가이드라인에 따라 시험된 모든 물질.

### III. 유의사항

1. LLNA:BrdU-ELISA는 피부감작성물질을 규명하기 위한 LLNA를 변형한 시험법이다. LLNA:BrdU-ELISA가 LLNA나 기니픽을 이용한 시험법을 완전히 대체할 수는 없지만 양성이나 음성 결과에 대해서 추가 확인 시험을 수행하지 않아도 된다 (10, 11). 시험 수행 전 시험물질에 대한 모든 자료를 고려해야 한다. 이 자료는 시험물질의 확인, 구조, 물리화학적 성질, *in vivo* 또는 *in vitro* 독성시험 결과, 구조적으로 유사한 화학물질의 독성시험 자료 등을 포함한다. LLNA:BrdU-ELISA가 시험물질에 적절한 시험법인지와 시험물질 처리농도 선택을 위하여 이 자료를 고려해야 한다.

2. LLNA:BrdU-ELISA는 *in vivo* 시험법이지만, 기니픽을 이용한 기존 감작성시험(13)보다 적은 수의 동물을 사용한다. 또한 LLNA:BrdU-ELISA는 기존 기니픽 시험과 다르게 야기(challenge)를 통한 피부 과민반응을 유발하지 않으므로 동물의 고통을 경감시킨 방법이다. LLNA:BrdU-ELISA의 이런 장점에도 불구하고 금속, 계면활성제와 같이 위양성으로 판정하는 특정 피부자극 물질(1)(6), 난용성 시험물질 등은 기니픽을 이용한 시험으로 평가해야한다. 또한 결과에 혼동을 줄 수 있는 물질 군이나 기능기를 포함하는 물질은 기니픽을 이용한 시험이 필요하다 (13)(15). LLNA:BrdU-ELISA에도 LLNA와 동일한 제한점이 적용된다 (10). 시험법의 알려진 제한점 이외에 LLNA:BrdU-ELISA의 정확성을 교란할 수 있는 시험물질은 이 시험법을 적용할 수 없다. 또한 자극지수(SI)가 1.6에서 1.9 사이 값을 나타낼 경우 결과 해석에 주의해야 한다.  $SI \geq 1.6$ 을 양성판정 기준으로 적용하였을 때 검증연구에 사용된 43개 물질 중 32개의 감작성 물질은 LLNA와 같이 감작성 물질로 판정되었으나, 11개의 비감작성 물질 중 2개는 SI값 1.6과 1.9값 사이 값을 보이며 LLNA와 달리 감작성 물질로 판정되었다 (10). 그러나 SI값을 산출하고 시험법의 정확성을 계산하기 위해 LLNA와 같은 data set을 사용했기 때문에 기술된 결과는 실제 정확성에 비해 과대평가되었을 것이다.

#### IV. 시험원리

LLNA:BrdU-ELISA는 감작성 물질이 적용 부위 림프절 내 림프세포 증식을 유도한다는 것을 기본 원리로 한다. 림프세포 증식은 물질의 농도와 감작능에 비례한다. 림프세포 증식은 감작성을 정량적으로 측정할 수 있는 방법이다. 용매 대조군(VC, Vehicle treated control)의 평균증식정도를 각 시험군의 평균증식정도와 비교하여 림프세포 증식을 측정한다. 각 VC에 대한 시험군의 림프세포 증식 비율을 자극지수(SI)라고 하며,  $SI \geq 1.6$ 이면 감작성 물질로 판정한다. 이 시험법은 이개(耳介)림프절(auricular lymph node)내의 BrdU 양을 측정하여 증식 세포 정도를 확인한다. BrdU는 방사선동위원소인 티미딘(thymidine)의 유사체(analogue)로 티미딘과 유사하게 증식하는 세포의 DNA에 결합한다. DNA에 결합한 BrdU는 peroxidase가 표지된 BrdU 특이적인 항체를 이용한 ELISA 방법으로 측정한다. 기질을 넣어주면, 기질은 peroxidase과 반응하여 발색하며 microtiter plate reader기를 이용하여 특정 파장에서 발색정도를 정량한다.



## V. 시험개요

### 1. 동물 종 선택

실험동물로는 마우스를 사용한다. LLNA:BrdU-ELISA 검증연구는 LLNA에 선호되는 종인 CBA/JN 종으로 수행되었다 (10, 12). 출산 경험이 없고 임신하지 않은 젊은 암컷 마우스를 사용하였다. 시험시작 시 마우스는 8-12주령이어야 하고, 동물의 체중 차이는 최소화해야하며 체중 차이가 평균 체중의 20%를 넘지 말아야 한다. LLNA:BrdU-ELISA 반응에서 동물 종이나 성별에 의한 차이가 없다는 것을 증명할 충분한 결과가 있다면 CBA/JN 종 대신에 다른 종이나 수컷도 사용할 수 있다.

### 2. 사육조건

마우스를 개별 사육해야하는 충분한 과학적 근거가 없다면 그룹 사육한다 (16). 시험동물 사육실의 온도는  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지해야 한다. 상대습도는 최소 30%여야 하며 70%를 넘지 않아야 하지만, 사육실 청소 시 외에는 상대습도를 50-60%로 조절해야 한다. 빛은 인공적으로 조절하며 명/암 주기를 12시간간격으로 설정한다. 일반적인 실험동물 사료를 사용하며 사료와 물은 자유롭게 공급한다.

### 3. 실험동물 준비

무작위로 선택한 동물은 이표(耳標)외의 방법으로 개별 식별 표시를 하여 실험 환경에 순응시키기 위하여 시험물질 처리 전 최소 5일간 순화한다. 모든 동물은 물질 처치 전에 피부 병변 유무를 검사한다.

### 4. 시험물질 조제

고체 시험물질은 시험동물에 적용하기 전 적절한 용매에 녹이거나 부유해야 한다. 액체 시험물질은 농도에 맞게 칭량하거나 희석하여 적용해야 한다. 조제 시험물질은 보관이 가능하다는 것을 증명할 안정성 자료가 없다면 매일 조제해야 한다.

## 5. 신뢰성 확인

양성대조물질(PC, Positive control)은 본 시험이 적절히 수행되었는지를 확인하기 위하여 사용된다. 실험실의 시험수행 능력을 확인하고 실험실내와 실험실간 재현성 비교를 위하여 적절한 양성대조물질을 포함하여 실험할 것을 권고하고 있다. 주기적인 양성대조물질 시험 수행에 따른 추가 동물실험을 피하기 위하여 매 실험마다 양성대조군을 포함할 것을 권장한다. 양성대조물질은 음성대조군과 비교 시 SI가 1.6이상 증가할 것으로 기대하는 농도에서 LLNA:BrdU-ELISA 양성 반응을 야기해야한다. 양성대조군은 과도한 피부자극 또는 전신 독성을 나타내지 않고  $SI \geq 14$ 의 과도한 반응을 유발하지 않는 농도를 선택해야 한다. 아세톤:올리브 오일 (4:1, v/v)에 희석한 25% 헥실 신나믹 알데하이드 (CAS No 101-86-0)와 25% 유계놀 (CAS No 97-53-0)을 양성대조물질로 선호하지만 상황에 따라 정확한 판정을 위해 위에 조건에 부합하는 다른 양성대조물질을 사용할 수도 있다.

시험마다 양성대조군을 포함할 것을 권장하지만, 최소 한 달에 한 번 이상 정기적으로 시험을 수행하거나 양성대조군에 대해 재현성 있는 정확한 결과를 생산해 낸다는 historical 데이터베이스를 확립하고 있는 실험실에서는 양성대조물질에 대한 주기적 시험(e.g. 6개월 미만 간격)도 가능하다. 일정 기간 동안 최소 10회의 양성대조물질에 대하여 독립적인 시험을 통한 일관된 양성 결과를 생산함으로써 LLNA:BrdU-ELISA에 대한 숙련도를 증명할 수 있다.

LLNA:BrdU-ELISA 시험절차를 변경할 때는 적절한 양성대조군이 항상 포함되어야 하고, 변경 사항은 반드시 시험 보고서에 기록되어야 한다. 시험법 변경에 따라 양성대조물질에 대한 새로운 historical 데이터베이스 확립이 필요한가를 결정하기 위해서는 변경사항이 이전에 확립된 양성대조물질의 historical 데이터베이스에 미치는 영향에 대하여 고려해야 한다.

시험자가 양성대조군에 대하여 주기적으로 시험 수행을 결정할 때에는 양성대조군의 시험 수행 간격 동안 적절한 양성대조군 없이 수행된 시험에서 산출된 음성 결과의 적절성과 수용가능성에 대하여 고려하여야 한다. 예를 들어, 주기적인 양성대조군 시험에서 위음성 결과가 나왔다면, 최근에 양성 결과가 나온 양성대조물질시험과 위음성 결과가 나온 양성대조물질 시험 간격 사이에 수행되고 음성으로 판정된 시험 결과에 대해 의문이 있을 수 있다. 매 실험마다 양성대조물질을 포함할 것인가 양성대조물질에 대한 주기적인 시험을 수행할 것인가를 결정할 때에는 이와 같이 시험결과 해석에 미치는

영향에 대하여 고려해야 한다. 매 시험마다 양성대조군을 포함하여 수행할 때 더 적은 수의 동물을 사용하는 것을 고려해야 한다. 과학적으로 합당하고 historical 자료로 증명이 가능하면 양성대조군은 적은 수의 마우스를 사용하여 실험할 수 있다 (17).

양성대조물질은 일관된 반응을 유발한다고 알려진 용매를 사용하여 시험을 수행해야 하지만, 규제 상황에 따라 다른 용매를 이용한 실험이 요구될 수도 있을 것이다 (18). 만약 양성 대조물질을 시험물질과 다른 용매에 녹여 시험을 수행하였다면 양성대조물질에 대한 별도의 용매 대조군을 시험에 포함시켜야 한다.

특정한 화학 분류나 반응범위의 시험물질을 평가할 경우, 기준 시험물질은 해당 시험이 대상물질과 유사한 종류의 물질의 피부감작성을 평가하는데 적절하다는 것을 증명하는데 유용할 것이다. 적절한 기준 물질은 다음과 같은 특성을 가져야 한다.

- 구조적과 기능적으로 시험물질 군과 유사할 것
- 물리적/화학적 특성이 알려져 있을 것
- LLNA:BrdU-ELISA 시험자료가 있을 것
- 다른 동물 모델이나 인체 시험 자료가 있을 것

## VI. 시험방법

### 1. 동물 수와 농도

최소한 군당 4마리 동물을 사용하고 시험물질군과 시험물질 용매만을 처리한 음성 대조군과 양성대조군이 포함되어야 한다. 다양한 농도의 양성대조군 시험을 고려해야하며 특히 양성대조군에 대하여 주기적으로 시험을 할 때 이를 고려해야한다. 대조군의 동물은 시험군과 동일하게 다루어야 한다.

시험물질 농도와 용매는 참고문헌(2, 19). 농도는 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 등의 농도에서 연속되는 농도를 선택해야 한다. 농도 선택 시에는 충분한 과학적 근거가 수반되어야 한다. 전신독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하지 않는 농도를 최고 농도로 선택한다. 시험물질 농도 선택 시 물질에 대한 모든 독성학적, 구조적, 물리화학적 정보를 고려해야하며(19, 20) 이런 정보가 없을 때에는 예비실험을 수행하여야 한다.

용매는 시험결과에 영향을 주지 않고, 용해도가 가장 높은 것을 선택하여야 한다. 아세톤:올리브오일 (4:1 v/v), N,N-디메틸포름아마이드, 메칠에칠케톤, 프로필렌글라이콜과 디메틸 설펝사이드를 용매로 권장하며, 충분한 과학적 근거가 있다면 다른 용매도 사용할 수 있다 (6). 임상시험에서 사용하는 용매나 판매에 사용되는 상업적 조성물을 추가 대조군으로 두고 시험을 수행할 필요가 있는 경우도 있다. 1% Pluronic<sup>®</sup> L92와 같은 가용화제가 포함된 용매에 녹인 친수성 물질은 도포할 때 피부가 젖고 즉시 스며 들지 않기 때문에 특별한 주의가 필요며, 완전한 수용성 용매는 피해야 한다.

개별 동물에 대한 시험결과를 수집함으로써 동물 간 편차를 평가할 수 있고, 시험물질과 용매대조군간 차이의 통계학적 비교가 가능하며, 양성대조군에 사용되는 동물 수를 줄일 수 있는지를 평가할 수 있다 (17).

## 2. 예비시험

최고 농도를 결정하기 위한 자료가 없다면, 예비시험을 통해 본 시험 농도를 결정해야 한다. 예비시험은 전신독성이나 과도한 국소 자극을 유발하지 않는 농도에 대한 정보가 없을 때 본 시험 최고 농도를 선택하기 위하여 실시된다. 예비시험에 사용되는 최고 농도는 액체 시험물질일 경우 100%이며, 고체 또는 부유액일 때는 용해되는 최대 농도이다.

예비시험은 본 시험과 동일한 조건에서 수행되지만 림프절 증식 측정은 하지 않으며 군당 동물 수가 적다. 이 가이드라인에서는 군당 한 마리 또는 두 마리 동물을 사용할 것을 제안한다. 매일 모든 동물에 대하여 전신 독성이나 적용부위에 과도한 국소 독성이 나타나는 지 관찰해야하며, 시험시작 전과 종료 전(Day 6)에 체중을 측정해야 한다. 각 동물의 양쪽 귀의 홍반을 관찰하고 표 1에 따라 귀 부위의 홍반 반응을 점수화한다 (20). 귀 두께는 thickness gauge (e.g. digital micrometer 또는 Peacock Dial thickness gauge)를 이용하여 Day 1 (시험물질 적용 전), Day 3 (최초 시험물질 도포 약 48시간 후)와 Day 6에 측정한다. 또한, Day 6에 안락사한 동물의 귀를 편치하여 무게를 측정할 수 있다. 관찰일에 홍반 점수 (erythema score)  $\geq 3$  이거나 귀 두께 증가율 (ear thickness)  $\geq 25\%$ 이면 과도한 국소 자극으로 판정한다.(21,22). 본 시험의 최고 농도는 예비시험에서 사용된 농도 중 전신독성이나 과도한 국소독성을 유발하지 않은 농도보다 한 단계 낮은 농도를 선택한다.

표 1. 홍반 평가 점수표

평가 기준	점수
홍반이 나타나지 않음 (No erythema)	0
매우 미세한 홍반 [Very slight erythema (barely perceptible)]	1
뚜렷한 홍반 (Well-defined erythema)	2
중등도 이상의 홍반 (Moderate to severe erythema)	3
가피를 형성하는 새빨간 심각한 홍반 [Severe erythema (beet redness) to eschar formation preventing grading of erythema]	4

귀 두께가 25% 증가하는 것과 더불어, 대조군과 비교하여 처리군 귀 두께의 통계학적으로 유의한 증가 또한 자극성 판정을 위해 사용될 수 있다 (21-28). 그러나 귀두께 증가가 25%보다 적을 때는 통계학적으로 유의하더라도 과도한 국소자극과 관련이 없을 것이다 (25-29).

전신독성을 평가하기 위해 다음의 임상증상을 관찰해야 한다 (30): 신경계 기능 변화 (예, 입모, 운동실조, 진전, 경련); 행동 변화 (예, 공격성, 털손질 행동 변화, 활동의 특이적 변화); 호흡 패턴 변화 (예, 호흡곤란, 혈떡임, 수포음과 같이 호흡 주기와 강도의 변화)와 음수 사료 섭취량 변화. 또한, 무기력 또는 무반응 증상, 통증반응, Day 1과 Day 6에 측정된 체중의 5%이상 감소와 치사율이 평가에 고려되어야 한다. 빈사 동물 또는 심한 고통을 느끼는 동물은 인도적으로 안락사 해야 한다 (31).

### 3. 본 시험 일정

시험일정은 다음과 같다:

- Day 1:

개별동물에 표식을 하고 체중을 측정하며 임상 증상을 관찰한다. 시험물질, 용매, 그리고 양성대조물질을 귀 배측에 각각 25  $\mu$ L씩 적용한다.

- Days 2, 3:

Day 1과 같이 시험물질을 도포하는 것을 반복한다.

- Days 4:

휴지기. 시험물질을 처치하지 않는다.

- Days 5.

10 mg/mL로 조제된 BrdU 액을 0.5 mL 복강투여한다.

- Day 6.

각 동물의 체중과 관찰된 임상 증상을 기록한다. BrdU를 투여하고 약 24시간 후 마우스를 안락사한다. 각 마우스에서 물질을 도포한 부위에 이개림프절을 적출하고, 마우스 별로 적출한 이개림프절을 PBS에서 단일세포로 만드는 과정을 수행한다. 림프절의 모식도와 해부학적 구조는 참고문헌에서 확인할 수 있다 (17). 본 시험에서 국소 피부반응을 관찰하기 위하여 귀의 홍반이나 두께와 같은 추가적인 지표가 시험 프로토콜에 포함되어야 할 것이다.

#### 4. 세포현탁액 준비

각 동물에서 적출한 양쪽 림프절은 200  $\mu$ m mesh stainless steel gauze를 통과시키거나 다른 방법(예, 70  $\mu$ m 나일론 메쉬)을 이용하여 단일세포로 만든다. 림프절 단일세포 현탁액을 준비하는 것은 본 시험법에서 중요한 과정이므로 시험 전 시험자의 훈련이 필요하다. 음성대조군 마우스의 림프절은 작기 때문에 자극지수에 산출에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 조심스럽게 조작해야 한다. 림프절단일세포 현탁액의 총량은 약 15 mL로 맞춰야 한다. 음성대조군에서 0.1-0.2 사이의 흡광도를 보인다.

#### 5. 세포증식 확인

BrdU는 상용화된 ELISA 키트를 사용하여 측정한다 (예, Roche Applied Science, Mannheim, Germany, Catalogue Number 11 647 229 001). 림프절단일세포현탁액 100  $\mu$ L를 마이크로 플레이트에 세 개 well에 각각 넣는다. 고정(fixation)과 변성(denaturation) 반응 후 항체를 넣고 반응시킨다. 이후에 세척하여 항체를 제거하고 기질을 첨가하여 발색시킨다. 흡광도 370 nm(참조파장 492 nm)에서 측정한다. 모든 경우 시험 환경은 최적화되어야 한다.

## VII. 관찰항목

### 1. 임상증상

각 동물은 최소 하루에 한 번 임상증상을 관찰하여 적용부위에 국소 자극 또는 전신독성이 나타나는지를 확인해야 한다. 모든 관찰사항은 각 동물에 대하여 체계적으로 기록되어야한다. 관찰 계획에는 안락사를 위한 전신독성, 피부의 과도한 국소 자극 또는 부식을 확인하기 위한 기준이 포함되어야 한다 (31).

### 2. 체 중

시험 시작과 부검 전에 개별 동물의 체중을 측정해야한다.

## VIII. 결과 산출

각 시험군의 결과는 평균 자극지수(mean SI)로 표현된다. 자극지수는 시험군 또는 양성대조군의 평균 BrdU labelling index를 용매대조군의 평균 BrdU labelling index로 나눈 값이다. 용매대조군의 평균 SI값을 1로 정한다.

BrdU 표지 지수는 아래와 같이 정의된다:

$$\text{BrdU labelling index} = (\text{ABSem}-\text{ABSblank})/(\text{ABS}_{\text{ref}}-\text{ABSblank}_{\text{ref}})$$

em=emission wavelength, ref= reference wavelength

SI≥1.6이면 양성으로 간주한다 (10). 그러나 용량-반응 관계가 확실하고 통계학적으로 유의하며 용매대조군과 양성대조군이 일관된 반응을 나타낸다면 경계범위(1.6≤ SI≤ 1.9)의 결과를 양성으로 판정할 수 있을 것이다 (3, 6, 32).

SI값이 1.6에서 1.9사이의 경계값을 보일 때, 시험결과를 양성으로 판정하기 위해서 실험자는 용량-반응관계, 전신 또는 과도한 국소독성 반응, SI값의 통계학적 유의성과 같은 추가적인 정보를 고려해야한다 (10). 또한 알려진 감작성 물질과의 구조적 유사성, 피부자극을 유발 정도, 관찰된 용량-반응 관계 등 시험물질의 다양한 특성에 대한 고려도 함께 이루어져야한다. 그 외에 고려사항에 대하여 (4)에 자세하게 논의되어 있다.

개별 동물에 대한 자료를 수집함으로써 용량-반응관계가 존재하는지와 정도에 대한 통계학적 분석이 가능하다. 통계학적 평가로 용량-반응관계와 시험군의 적절성(예, 용매 대조군에 대한 시험 용량군)을 평가할 수 있다. 용량-반응 관계 평가를 위한 통계학 분석 방법으로는 선형회귀(linear regression), William's test를 사용할 수 있고, 쌍대비교(pair-wise comparison)를 위하여 Dunnett's test를 사용할 수 있다. 적절한 통계학 분석 방법 선택에 있어 자료 변환이나 비모수통계분석(non-parametric statistical analysis)이 필요할 수 있는 분산의 부등식이나 다른 관련 문제의 가능성을 항상 인식해야한다. 어떤 경우 "이상치(outlier)"라고 부르는 특정 값을 포함하거나 포함하지 않고 SI 값을 계산하거나 통계학적 분석을 수행할 필요가 있다.

## IX. 자료보고

### 1. 자료

자료는 표 형식으로 요약되어야 하며, 각 동물의 BrdU labelling index, 군별 평균 BrdU labelling index와 오차(예, SD, SEM), 용매대조군과 비교한 각 군의 평균 SI값이 포함되어야 한다.

### 2. 시험보고서

시험보고서에는 다음과 같은 정보가 포함되어야 한다:

○ 시험물질과 대조시험물질:

- 물질 식별 정보 (예, CAS 번호, 가능하다면 원료; 순도; 알려진 불순물; lot 번호에 대한 정보);
- 물리적 성질과 물리화학적 특성 (예, 휘발성; 안정성; 용해도);
- 제제물(formulation)형태일 경우, 구성(composition)과 구성요소(component)의 상대적 분율

○ 용매



- 물질 식별 정보 (순도; 농도; 적절성; 사용된 용량)
- 용매 선택의 정당성

○ 시험 동물

- 마우스의 기원
- 동물의 미생물학적 상태
- 동물 수와 연령
- 동물 기원, 사육 환경, 사료 등

○ 시험조건

- ELISA 키트의 기원, lot 번호와 제조자의 품질보증(QA; Quality assurance)/품질 관리(QC; Quality control) 자료;
- 시험물질 제조와 적용에 대한 자세한 사항;
- 용량 선택의 정당성 (예비시험 수행 시 예비시험 결과 포함);
- 용매와 사용된 시험물질 농도, 적용된 시험물질 총량;
- 사료와 음수 품질에 대한 자세한 정보 (사료 형태/원료, 수원포함);
- 물질 처치와 샘플링의 자세한 일정
- 독성 평가 방법
- 양성 또는 음성으로 고려할 시험 기준 (criteria for considering studies as positive and negative)
- 시험 프로토콜 이탈에 대한 자세한 기록과 이탈이 시험 설계나 시험 결과에 미치는 영향에 대한 구체적인 설명

○ 신뢰성 확인

- 사용된 시험물질, 농도, 용매에 대한 정보를 포함한 신뢰성 확인을 위한 최근 시험결과 요약
- 시험수행 기관에서 시험과 동시에 수행하거나 또는 historical 양성대조군과 음성대조군 자료

- 양성대조군을 포함하여 시험하지 않았을 경우, 정당성을 뒷받침하기 위한 가장 최근 수행된 양성대조군 결과 보고와 양성대조군의 자세한 historical 자료

#### ○ 결과

- 투여 시작과 부검시점의 개별 동물 체중; 각 투여군의 평균 체중과 오차(예, SD, SEM)
- 투여 부위의 피부 자극을 포함한 개별 동물의 독성 증상과 발현 시점
- 개별 동물의 BrdU labelling index와 각 처치 군의 자극지수 값의 표
- 각 시험군의 BrdU labelling index/mouse의 평균, 오차와 각 시험군의 이상치 분석 결과
- 시험군과 대조군에서 동물간 편차를 고려한 편차와 SI값
- 용량반응 관계
- 적절한 통계학 분석

#### ○ 결과 고찰

- 시험물질을 피부감작성 물질 또는 비감작 물질로 고려하기 위한 결론과 결과, 용량 반응관계 적절한 통계 분석에 대한 간략한 해설

## 참고문헌

- (1) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM

evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.

- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249- 257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10- 7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPRRept2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRRept2009.pdf)]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application

of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206. Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/LLNAPRPrept2009.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPrept2009.pdf)]

- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals*, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (16) ILAR (1996), *Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), *Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay*. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf)]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals*, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.