

발 간 등 록 번 호

11-1471000-000421-14

| 민원인 안내서 |

국민 안전이 기준입니다
YOUR SAFETY IS OUR STANDARD

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 가이드라인

국소림프절시험법: DA

2021. 8.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법(국소림프절시험법: DA) 가이드라인
(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까? <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	※ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 : _____)
	<input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까? <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까? <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까? <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까? <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까? <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
※ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.	
지침서 · 안내서 구분	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용) <input type="checkbox"/> 예(※ 지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용) <input checked="" type="checkbox"/> 예(※ 안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까? <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	※ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.
상기 사항에 대하여 확인하였음.	
2021년 8 월 31일	
담당자 강남희 확 인(부서장) 김광진	

이 안내서는 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법(국소림프절시험법: DA) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 ('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2021년 8월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ “민원인 안내서”란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 특수독성과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5153, 5155

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2013-4-001	2013.3.	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅳ) 제정
2	안내서-0751-01	2017.5.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호,2017.5.16)
3	안내서-1143-01	2021.8.	제목을 “화장품 등 피부감작성 동물대체시험법(국소림프절시험법: DA) 가이드라인”으로 수정, 내용 정비 및 OECD 가이드라인 영문본을 추가하여 개정

I. 개 요	1
II. 시험원리	1
III. 제한점 및 고려사항	2
IV. 시험방법	2
V. 결과 판정	6
VI. 시험결과 및 보고	7
[별첨 1] 번역본(OECD TG 442A)	9
[별첨 2] 원 문(OECD TG 442A)	32



I 개 요

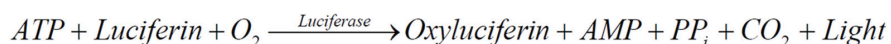
본 시험법은 피부감작성의 독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway) 중 네 번째 핵심 단계(key event)인 T-세포의 활성화와 증식을 평가하는 방법으로서 UN GHS 기준에 따라 시험물질의 피부감작성을 평가하는 국소림프절시험법 (LLNA: DA)이다.

본 시험법은 피부감작성 반응 중 유도기(induction phase)에 나타나는 반응을 측정하는 것으로 시험물질 적용 부위의 가까운 림프절 내에서 림프구의 증식 수준을 나타내는 ATP 양을 루시페린-루시페라아제 방법을 이용해 정량적으로 측정하여 피부감작물질을 구별한다.

LLNA: DA 시험법은 기니픽 시험(TG 406)과 비교 시, 사용되는 동물의 수를 감소시킬 수 있으며 야기(challenge)에 의해 유도되는 피부 과민반응 유발이 필요하지 않기 때문에 동물의 고통을 줄일 수 있는 장점이 있다.

II 시험원리

LLNA: DA 시험법의 기본 원리는 피부감작성 시험물질에 의한 적용 부위와 가까운 림프절 내에서 유발되는 림프구의 증식을 평가하는 것이다. 이러한 림프구의 증식은 시험물질 적용 후 이개 림프절(auricular lymph node)에서 증식된 세포의 증가를 나타내는 ATP 양을 측정하여 평가한다. ATP와 루시페린은 루시페라아제에 의해 빛 생성을 촉진하고 방출된 빛의 세기는 ATP 농도와 비례하며 이는 광도계(luminometer)를 사용하여 측정한다. 시험결과는 부형제대조군의 평균 증식에 대한 시험물질군의 평균 증식의 비율인 감작지수(Stimulation Index, SI)로 나타내며, 시험물질을 피부감작물질로 판정하기 위해서는 SI 지수가 1.8 이상($SI \geq 1.8$)이어야 한다.



III 제한점 및 고려사항

시험을 수행하기 전 시험물질의 특성 및 화학 구조, 물리화학적 성질, 생체외(*in vitro*) 또는 생체내(*in vivo*) 독성시험 결과, 구조적으로 유사한 물질의 독성시험 결과 등 시험물질에 대해 모든 가능한 정보를 고려하여 LLNA: DA 시험법이 해당 시험물질에 적합한지를 결정해야 한다.

특정 금속물질, 일부 계면활성제 유형의 물질(피부자극물질인 경우 빈번하게 위양성 결과가 나타남), 잠재적 교란기능의 작용기를 포함하는 시험물질류(test chemical classes) 또는 단일 시험물질(substances) 등의 경우 LLNA: DA 시험법 적용에는 제한이 있기 때문에 기니픽 시험(TG 406)이 필요할 수 있다.

본 시험법의 검증 데이터베이스에 따르면 LLNA: DA 시험법에서 위양성 결과가 나온 비감작성 물질은 SI 1.8~2.5의 값을 나타냈다(예: 양성값 경계). 따라서 SI 값이 1.8~2.5일 때, 비감작성물질에서 양성값 경계 결과가 나올 수 있는 가능성을 고려해야 한다.

IV 시험방법

4.1 실험동물 및 시험물질 준비

실험동물은 CBA/J 마우스 계통이 선호되며 임신 및 출산 경험이 없는 8~12주령의 건강한 암컷 마우스를 사용하고, 마우스의 체중은 평균 체중의 20%를 초과해서는 안 된다. 마우스는 실험실 환경에 순화를 위해 최소 5일간 케이지에 키우고 육안상 피부 병변이 없음을 확인한다.

고체시험물질은 마우스에 적용하기 전 적절한 용매/부형제에 용해시키거나 현탁액을 만들고, 필요한 경우 이를 희석해야 한다. 액체시험물질은 원물질 그대로 사용하거나 또는 희석하여 사용한다. 의료기기에서 일반적으로 나타나는 불용성 시험물질들은 적절한 용매를 사용하여 용출 가능한 성분들이 모두 용출되도록 하는 과장용출법(exaggerated extraction)¹⁾으로 추출한다. 용매/부형제는 아세톤 : 올리브 오일(AOO, 4:1 v/v), N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide), 메틸에틸케톤(methyl ethyl ketone), 프로필렌글리콜(propylene glycol), 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide)가 권장되며 충분한 과학적 근거가 제시되는 경우 다른 용매/부형제도 사용할 수 있다.

시험물질의 농도는 보통 적절히 연속되는 3개의 농도를 선정한다(예: 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 등). 시험물질과 관련된 기존의 모든 독성정보(예: 급성 독성 및 피부 자극), 구조 및 물리화학적 정보(해당 정보가 없는 경우 구조적으로 유사한 시험물질의 정보) 등을 고려하여 투여용량을 설정해야 한다. 이와 같은 정보가 없는 경우 예비시험을 실시해야 한다.

음성대조물질은 시험물질을 용해한 용매/부형제를 사용하고(부형제대조군), 양성대조물질은 아세톤 : 올리브오일(acetone: olive oil, AOO, 4:1, v/v)에 희석한 25% 헥실 시나믹알데히드(hexyl cinnamic aldehyde, HCA)와 25% 유제놀(eugenol)이 권장된다. 동시 양성대조군을 포함하는 것을 권장하지만 LLNA: DA 시험을 정기적으로 수행하고(한 달에 최소 한 번 이상), 양성대조군의 재현성 있는 정확한 결과를 도출하는 능력을 보여주는 배경자료를 확립한 실험실의 경우, 양성대조군의 주기적인 시험(예: 6개월 이하 간격)도 가능하다(별첨1-12항 참조).

시험 시 마우스는 군당 최소 4마리를 사용하고, 매 시험마다 최소 3개 농도의 시험물질군, 부형제대조군 및 양성대조군을 포함한다.

1) 과장용출법(exaggerated extraction): 모의 사용 용출법(simulated-use extraction)*에서 용출되는 양과 비교하여 더 많은 양의 화학적 조성물을 용출하기 위한 용출 방법.

* 제품의 사용방법을 모의한 용출법

4.2 예비시험

최고 투여용량을 결정하기 위한 정보가 없는 경우 본 시험법에서 적절한 투여용량을 결정하기 위해 예비시험을 수행해야 한다. 시험의 최대 투여용량은 액체 시험물질의 경우 100% 농도를 사용하며, 고체 시험물질 또는 현탁액의 경우 용해 가능한 최대 농도를 사용해야 한다.

예비시험은 LLNA: DA 본시험과 동일한 조건에서 수행되며 단, 림프절 증식은 평가하지 않고 투여용량군당 한 마리 또는 두 마리의 마우스를 사용한다. 모든 마우스의 일반증상은 매일 관찰하고 체중은 시험 전 및 종료 전(8일 차)에 측정하여 기록한다(표 1). 또한 각 마우스 양쪽 귀의 홍반을 관찰하여 표 2에 따라 점수화한다. 본시험의 최고 투여용량은 예비시험에서 사용된 농도 중 전신 독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하지 않는 농도 중 두 번째로 높은 농도를 선택한다.

표 1. 예비시험 일정

	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
일반증상 관찰	○	○	○	○	○	○	○	○
체중 측정	○							○
귀두께 측정	○		○					○
홍반 평가		○	○	○	○	○	○	○
물질 도포	○	○	○				○	
안락사								○

표 2. 홍반에 따른 부여 점수

관찰 및 측정항목	점수
홍반이 없음	0
매우 가벼운 정도의 홍반(거의 인지하기 어려움)	1
명확히 나타나는 홍반	2
중등도 이상의 홍반	3
딱지가 생성되어 홍반 수준을 결정하기 어려운 심각한 홍반(빨개짐)	4

4.3 본시험

1일차에는 각 마우스의 체중, 귀두께 및 모든 일반증상을 관찰하여 기록한다. 1% 소듐라우릴설페이트(SLS) 용액을 양쪽 귀의 배면(귓등) 전체에 도포되도록 1% SLS 용액이 적셔진 브러시로 4~5회 골고루 발라준다. SLS를 적용하고 1시간 후, 시험물질 희석액 25 μ L, 부형제 또는 양성대조물질을 각 귓등에 바른다. 2일차에는 1일차의 적용 절차를 반복하고, 일반증상 및 흥반을 관찰한다. 3일차에는 1일차의 적용 절차를 반복하고, 귀두께를 측정하며 일반증상 및 흥반을 관찰한다. 4일차와 5일차에는 일반증상 및 흥반을 관찰하고, 아무것도 처리하지 않는다. 6일차에는 체중, 귀두께, 일반증상 및 흥반을 관찰하고, 아무것도 처리하지 않는다. 7일차에는 1일차의 적용 절차를 반복하고, 일반증상 및 흥반을 관찰한다. 8일차에는 각 마우스의 체중, 귀두께, 흥반 및 일반증상을 관찰하여 기록하며, 7일차에 도포를 시작한 후 약 24~30시간이 경과하면 마우스를 안락사 시킨다. 각 마우스에서 시험물질을 도포한 부위의 이개 림프절을 절개하고 인산완충용액(PBS)에 넣어 보관한다(표 3).

표 3. 본시험 일정

	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
일반증상 관찰	○	○	○	○	○	○	○	○
체중 측정	○					○		○
귀두께 측정	○		○			○		○
흥반 평가		○	○	○	○	○	○	○
물질 도포	○	○	○				○	
안락사								○

적출된 각 림프절을 균질화한 뒤 PBS와 혼합하여 각 림프절 당 2 mL의 세포혼합 균질액을 준비하며, 각 동물 별 2개의 시료를 준비한다. 세포 현탁액을 ATP 측정 키트(상대적 발광 단위(Relative Luminescence Units, RLU)로 생물발광 측정)를 사용하여 루시페린/루시페라아제 방법으로 측정한다.

4.4 결과 평가

각 시험물질군의 결과는 평균 감작지수로 나타낸다. 감작지수는 각 시험물질군과 양성대조군 마우스의 평균 RLU 값을 부형제대조군 마우스의 평균 RLU 값으로 나누어 계산한다.

$$\text{감작지수(SI)} = \frac{\text{시험물질군 또는 양성대조군의 평균 RLU 값}}{\text{부형제대조군의 평균 RLU 값}}$$

V 결과 판정

5.1 결과 판정

판정기준은 평균 감작지수가 1.8 이상($SI \geq 1.8$)일 때 결과를 양성으로 간주한다.

감작지수(SI)	판정
≥ 1.8	피부감작성
< 1.8	비감작성

하지만 양성값 경계 결과(예: 감작지수 값 1.8~2.5)에 대해서는 이러한 결과 값이 양성임을 확인하기 위해 감작지수 값과 함께 용량-반응 상관성 정도, 전신 독성 또는 과도한 자극의 증거, 통계적 유의성(해당되는 경우) 등의 추가 정보를 고려할 수 있다.

5.2 신뢰성 확인

양성대조군을 사용하여 재현성 있는 결과를 보여줌으로써 본 시험이 적절하게 수행되었는지 확인한다. 양성대조군은 감작지수가 10을 초과하는(> 10) 과도한 피부자극 또는 전신독성을 나타내지 않는 농도에서 부형제대조군 대비 감작지수가 1.8 이상(≥ 1.8)으로 양성 반응을 나타내야 한다.

VI 시험결과 및 보고

데이터는 개별 마우스 RLU 값, RLU 값의 그룹 평균, 관련 오차(예: 표준편차(SD) 또는 표준오차(SEM)), 동시 용매/부형제대조군에 대한 각 투여군의 평균 감각지수를 나타내는 표 형식으로 요약한다. 시험결과보고서에는 다음의 내용을 포함하도록 한다.

시험물질 및 대조물질

- 식별 데이터(예: CAS 번호(가능한 경우), 출처, 순도, 알려진 불순물, 로트 번호)
- 물리적 성질 및 물리화학적 특성(예: 휘발성, 안정성, 용해도)
- 제제(formulation)의 경우, 구성 및 구성요소의 상대적 비율
- 부형제 선정의 타당성에 대한 근거

실험동물

- 마우스의 출처, 수와 주령, 사육 조건, 식이 정보, 미생물학적 상태(알려진 경우) 등

시험조건

- ATP 키트의 공급원, 로트 번호, 제조자의 품질보증/품질관리 데이터
- 시험물질 준비와 적용에 관한 세부사항
- 투여용량 선정의 타당성에 대한 근거(수행된 경우, 예비시험에 대한 결과 포함)
- 사용된 부형제와 시험물질 농도, 적용된 시험물질의 총량
- 양성 또는 음성 판정 기준

신뢰성 확인

- 최근 실시한 신뢰성 확인 결과 요약(사용된 시험물질, 농도 등)
- 실험실의 동시 또는 과거 양성대조군과 동시 음성(용매/부형제)대조군 데이터

결과

- 도포 시작 시점 및 예정된 안락사 시 개별 마우스 체중, 각 처리군의 평균 및 관련 오차(예: SD, SEM)
- 독성 증상(도포 부위의 피부 자극 등) 및 발생 경과
- 각 마우스의 안락사 및 ATP 측정 시간
- 각 처리군의 개별 마우스 RLU 값, 감작지수 값, 평균 및 관련 오차
- 용량-반응 상관성, 이상치(outliers) 분석 결과, 통계 분석(적절한 경우)

결과 토의

- 시험 결과, 용량-반응 상관성 분석, 통계분석에 대한 간단한 해설과 시험물질의 피부감작성 물질 분류에 대한 결론

별첨 1 번역본(OECD TG 442A)피부감작성: 국소림프절시험법: DASkin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA**개요**

1. OECD 화학물질 시험 가이드라인은 과학 발전 및 규제 요구의 변화, 동물 복지 등을 고려하여 주기적으로 검토되고 있다. 마우스에서 피부감작성을 확인하기 위한 첫 번째 시험 가이드라인인 국소림프절시험법(LLNA, TG 429)은 2002년에 처음 채택된 이후 지속적으로 개정되고 있다(1). LLNA 시험법 검증의 세부 사항 및 관련 연구에 대한 검토 내용이 발표되었다(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). LLNA 시험법에서는 림프구 증식을 측정하는 데 방사성 동위원소 티미딘(thymidine) 또는 요오드(iodine)를 사용하므로 방사능 물질의 취득 또는 사용, 폐기 등이 문제가 될 수 있는 지역에서는 본 시험법 사용이 제한된다. LLNA: DA(Daicel Chemical Industries, Ltd. 개발)는 변형된 비방사성 LLNA 시험법(a modified non-radioactive LLNA method)으로 림프구 증식의 지표인 아데노신 3인산(ATP) 함량을 생물발광(bio-luminescence)을 통해 정량화한다. LLNA: DA 시험법은 검증 및 검토가 이루어지고 국제 전문평가 위원단에 의해 일부 제한점을 가지면서 피부 감작성 및 비감작성 물질을 식별하는데 유용한 시험법으로 추천되었다(10)(11)(12)(13). 본 시험 가이드라인은 동물에서 화학물질의 피부감작 가능성을 평가하기 위해 개발되었다. TG 406은 기니픽 시험, 특히 기니픽 극대화 시험 및 Buehler 시험을 이용한다(14). LLNA 시험법(TG 429)과 변형된 비방사성 시험인 LLNA: DA(TG 442A) 및 LLNA: BrdU-ELISA(TG 442B) 시험법은 모두 동물 사용 감소와 개선의 측면에서 TG 406(14)의 기니픽 시험보다 이점을 가진다.

2. LLNA: DA 시험법은 LLNA와 마찬가지로 피부감작성의 유도기(induction phase)를 다루며 용량-반응 평가에 적절한 정량적 데이터를 제공한다. 또한 피부감작성 물질을 확인하는데 DNA용 방사성 표지의 사용이 필요하지 않으므로 작업 현장의 방사능 노출 및 폐기물 처리 문제의 가능성을 배제시킨다. 이는 결국 피부감작성물질을 확인하기 위한 마우스의 사용은 늘리지만, 피부감작성 시험에 사용되는 기니픽의 수를 더 줄일 수 있다(TG 406)(14).

3. 용어정의는 부록 1에 수록되어 있다.

초기 고려사항 및 제한점

4. LLNA: DA 시험법은 특정 제한점을 가지면서 잠재적인 피부 감작성 시험물질을 식별하기 위한 변형된 LLNA 시험법이다. 이는 모든 경우에 LLNA(TG 429) 또는 기니픽 시험(TG 406)(14)을 대신하여 LLNA: DA 시험법을 사용해야 한다는 의미가 아니라, LLNA: DA 시험법이 동일한 기능을 가지며 양성 및 음성 결과에 일반적으로 더 이상 추가적인 확인이 필요하지 않은 대체시험법으로 사용할 수 있는 것이다(10)(11). 시험을 수행하는 실험실은 시험 전 시험물질에 대해 모든 가능한 정보를 고려해야 한다. 이러한 정보에는 시험물질의 특성 및 화학 구조, 물리화학적 성질, 생체외(*in vitro*) 또는 생체내(*in vivo*) 독성시험 결과, 구조적으로 유사한 물질의 독성시험 결과 등이 포함된다. LLNA: DA 시험법이 해당 시험물질에 적합한지(일부 화학물질의 경우 LLNA: DA 시험법을 사용할 수 없음[5항 참조])를 결정하는 것과 투여용량을 설정하는데에 이러한 정보를 참고해야 한다.

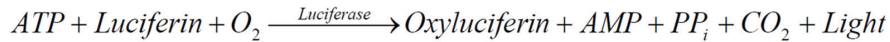
5. LLNA: DA 시험법은 생체내 시험법으로서, 알레르기성 접촉 감작 활성화(allergic contact sensitising activity)의 평가에 동물 사용을 배제할 수 없지만 기니픽 시험(TG 406)(14)과 비교 시, 알레르기성 접촉 감작 활성을 평가하는데 사용되는 동물의 수를 줄일 수 있다. 더욱이 LLNA: DA 시험법은 TG 406 시험법과는 달리 야기(challenge)에 의해 유도되는 피부 과민반응 유발이 필요하지 않기 때문에 알레르기성 접촉 감작성 시험에서 동물의 사용 방식을 상당히 개선(통증 및 고통 경감)한다. TG 406(14)에 비해

LLNA: DA 시험법의 이점이 있음에도 불구하고, 일부 제한점으로 인해 TG 406 시험법이 필요한 경우가 있다(예: 특정 금속물질의 시험, 피부자극물질의 위양성 결과[일부 계면활성제 유형의 물질](6)(1), 시험물질의 용해도). 또한 잠재적 교란기능의 작용기를 포함하는 시험물질류(test chemical classes) 또는 단일 시험물질(substances)(16)의 경우 기니픽 시험(TG 406(14))이 필요할 수 있다. LLNA 시험에 대해 확인된 다른 제한점(1)은 LLNA: DA 시험법에도 적용하는 것을 권장한다(10). 또한 LLNA: DA 시험법은 ATP 수준에 영향을 미치는 시험물질(예: ATP 억제제로 작용하는 시험물질) 또는 세포 내 ATP의 정확한 측정에 영향을 미치는 시험물질(예: ATP 분해효소의 존재, 림프절 내 세포 외 ATP의 존재)의 시험에 적합하지 않을 수 있다. 이와 같이 확인된 제한점을 제외하면 시험물질의 특성이 LLNA: DA 시험법의 정확도에 영향을 주지 않는 한, 모든 시험물질에 적용할 수 있다. 또한 감작지수(Stimulation Index, SI) 1.8~2.5 값이 얻어지는 경우 양성 경계값 결과의 가능성을 고려해야 한다(31~32항 참조). 이는 감작지수 ≥ 1.8 (6항 참조) 기준을 사용하는 44개 물질의 검증 데이터베이스에 근거하고 있는데, LLNA: DA 시험법은 모든 32개 LLNA 감작성 물질은 정확하게 식별했지만 비감작성 물질 12개 중 3개는 잘못 식별하였고, 그 물질들은 감작지수 1.8~2.5의 값을 나타냈다(예: 양성값 경계)(10). 하지만 감작지수 값을 설정하고 시험의 예측력을 계산하는데 동일한 데이터세트가 사용되었으므로 이 결과는 실제 예측력을 과대추정한 값일 수 있다.

시험 원리

6. LLNA: DA 시험법의 기본 원리는 감작성 시험물질이 적용 부위의 가까운 림프절 내에서 림프구 증식을 유발하는 것이다. 이러한 림프구의 증식은 적용하는 알레르기 유발 항원의 용량(dose) 및 감작성(potency)에 비례하기 때문에 감작성의 정량적 측정이 가능하다. 림프구 증식은 각 시험물질군과 부형제대조군의 평균 림프구 증식을 비교하여 측정한다. 부형제대조군의 평균 증식에 대한 시험물질군의 평균 증식의 비율(감작지수)을 계산하며, 시험물질을 피부감작물질로 판정하기 위해서는 감작지수가 1.8 이상($SI \geq 1.8$)이어야 한다. 본 가이드라인의 시험법은 물질 적용 부위의 이개

림프절(auricular lymph node)에서 증식된 세포수의 증가를 나타내는 ATP 함량을 생물발광(살아있는 세포수와 상관관계가 있다고 알려져 있음)(17)으로 측정하는 것에 기초한다(18)(19). 생물발광법은 아래의 반응에 따라 ATP와 루시페린으로부터 빛 생성을 촉진하는 루시페라아제 효소(luciferase enzyme)를 이용한다.



방출된 빛의 세기(light intensity)는 ATP 농도와 비례하며 광도계(luminometer)를 사용하여 측정한다. 루시페린-루시페라아제 분석은 ATP 정량에 사용되는 감도가 높은 시험법으로 매우 다양한 응용분야에서 이용된다(20).

시험 설명

동물종 선택

7. 실험동물로는 마우스를 사용한다. LLNA: DA 시험법의 검증 연구가 CBA/J 계통으로 수행됨에 따라 해당 종이 선호되며(12)(13), 출산 및 임신 경험이 없는 건강한 암컷 마우스를 사용한다. 시험 시작 시 마우스는 8~12주령이어야 하며, 체중 편차는 최소로 하되 평균 체중의 20%를 초과해서는 안 된다. LLNA: DA 시험법 결과에서 마우스의 계통이나 성별에 의한 차이가 없다는 것을 증명하는 데이터가 충분히 있는 경우 다른 계통이나 수컷을 대체하여 사용할 수 있다.

사육 및 사료조건

8. 마우스 개별 사육에 관한 과학적 근거가 별도로 제공되지 않는 한, 마우스는 그룹별로 사육(21)해야 한다. 실험동물실의 온도는 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지되어야 하고, 상대습도는 최소한 30%이상 단, 가습적 70%를 넘지 않아야 하며, 실험동물실 청소 시를 제외하고 50~60%의 범위에 있어야 한다. 조명은 명/암 주기를 12시간 간격으로 설정한다. 사료는 일반적인 실험동물용 사료를 사용하며 음용수는 무제한 공급한다.

실험동물 준비

9. 마우스는 무작위로 선별하고 개체 식별을 표시(단, 귀에 표시하는 방법은 제외)하며 실험실 환경에 순화를 위해 투여 시작 전 최소 5일간 케이지에 키운다. 투여 시작 전 모든 마우스를 검사하여 육안상 피부 병변이 없음을 확인한다.

시험 용액의 조제

10. 고체시험물질은 마우스에 적용하기 전 적절한 용매/부형제에 용해시키거나 현탁액을 만들고, 필요한 경우 이를 희석해야 한다. 액체시험물질은 원물질 그대로 사용하거나 또는 희석하여 사용한다. 의료기기에서 일반적으로 나타나는 불용성 시험물질들은 적용하기 전에 적절한 용매를 사용하여 용출 가능한 성분들이 모두 용출되도록 하는 과장용출법(exaggerated extraction)을 사용해야 한다. 시험물질 보관에 대한 안정성 자료가 없는 경우 시험 당일에 조제해야 한다.

신뢰성 확인

11. 양성대조군(PC)은 반응정도가 잘 알려진 감작성 물질의 적절하고 재현성 있는 민감도에 의해 본 시험이 적절하게 수행되었는지 증명하기 위해 사용한다. 실험실의 수행능력을 확인하고 실험실내 및 실험실간 재현성과 유사성(comparability)을 평가하기 위하여 동시 양성대조군을 포함할 것을 권고한다. 일부 규제 당국 또한 각 시험마다 양성대조군의 사용을 요구하기 때문에 LLNA: DA 시험법을 수행하기 전에 관계 당국과 상의할 것을 권장한다. 따라서 양성대조군을 주기적으로 사용함에 따라 발생할 수 있는 추가적인 동물실험이 필요(규제당국의 요구사항을 충족하기 위해)하지 않도록 동시 양성대조군의 사용을 권장한다(12항 참조). 양성대조군은 감작지수가 음성대조군 대비 1.8 이상(\geq)으로 예상되는 노출 수준에서 LLNA: DA 양성 반응을 나타내어야 한다. 양성대조물질의 용량은 과도한 피부자극 또는 전신독성은 야기하지 않고, 유도반응을 재현성 있고 과도하지 않게(예: SI > 10은 과한 것으로 간주됨) 유발하는 농도를 선택해야

한다. 선호하는 양성대조물질은 아세톤 : 올리브오일(acetone: olive oil, AOO, 4:1, v/v)에 희석한 25% 헥실시나믹알데히드(hexyl cinnamic aldehyde, HCA)(CAS 번호 101-86-0)와 25% 유제놀(eugenol)(CAS 번호 97-53-0)이다. 충분한 타당성이 제시되는 경우, 위의 기준에 부합하는 다른 양성대조물질을 사용할 수 있다.

12. 동시 양성대조군의 포함을 권장하는 반면, LLNA: DA 시험을 정기적으로 수행하고(한 달에 최소 한 번 이상), 양성대조군 결과를 재현성 있고 정확하게 도출하는 능력을 입증하는 배경자료(historical PC database)를 확립한 실험실의 경우, 양성대조군의 주기적인 시험(예: 6개월 이하 간격)도 가능하다. 실험자가 적절한 기간 내에(1년 미만) 최소 10회의 독립적인 시험에서 양성대조군의 일관적인 양성 결과를 도출함으로써 LLNA: DA 시험법의 숙련도를 보일 수 있다.

13. LLNA: DA 시험 과정에 변경이 있는 경우(예: 숙련된 직원, 시험재료 및 시약, 시험장비, 실험동물 공급처 등의 변경) 동시 양성대조군을 반드시 포함해야 하며 변경사항은 시험보고서에 기록해야 한다. 이러한 시험 절차의 변경이 이전에 확립된 배경자료의 적절성에 어떠한 영향을 주는지 고려하여 양성대조군 결과의 일관성을 문서화 하기 위한 새로운 배경자료의 확립이 필요한지 결정해야 한다.

14. 시험자는 동시 양성대조군 시험 대신 주기적으로 시험하는 결정이 주기적 양성대조군 시험 사이에 생성된 음성 시험 결과(동시 양성대조군 없이)의 적합성(adequacy) 및 수용성(acceptability)에 영향을 준다는 것을 알아야 한다. 예를 들어, 주기적 양성대조군 시험에서 위음성 결과가 나왔다면, 주기적 양성대조군 시험결과가 나온 마지막 시험과 위음성 결과가 나온 시험 사이에 수행된 시험의 음성 결과에 대해서는 신뢰할 수 없다. 동시 양성대조군을 포함할 것인지 또는 주기적 양성대조군을 사용할 것인지를 결정할 때에는 이러한 영향을 신중하게 고려해야 한다. 동시 양성대조군에 사용되는 동물의 수를 줄이는 것이 과학적으로 타당하게 설명되고, 시험 기관이 배경자료를 근거하여 적은 수의 동물 사용이 가능하다는 것을 보여주는 경우, 동시 양성대조군의 동물 수의 감소를 고려해야 한다(22).

15. 양성대조물질의 용매는 일관된 반응을 유발하는 것으로 알려진 부형제(예: 아세톤 : 올리브오일, 4:1, v/v)를 사용해야 하지만, 규제 여건에 따라 비표준 부형제(임상적/화학적으로 관련 있는 제형)가 또한 필요할 수 있다(23). 만약 동시 양성대조군을 시험물질과는 다른 부형제를 사용하여 시험하는 경우 동시 양성대조군에 대한 부형제를 별도로 시험에 포함시켜야 한다.

16. 특정 화학물질류(specific chemical class) 또는 특정 반응 범위의 시험물질을 평가하는 경우에 있어서, 기준시험물질(benchmark test substance)을 사용하는 것은 본 시험법이 이런 종류의 시험물질의 피부감작능을 식별하는 데 적절하게 기능한다는 것을 입증하는데 유용할 수 있다. 적절한 기준시험물질은 다음의 특성을 가져야 한다.

- 시험물질군과 구조적 및 기능적 유사성
- 알려진 물리적/화학적 특성
- LLNA: DA 시험으로 얻은 근거 자료(supporting data)
- 다른 동물 종이나 인체 시험으로 얻은 근거 자료(supporting data)

시험 방법

동물 수 및 투여용량

17. 투여용량군당 최소 4마리의 마우스를 사용하며, 최소 3개 농도의 시험물질군, 시험물질의 부형제만 처리한 동시 음성대조군 및 양성대조군(실험실 규정을 근거로, 11~15항에서 언급된 것을 고려하여 동시 또는 최근 사용된 양성대조군)을 준비한다. 특히, 양성대조군 시험을 비정기적으로(on an intermittent basis) 수행하는 경우, 양성대조군을 여러 용량으로 시험하는 것을 고려해야 한다. 시험물질을 처리하지 않는 것을 제외하고, 대조군(control group) 마우스는 시험물질군 마우스와 동일한 방식으로 처리 및 취급해야 한다.

18. 투여용량 및 부형제 선택은 참고문헌 (2)와 (24)에 제시된 권고사항을 기반으로 한다. 연속 투여용량의 경우, 보통 적절히 연속되는 농도를 선정한다(예: 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 등). 시험농도의 선정에는 충분한 과학적 근거가 뒷받침되어야 한다. 3개의 연속되는 농도 선정 시 가능하면 시험물질과 관련된 기존의 모든 독성정보(예: 급성 독성 및 피부 자극), 구조 및 물리화학적 정보(또는 구조적으로 관련된 시험물질)를 고려하여 전신 독성 또는 과도한 국소 피부 자극을 피하면서 가장 높은 농도로 노출을 최대화한다(24)(25). 이와 같은 정보가 없는 경우 사전 예비시험이 필요하다(21~24항 참조).

19. 부형제는 시험 결과에 영향을 주지 않아야 하며, 시험물질 적용에 적합한 용액/현탁액을 만들면서 가장 높은 농도를 얻기 위하여 용해도를 최대화 하는 것에 기반하여 선정해야 한다. 권장되는 부형제는 아세톤 : 올리브 오일(AOO, 4:1 v/v), N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide), 메틸에틸케톤(methyl ethyl ketone), 프로필렌글리콜(propylene glycol), 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide)(19)이며 충분한 과학적 근거가 제시되는 경우 다른 부형제를 사용할 수 있다. 특정 상황에서는 시판되는 형태의 시험물질 또는 임상적으로 적절한 용매를 추가적인 대조군으로 사용할 수 있다. 친수성 물질인 경우, 적절한 용해제(예: 1% Pluronic® L92)를 사용해서 시험물질 용액이 부형제에 혼합되어, 피부를 적시고 적용하는 즉시 흘러내리지 않도록 특별한 주의를 기울여야 한다. 따라서 완전히 수용성인 부형제는 피한다.

20. 개별 마우스 림프절 결과의 처리는 마우스 간의 변동성 평가와 시험물질군과 부형제대조군 간의 차이에 대한 통계적 비교가 가능하다(33항 참조). 또한, 양성대조군 동물 수의 감소 가능 여부에 대한 평가는 개별 마우스의 자료가 수집된 경우에만 가능하다(22). 뿐만 아니라 일부 국가의 규제 당국은 개별 마우스 데이터의 수집을 요구한다. 향후 규제 당국이 원래의 방식으로 수집한 결과(예: 집단 동물 데이터)를 나중에 다른 요구사항(예: 개별 동물 데이터)에 의해 고려하는 경우, 개별 동물 데이터를 수집하는 것이 추후 필요한 중복 시험을 피함으로써 동물 복지 측면에서 이점을 제공한다.

예비시험

21. 최고 투여용량을 결정하기 위한 정보가 없는 경우(18항 참조), LLNA: DA 시험법에서 적절한 투여용량을 결정하기 위해 예비시험을 수행해야 한다. 예비시험의 목적은 전신 독성(24항 참조)이나 과도한 국소 피부자극(23항 참조)을 유발하는 농도에 대한 정보가 없는 경우 본시험의 최대 투여용량 선택에 대한 지침을 제공하는 것이다. 시험의 최대 투여용량은 액체 시험물질의 경우 100% 농도, 고체 시험물질 또는 현탁액의 경우 가능한 최대 농도이어야 한다.

22. 예비시험은 LLNA: DA 본시험과 동일한 조건에서 수행되며 단, 림프절 증식은 평가하지 않고 투여용량군당 한 마리 또는 두 마리의 사용이 제안된다. 모든 마우스의 전신 독성 또는 적용 부위의 국소 자극 등 모든 일반증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전 및 종료 전(8일차)에 기록한다. 각 마우스 양쪽 귀의 홍반을 관찰하고, 표 1에 따라 점수화한다(25). 두께측정기(예: 디지털 마이크로미터 또는 피코크 다이얼 두께 측정기)를 사용하여 1일차(적용 전), 3일차(첫 번째 적용 약 48시간 후), 7일차(종료 24시간 전) 및 8일차에 귀 두께를 측정한다. 또한 8일차의 귀 두께는 마우스를 안락사 시킨 후 귀 부위를 이어편치로 뚫어 무게를 측정하여 결정할 수 있다. 과도한 국소 자극은 홍반 점수 3 이상 또는 귀 두께가 25% 이상 증가한 경우를 말한다(26)(27). LLNA: DA 본시험의 최고 투여용량은 예비시험에서 사용된 농도(18항 참조) 중 전신 독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하지 않는 농도 중 두 번째로 높은 농도를 선택한다.

표 1: 홍반에 따른 부여 점수

관찰	점수
홍반이 없음	0
매우 가벼운 정도의 홍반(거의 인지하기 어려움)	1
명확히 나타나는 홍반	2
중등도 이상의 홍반	3
딱지가 생성되어 홍반 수준을 결정하기 어려운 심각한 홍반(빨개짐)	4

23. 귀 두께의 25% 증가(26)(27) 이외에도 부형제대조군 대비 시험물질군에서 귀 두께의 통계적으로 유의한 증가는 LLNA에서 자극을 확인하는 데 사용된다(28)(29)(30)(31)(32)(33)(34). 그러나 귀 두께의 증가가 25% 미만일 때 통계적으로 유의하게 나타날 수 있지만, 이는 특별하게 과도한 자극과 연관되지는 않는다(30)(32)(33)(34).

24. 통합 평가의 일환으로 사용할 경우, 신경계 기능 변화(예: 입모, 운동실조, 떨림, 경련), 행동 변화(예: 공격성, 털 손질 행동의 변화, 활동 수준의 현저한 변화), 호흡 양상 변화(예: 호흡 곤란, 헐떡임, 수포음과 같이 호흡의 빈도 및 강도의 변화), 음수 및 섭취량 변화 등의 일반증상은 전신 독성(35)의 징후일 수 있으며 따라서 LLNA: DA 본시험의 최대 투여용량을 시사할 수 있다. 또한 무기력 또는 무반응 증상, 통증과 괴로움, 경미하거나 일시적인 것 이상의 모든 일반증상, 1~8일 차 5% 초과와 체중감소 및 치사율은 평가 시 고려되어야 한다. 빈사 상태의 마우스 또는 심한 통증과 고통을 보이는 마우스는 안락사 시킨다(36).

본시험 일정

25. 시험 일정은 다음과 같다.

- 1일차(Day 1):

각 마우스의 체중 및 모든 일반증상을 관찰하여 기록한다. 1% 소듐라우릴설페이트(SLS) 용액을 양쪽 귀의 배면(귓등) 전체에 도포되도록 1% SLS 용액이 적셔진 브러시로 4~5회 골고루 발라준다. SLS 적용 1시간 후, 시험물질 희석액 25 μ L, 부형제 또는 양성대조물질(11~15항에서 고려된 것처럼 실험실 방침에 근거한 동시 또는 최근에 사용된 양성대조물질)을 각 귓등에 바른다.

- 2, 3, 7일차(Day 2, 3 and Day 7):

1일차의 SLS 1% 수용액 및 시험물질 적용 절차를 반복한다.

- 4, 5, 6일차(Day 4, 5 and Day 6):

아무것도 처리하지 않는다.

- 8일차(Day 8):

각 마우스의 체중 및 모든 일반증상을 기록한다. 7일차에서 도포를 시작하고 약 24~30시간 후, 마우스를 안락사 시킨다. 각 마우스에서 시험물질을 도포한 부위의 이개 림프절을 절개하고 인산완충용액(PBS)에 넣어 보관한다. 림프절의 확인과 절개에 대한 도표 및 세부 사항은 참고문헌(22)을 참조한다. 본시험에서 국소 피부 반응의 관찰을 위해서는 귀 홍반의 점수화 또는 귀 두께 측정(두께 측정기를 사용하거나 해부 시 이어펀치 무게 측정)과 같은 추가적인 항목들이 시험 프로토콜에 포함될 수 있다.

세포 현탁액의 준비

26. 각 마우스 양쪽에서 적출한 림프절을 두 개의 유리 슬라이드 사이에 넣고 약한 압력을 가하여 림프절을 으깨고 다음과 같은 방법으로 단일 세포 현탁액을 준비한다. 림프절 조직이 얇게 퍼진 것을 확인한 후 두 개의 슬라이드를 분리한다. 페트리디쉬 위에서 각 슬라이드를 잡고 PBS로 헹구며, 양쪽 슬라이드의 조직을 PBS에 현탁함과 동시에 셀 스크래퍼로 슬라이드의 조직을 긁어낸다. 음성대조군 마우스의 림프절은 크기가 작기 때문에 감작지수 값에 인위적인(artificial) 영향을 주지 않도록 세심한 작업이 필요하다. 양쪽 슬라이드를 헹구는 데 총 PBS 1 mL을 사용해야 한다. 셀 스크래퍼로 페트리디쉬의 림프절 세포 현탁액을 가볍게 균질화해야 한다. 그리고 마이크로피펫으로 림프절 세포 현탁액 20 μ L를 취하여(눈에 보이는 막을 취하지 않도록 주의) PBS 1.98 mL과 혼합하여 시료 2 mL을 만들고, 동일한 절차로 두 번째 시료 2 mL을 준비한다. 각 동물 당 2개의 시료를 준비한다.

세포증식 측정(림프구 ATP 함량 측정)

27. 림프절의 ATP 함량 증가는 ATP 측정 키트(상대적 발광 단위(Relative Luminescence Units, RLU)로 생물발광을 측정)를 사용하여 루시페린/루시페라아제 방법으로 측정한다. ATP 함량은 동물 사망 후 점차 감소하기 때문에 ATP 측정시간은

약 30분 이내로 균일하게 유지해야 한다(12). 따라서 이개 림프절 절개부터 ATP 측정까지의 과정은 각 동물에 대해 사전에 정해진 일정에 따라 동일하게 20분 이내로 이루어져야 한다. ATP의 발광도는 각 시료 2 mL에서 측정하고 각 동물에 대해 총 2개의 ATP 측정값을 얻는다. 평균 ATP의 발광도를 결정하여 그 후의 계산에서 사용한다(31항 참조).

관찰

일반증상 관찰

28. 각 마우스에서 적용 부위의 국소 자극이나 전신 독성에 대한 일반증상이 있는지를 최소 하루에 한 번 주의 깊게 관찰해야 한다. 모든 관찰 사항은 각 마우스 별로 체계적으로 기록하여 유지한다. 관찰(*monitoring*) 계획은 전신 독성 또는 과도한 국소 피부 자극, 안락사가 필요한 피부 부식을 즉시 식별할 수 있는 기준을 포함해야 한다(36).

체중

29. 25항에서 언급한 바와 같이, 각 마우스의 체중은 시험 시작 시점 및 예정된 안락사 시 측정해야 한다.

결과의 계산

30. 각 시험물질군의 결과는 평균 감작지수로 나타낸다. 감작지수는 각 시험물질군과 양성대조군 마우스의 평균 RLU 값을 부형제대조군 마우스의 평균 RLU 값으로 나누어 계산한다. 부형제대조군에 대한 감작지수의 평균은 “1”이 된다.

31. 판정기준은 감작지수가 1.8 이상($SI \geq 1.8$)일 때 결과를 양성으로 간주한다(10). 하지만 경계값 결과(예: 감작지수 값 1.8~2.5)를 양성으로 판정할 때에는 용량-반응

상관 정도, 통계적 유의성, 용매/부형제 및 양성대조군 반응의 일관성을 또한 고려한다 (2)(3)(37).

32. 감작지수 값 1.8~2.5의 양성반응 경계값에 대해서 그러한 결과 값이 양성임을 확인하기 위해 감작지수 값과 함께 용량-반응 상관성, 전신 독성 또는 과도한 자극의 증거, 통계적 유의성(해당되는 경우) 등의 추가 정보를 고려할 수 있다(10). 또한 알려진 피부감작물질과 구조적인 관계 여부, 마우스에서의 과도한 피부자극 유발 여부, 관찰된 용량-반응 상관성의 유형 등을 포함하여 시험물질의 다양한 특성을 고려해야 한다. 이를 비롯한 기타 고려사항에 대해서는 참고문헌(4)에서 자세히 논의된다.

33. 개별 마우스의 데이터 수집은 데이터의 용량-반응 상관성 여부 및 상관 정도에 대한 통계적 분석을 가능하게 한다. 모든 통계적 평가는 적절하게 보정된 시험군 간의 비교뿐 아니라 용량-반응 상관성에 대한 평가를 포함할 수 있다(예: 투여군 대비 동시 부형제대조군 짝 비교(pair-wise comparison)). 통계 분석에는 용량-반응 상관성 평가를 위한 선형 회귀법(linear regression)이나 Williams's test와 짝 비교를 위한 Dunnett's test 등이 포함된다. 통계 분석의 적절한 방법을 정할 때 연구자는 데이터 변환이나 비모수 통계 분석을 필요로 하는 불균등한 분포의 가능성(possible inequalities of variances) 및 문제 등을 파악하고 있어야 한다. 어떤 경우라도, 특정 데이터 포인트("이상치(outliers)"라고도 함)를 넣거나 넣지 않는 것을 모두 포함하여 감작지수 계산 및 통계적 분석을 모두 수행해야 할 필요가 있다.

시험자료 및 보고

데이터

34. 데이터는 개별 동물 RLU 값, RLU 값의 그룹 평균, 관련 오차(예: SD, SEM), 동시 용매/부형제대조군에 대한 각 투여군의 평균 감작지수를 나타내는 표 형식으로 요약한다.

시험 보고서

35. 시험 보고서에는 다음의 정보를 포함해야 한다.

시험물질 및 대조물질

- 식별 데이터(예: CAS 번호(가능한 경우), 출처, 순도, 알려진 불순물, 로트 번호)
- 물리적 성질 및 물리화학적 특성(예: 휘발성, 안정성, 용해도)
- 제제(formulation)의 경우, 구성 및 구성요소의 상대적 비율

용매/부형제

- 식별 데이터(순도, 농도(해당되는 경우), 사용된 용량)
- 부형제 선정의 타당성에 대한 근거

실험동물

- CBA 마우스의 출처
- 마우스의 미생물학적 상태(알려진 경우)
- 마우스의 수와 주령
- 마우스의 출처, 사육 조건, 식이 정보 등

시험조건

- ATP 키트의 공급원, 로트 번호, 제조자의 품질보증/품질관리 데이터
- 시험물질 준비와 적용에 관한 세부사항
- 투여용량 선정의 타당성에 대한 근거(수행된 경우, 예비시험에 대한 결과 포함)
- 사용된 부형제와 시험물질 농도, 적용된 시험물질의 총량
- 사료와 음용수 품질에 관한 세부사항(식이 유형/공급원, 음용수원 등)
- 도포 및 샘플링 일정에 관한 세부사항
- 독성 측정 방법

- 양성 또는 음성 판정 기준
- 프로토콜 편차에 대한 세부사항 및 편차가 시험 설계와 결과에 어떻게 영향을 주었는지에 대한 설명

신뢰성 확인

- 최근 실시한 신뢰성 확인 결과 요약(사용된 시험물질, 농도, 부형제에 대한 정보 포함)
- 실험실의 동시 또는 과거 양성대조군과 동시 음성(용매/부형제)대조군 데이터
- 동시 양성대조군이 포함되지 않은 경우, 가장 최근의 주기적 양성대조군에 대한 수행일자 및 보고서와 동시 양성대조군 미수행 근거가 되는 실험실의 양성대조군 배경자료의 세부사항이 기술된 보고서

결과

- 도포 시작 시점과 예정된 안락사 시 개별 마우스 체중 및 각 처리군의 평균과 관련 오차(예: SD, SEM)
- 각 마우스 도포 부위의 피부 자극을 포함한 독성 증상 및 발생 경과
- 각 동물에 대한 안락사 및 ATP 측정 시간
- 각 처리군의 개별 마우스 RLU 값 및 감작지수 값의 표
- 각 처리군 마우스의 RLU 값 평균 및 관련 오차(예: SD, SEM)와 각 처리군의 이상치(outliers) 분석 결과
- 감작지수 계산 결과 및 변동성에 대한 적절한 측정값(시험물질군 및 대조군의 마우스 간 변동성 고려)
- 용량-반응 상관성
- 통계 분석(적절한 경우)

결과 토의

- 결과, 용량-반응 분석, 통계분석(적절한 경우)에 대한 간단한 해설과 시험물질의 피부감작성 물질 분류에 대한 결론

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) 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

- (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, 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, 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, 249-257.
- (10) 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>]
- (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/LLNAPRPrept2009.pdf].
- (12) 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.

- (13) 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.
- (14) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]
- (15) 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.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) Dexter, S.J., Cáara, 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.

- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) 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]
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) 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.
- (25) 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]
- (26) 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.
- (27) 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]

- (28) 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.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) 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.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

- (36) 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>]
- (37) 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.
- (38) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

부록 1 - 용어 정의

정확도(Accuracy): 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”과 “정확도(Accuracy)”는 같은 의미로 쓰임(38).

기준 물질(Benchmark substance): 시험물질의 비교 기준으로 사용되는 감작성 및 비감작성 물질. 기준 물질은 (i) 일관성 있고 신뢰할 수 있는 공급원, (ii) 시험되는 물질과 구조적, 기능적 유사성, (iii) 알려진 물리적/화학적 특성, (iv) 알려진 효과 입증 자료, (v) 원하는 반응의 범위 내 알려진 효력 등의 속성을 가져야 함.

위음성(False negative): 양성 또는 활성 물질이 시험법에 의해 음성 또는 비활성 물질로 잘못 식별되는 것.

위양성(False positive): 음성 또는 비활성 물질이 시험에 의해 양성 또는 활성 물질로 잘못 식별되는 것.

유해성(Hazard): 건강 또는 생태계에 유해영향을 나타낼 수 있는 가능성. 충분한 수준에 노출되어야만 유해영향이 나타남.

실험실 간 재현성(Inter-laboratory reproducibility): 다른 실험실에서 동일한 프로토콜과 시험물질로 시험을 수행했을 때, 양적 및 질적으로 유사한 결과를 나타내는 정도. 실험실 간 재현성은 사전검증 및 검증 단계에서 결정되고 실험실 간에 시험이 성공적으로 전수될 수 있음을 보여주며, between-laboratory reproducibility라고도 함(38).

실험실 내 재현성(Intra-laboratory reproducibility): 동일한 실험실에서 자격을 갖춘 자가 다른 시점에 지정된 프로토콜로 같은 결과를 성공적으로 재현할 수 있는 정도. 또한 within-laboratory reproducibility라고도 함(38).

이상치(Outlier): 집단에서 무작위로 채취한 샘플이 다른 수치와 상당히 다르게 관찰되는 것.

신뢰성보증(Quality assurance): 시험 수행과 독립된 개인이 실험실 시험 기준 및 요건, 기록 보관 절차 준수, 데이터 전수 정확도 등의 관리 절차를 평가하는 것.

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내, 실험실 간 재현성(reproducibility)으로 평가됨(38).

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

감작지수(Stimulation Index, SI): 시험물질의 피부감작성을 평가하기 위해 산출된 값. 동시 부형제대조군과 시험물질 처리군의 증식 정도의 비율.

시험물질(Test substance): 본 시험 가이드라인을 사용하여 시험한 물질, 단일화합물 또는 복수 화합물(예: 최종제품, 제형)로 구성됨. 제형을 시험할 때, 특정 규제 당국에서는 최종 제품 제형에 대한 시험만을 요구할 수 있다는 점을 고려함. 단, 제품 제형의 활성 성분에 대한 시험 요건이 있을 수 있음.

별첨 2

원문(OECD TG 442A)

OECD/OCDE

442A

Adopted:
22 July 2010

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA

INTRODUCTION

1. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals are periodically reviewed in light of scientific progress, changing regulatory needs, and animal welfare considerations. The first Test Guideline (TG) for the determination of skin sensitization in the mouse, the Local Lymph Node Assay (LLNA; TG 429) was adopted in 2002, and has since then been revised (1). The details of the validation of the LLNA and a review of the associated work have been published (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). In the LLNA, radioisotopic thymidine or iodine is used to measure lymphocyte proliferation and therefore the assay has limited use in regions where the acquisition, use, or disposal of radioactivity is problematic. The LLNA: DA (developed by Daicel Chemical Industries, Ltd.) is a non-radioactive modification to the LLNA, which quantifies adenosine triphosphate (ATP) content via bio-luminescence as an indicator of lymphocyte proliferation. The LLNA: DA test method has been validated and reviewed and recommended by an international peer review panel as considered useful for identifying skin sensitizing and non-sensitizing substances, with certain limitations (10) (11) (12) (13). This Test Guideline is designed for assessing skin sensitization potential of chemicals in animals. TG 406 utilises guinea pig tests, notably the guinea pig maximisation test and the Buehler test (14). The LLNA (TG 429) and the two non-radioactive modifications, LLNA: DA (TG 442 A) and LLNA: BrdU-ELISA (TG 442 B), all provide an advantage over the guinea pig tests in TG 406 (14) in terms of reduction and refinement of animal use.

2. Similar to the LLNA, the LLNA: DA studies the induction phase of skin sensitization and provides quantitative data suitable for dose-response assessment. Furthermore, an ability to detect skin sensitizers without the necessity for using a radiolabel for DNA eliminates the potential for occupational exposure to radioactivity and waste disposal issues. This in turn may allow for the increased use of mice to detect skin sensitizers, which could further reduce the use of guinea pigs to test for skin sensitization potential (*i.e.* TG 406) (14).

DEFINITIONS

3. Definitions used are provided in Annex 1.

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

4. The LLNA: DA is a modified LLNA method for identifying potential skin sensitizing test substances, with specific limitations. This does not necessarily imply that in all instances the LLNA: DA should be used in place of the LLNA or guinea pig tests (*i.e.* TG 406) (14), but rather that the assay is of equal merit and may be employed as an alternative in which positive and negative results generally no longer require further confirmation (10) (11). The testing laboratory should consider all available information on the test substance prior to conducting the study. Such information will include the identity and chemical structure of the test substance; its physicochemical properties; the results of any other *in vitro* or *in vivo* toxicity tests on the test substance; and toxicological data on structurally related test substances. This information should be considered in order to determine whether the LLNA: DA is appropriate for the test substance (given the incompatibility of limited types of test substances with the LLNA: DA [see paragraph 5]) and to aid in dose selection.

© OECD, (2010)

You are free to use this material for personal, non-commercial purposes without seeking prior consent from the OECD, provided the source is duly mentioned. Any commercial use of this material is subject to written permission from the OECD.

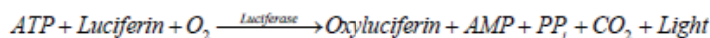
442A

OECD/OCDE

5. The LLNA: DA is an *in vivo* method and, as a consequence, will not eliminate the use of animals in the assessment of allergic contact sensitizing activity. It has, however, the potential to reduce animal use for this purpose when compared to the guinea pig tests (TG 406) (14). Moreover, the LLNA: DA offers a substantial refinement (less pain and distress) of the way in which animals are used for allergic contact sensitization testing, since unlike the TG 406, the LLNA: DA does not require that challenge-induced dermal hypersensitivity reactions be elicited. Despite the advantages of the LLNA: DA over TG 406 (14), there are certain limitations that may necessitate the use of TG 406 (*e.g.* the testing of certain metals, false positive findings with certain skin irritants [such as some surfactant-type substances] (6) (1), solubility of the test substance). In addition, test substance classes or substances containing functional groups shown to act as potential confounders (16) may necessitate the use of guinea pig tests (*i.e.* TG 406 (14)). Limitations that have been identified for the LLNA (1) have been recommended to apply also to the LLNA: DA (10). Additionally, the use of the LLNA: DA might not be appropriate for testing test substances that affect ATP levels (*e.g.* test substances that function as ATP inhibitors) or those that affect the accurate measurement of intracellular ATP (*e.g.* presence of ATP degrading enzymes, presence of extracellular ATP in the lymph node). Other than such identified limitations, the LLNA: DA should be applicable for testing any test substances unless there are properties associated with these substances that may interfere with the accuracy of the LLNA: DA. In addition, consideration should be given to the possibility of borderline positive results when Stimulation Index (SI) values between 1.8 and 2.5 are obtained (see paragraphs 31-32). This is based on the validation database of 44 substances using an $SI \geq 1.8$ (see paragraph 6) for which the LLNA: DA correctly identified all 32 LLNA sensitizers, but incorrectly identified three of 12 LLNA non-sensitizers with SI values between 1.8 and 2.5 (*i.e.* borderline positive) (10). However, as the same dataset was used for setting the SI-values and calculating the predictive properties of the test, the stated results may be an over-estimation of the real predictive properties.

PRINCIPLE OF THE TEST

6. The basic principle underlying the LLNA: DA is that sensitizers induce proliferation of lymphocytes in the lymph nodes draining the site of test substance application. This proliferation is proportional to the dose and to the potency of the applied allergen and provides a simple means of obtaining a quantitative measurement of sensitization. Proliferation is measured by comparing the mean proliferation in each test group to the mean proliferation in the vehicle treated control (VC) group. The ratio of the mean proliferation in each treated group to that in the concurrent VC group, termed the SI_i , is determined, and should be ≥ 1.8 before further evaluation of the test substance as a potential skin sensitizer is warranted. The methods described here are based on the use of measuring ATP content by bioluminescence (known to correlate with living cell number) (17) to indicate an increased number of proliferating cells in the draining auricular lymph nodes (18) (19). The bioluminescent method utilises the luciferase enzyme to catalyse the formation of light from ATP and luciferin according to the following reaction:



The emitted light intensity is linearly related to the ATP concentration and is measured using a luminometer. The luciferin-luciferase assay is a sensitive method for ATP quantitation used in a wide variety of applications (20).

DESCRIPTION OF THE ASSAY

Selection of animal species

7. The mouse is the species of choice for this test. Validation studies for the LLNA: DA were conducted exclusively with the CBA/J strain, which is therefore considered the preferred strain (12) (13).

Young adult female mice, which are nulliparous and non-pregnant, are used. At the start of the study, animals should be between 8-12 weeks old, and the weight variation of the animals should be minimal and not exceed 20% of the mean weight. Alternatively, other strains and males may be used when sufficient data are generated to demonstrate that significant strain and/or gender-specific differences in the LLNA: DA response do not exist.

Housing and feeding conditions

8. Mice should be group-housed (21), unless adequate scientific rationale for housing mice individually is provided. The temperature of the experimental animal room should be $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Although the relative humidity should be at least 30% and preferably not exceed 70%, other than during room cleaning, the aim should be 50-60%. Lighting should be artificial, the sequence being 12 hours light, 12 hours dark. For feeding, conventional laboratory diets may be used with an unlimited supply of drinking water.

Preparation of animals

9. The animals are randomly selected, marked to permit individual identification (but not by any form of ear marking), and kept in their cages for at least five days prior to the start of dosing to allow for acclimatisation to the laboratory conditions. Prior to the start of treatment all animals are examined to ensure that they have no observable skin lesions.

Preparation of dosing solutions

10. Solid test substances should be dissolved or suspended in solvents/vehicles and diluted, if appropriate, prior to application to an ear of the mice. Liquid test substances may be applied neat or diluted prior to dosing. Insoluble test substances, such as those generally seen in medical devices, should be subjected to an exaggerated extraction in an appropriate solvent to reveal all extractable constituents for testing prior to application to an ear of the mice. Test substances should be prepared daily unless stability data demonstrate the acceptability of storage.

Reliability check

11. Positive controls (PC) are used to demonstrate appropriate performance of the assay by responding with adequate and reproducible sensitivity to a sensitizing test substance for which the magnitude of the response is well characterised. Inclusion of a concurrent PC is recommended because it demonstrates competency of the laboratory to successfully conduct each assay and allows for an assessment of intra-, and inter-laboratory reproducibility and comparability. Some regulatory authorities also require a PC for each study and therefore users are encouraged to consult the relevant authorities prior to conducting the LLNA: DA. Accordingly, the routine use of a concurrent PC is encouraged to avoid the need for additional animal testing to meet such requirements that might arise from the use of a periodic PC (see paragraph 12). The PC should produce a positive LLNA: DA response at an exposure level expected to give an increase in the $SI \geq 1.8$ over the negative control (NC) group. The PC dose should be chosen such that it does not cause excessive skin irritation or systemic toxicity and the induction is reproducible but not excessive (e.g. $SI > 10$ would be considered excessive). Preferred PC test substances are 25% hexyl cinnamic aldehyde (Chemical Abstracts Service [CAS] No 101-86-0) and 25% eugenol (CAS No 97-53-0) in acetone: olive oil (4:1, v/v). There may be circumstances in which, given adequate justification, other PC test substances, meeting the above criteria, may be used.

12. While inclusion of a concurrent PC group is recommended, there may be situations in which periodic testing (i.e. at intervals ≤ 6 months) of the PC test substance may be adequate for laboratories that conduct the LLNA: DA regularly (i.e. conduct the LLNA: DA at a frequency of no less than once per

442A

OECD/OCDE

month) and have an established historical PC database that demonstrates the laboratory's ability to obtain reproducible and accurate results with PCs. Adequate proficiency with the LLNA: DA can be successfully demonstrated by generating consistent positive results with the PC in at least 10 independent tests conducted within a reasonable period of time (*i.e.* less than one year).

13. A concurrent PC group should always be included when there is a procedural change to the LLNA: DA (*e.g.* change in trained personnel, change in test method materials and/or reagents, change in test method equipment, change in source of test animals), and such changes should be documented in laboratory reports. Consideration should be given to the impact of these changes on the adequacy of the previously established historical database in determining the necessity for establishing a new historical database to document consistency in the PC results.

14. Investigators should be aware that the decision to conduct a PC study on a periodic basis instead of concurrently has ramifications on the adequacy and acceptability of negative study results generated without a concurrent PC during the interval between each periodic PC study. For example, if a false negative result is obtained in the periodic PC study, negative test substance results obtained in the interval between the last acceptable periodic PC study and the unacceptable periodic PC study may be questioned. Implications of these outcomes should be carefully considered when determining whether to include concurrent PCs or to only conduct periodic PCs. Consideration should also be given to using fewer animals in the concurrent PC group when this is scientifically justified and if the laboratory demonstrates, based on laboratory-specific historical data, that fewer mice can be used (22).

15. Although the PC test substance should be tested in the vehicle that is known to elicit a consistent response (*e.g.* acetone: olive oil; 4:1, v/v), there may be certain regulatory situations in which testing in a non-standard vehicle (clinically/chemically relevant formulation) will also be necessary (23). If the concurrent PC test substance is tested in a different vehicle than the test substance, then a separate VC for the concurrent PC should be included.

16. In instances where test substances of a specific chemical class or range of responses are being evaluated, benchmark test substances may also be useful to demonstrate that the test method is functioning properly for detecting the skin sensitization potential of these types of test substances. Appropriate benchmark substances should have the following properties:

- structural and functional similarity to the class of the test substance being tested;
- known physical/chemical characteristics;
- supporting data from the LLNA: DA;
- supporting data from other animal models and/or from humans.

TEST PROCEDURE

Number of animals and dose levels

17. A minimum of four animals is used per dose group, with a minimum of three concentrations of the test substance, plus a concurrent NC group treated only with the vehicle for the test substance, and a PC (concurrent or recent, based on laboratory policy in considering paragraphs 11-15). Testing multiple doses of the PC should be considered, especially when testing the PC on an intermittent basis. Except for absence of treatment with the test substance, animals in the control groups should be handled and treated in a manner identical to that of animals in the treatment groups.

18. Dose and vehicle selection should be based on the recommendations given in references (2) and (24). Consecutive doses are normally selected from an appropriate concentration series such as 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, etc. Adequate scientific rationale should accompany the selection of the concentration series used. All existing toxicological information (e.g. acute toxicity and dermal irritation) and structural and physicochemical information on the test substance of interest (and/or structurally related test substances) should be considered, where available, in selecting the three consecutive concentrations so that the highest concentration maximises exposure while avoiding systemic toxicity and/or excessive local skin irritation (24) (25). In the absence of such information, an initial pre-screen test may be necessary (see paragraphs 21-24).

19. The vehicle should not interfere with or bias the test result and should be selected on the basis of maximising the solubility in order to obtain the highest concentration achievable while producing a solution/suspension suitable for application of the test substance. Recommended vehicles are acetone: olive oil (4:1 v/v), *N,N*-dimethylformamide, methyl ethyl ketone, propylene glycol, and dimethyl sulphoxide (6) but others may be used if sufficient scientific rationale is provided. In certain situations it may be necessary to use a clinically relevant solvent or the commercial formulation in which the test substance is marketed as an additional control. Particular care should be taken to ensure that hydrophilic substances are incorporated into a vehicle system, which wets the skin and does not immediately run off, by incorporation of appropriate solubilisers (e.g. 1% Pluronic® L92). Thus, wholly aqueous vehicles are to be avoided.

20. The processing of lymph nodes from individual mice allows for the assessment of inter-animal variability and a statistical comparison of the difference between test substance and VC group measurements (see paragraph 33). In addition, evaluating the possibility of reducing the number of mice in the PC group is only feasible when individual animal data are collected (22). Further, some national regulatory authorities require the collection of individual animal data. Regular collection of individual animal data provides an animal welfare advantage by avoiding duplicate testing that would be necessary if the test substance results originally collected in one manner (e.g. via pooled animal data) were to be considered later by regulatory authorities with other requirements (e.g. individual animal data).

Pre-screen test

21. In the absence of information to determine the highest dose to be tested (see paragraph 18), a pre-screen test should be performed in order to define the appropriate dose level to test in the LLNA: DA. The purpose of the pre-screen test is to provide guidance for selecting the maximum dose level to use in the main LLNA: DA study, where information on the concentration that induces systemic toxicity (see paragraph 24) and/or excessive local skin irritation (see paragraph 23) is not available. The maximum dose level tested should be 100% of the test substance for liquids or the maximum possible concentration for solids or suspensions.

22. The pre-screen test is conducted under conditions identical to the main LLNA: DA study, except there is no assessment of lymph node proliferation and fewer animals per dose group can be used. One or two animals per dose group are suggested. All mice will be observed daily for any clinical signs of systemic toxicity or local irritation at the application site. Body weights are recorded pre-test and prior to termination (Day 8). Both ears of each mouse are observed for erythema and scored using Table 1 (25). Ear thickness measurements are taken using a thickness gauge (e.g. digital micrometer or Peacock Dial thickness gauge) on Day 1 (pre-dose), Day 3 (approximately 48 hours after the first dose), Day 7 (24 hours prior to termination) and Day 8. Additionally on Day 8, ear thickness could be determined by ear punch weight determinations, which should be performed after the animals are humanely killed. Excessive local irritation is indicated by an erythema score ≥ 3 and/or ear thickness of $\geq 25\%$ on any day of measurement (26) (27). The highest dose selected for the main LLNA: DA study will be the next lower dose in the pre-

442A

OECD/OCDE

screen concentration series (see paragraph 18) that does not induce systemic toxicity and/or excessive local skin irritation.

Table 1. Erythema Scores

Observation	Score
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to eschar formation preventing grading of erythema	4

23. In addition to a 25% increase in ear thickness (26) (27), a statistically significant increase in ear thickness in the treated mice compared to control mice has also been used to identify irritants in the LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). However, while statistically significant increases can occur when ear thickness is less than 25% they have not been associated specifically with excessive irritation (30) (31) (32) (33) (34).

24. The following clinical observations may indicate systemic toxicity (35) when used as part of an integrated assessment and therefore may indicate the maximum dose level to use in the main LLNA: DA: changes in nervous system function (*e.g.* pilo-erection, ataxia, tremors, and convulsions); changes in behaviour (*e.g.* aggressiveness, change in grooming activity, marked change in activity level); changes in respiratory patterns (*i.e.* changes in frequency and intensity of breathing such as dyspnea, gasping, and rales), and changes in food and water consumption. In addition, signs of lethargy and/or unresponsiveness and any clinical signs of more than slight or momentary pain and distress, or a >5% reduction in body weight from Day 1 to Day 8 and mortality, should be considered in the evaluation. Moribund animals or animals showing signs of severe pain and distress should be humanely killed (36).

Main study experimental schedule

25. The experimental schedule of the assay is as follows:

- Day 1:
Individually identify and record the weight of each animal and any clinical observation. Apply 1% sodium lauryl sulfate (SLS) aqueous solution to the dorsum of each ear by using a brush dipped in the SLS solution to cover the entire dorsum of each ear with four to five strokes. One hour after the SLS treatment, apply 25 µL of the appropriate dilution of the test substance, the vehicle alone, or the PC (concurrent or recent, based on laboratory policy in considering paragraphs 11-15), to the dorsum of each ear.
- Days 2, 3 and 7:
Repeat the 1% SLS aqueous solution pre-treatment and test substance application procedure carried out on Day 1.
- Days 4, 5, and 6:
No treatment.
- Day 8:

Record the weight of each animal and any clinical observation. Approximately 24 to 30 hours after the start of application on Day 7, humanely kill the animals. Excise the draining auricular lymph nodes from each mouse ear and process separately in phosphate buffered saline (PBS) for each animal. Details and diagrams of the lymph node identification and dissection can be found in reference (22). To further monitor the local skin response in the main study, additional parameters such as scoring of ear erythema or ear thickness measurements (obtained either by using a thickness gauge, or ear punch weight determinations at necropsy) may be included in the study protocol.

Preparation of cell suspensions

26. From each mouse, a single-cell suspension of lymph node cells (LNC) excised bilaterally is prepared by sandwiching the lymph nodes between two glass slides and applying light pressure to crush the nodes. After confirming that the tissue has spread out thinly pull the two slides apart. Suspend the tissue on both slides in PBS by holding each slide at an angle over the Petri dish and rinsing with PBS while concurrently scraping the tissue off of the slide with a cell scraper. Further, the lymph nodes in NC animals are small, so careful operation is important to avoid any artificial effects on SI values. A total volume of 1 mL PBS should be used for rinsing both slides. The LNC suspension in the Petri dish should be homogenised lightly with the cell scraper. A 20 µL aliquot of the LNC suspension is then collected with a micropipette, taking care not to take up the membrane that is visible to the eye, and subsequently mixed with 1.98 mL of PBS to yield a 2 mL sample. A second 2 mL sample is then prepared using the same procedure so that two samples are prepared for each animal.

Determination of cellular proliferation (measurement of ATP content of lymphocytes)

27. Increases in ATP content in the lymph nodes are measured by the luciferin/luciferase method using an ATP measurement kit, which measures bioluminescence in Relative Luminescence Units (RLU). The assay time from time of animal sacrifice to measurement of ATP content for each individual animal should be kept uniform, within approximately 30 minutes, because the ATP content is considered to gradually decrease with time after animal sacrifice (12). Thus, the series of procedures from excision of auricular lymph nodes to ATP measurement should be completed within 20 minutes by the pre-determined time schedule that is the same for each animal. ATP luminescence should be measured in each 2 mL sample so that a total of two ATP measurements are collected for each animal. The mean ATP luminescence is then determined and used in subsequent calculations (see paragraph 31).

OBSERVATIONS

Clinical observations

28. Each mouse should be carefully observed at least once daily for any clinical signs, either of local irritation at the application site or of systemic toxicity. All observations are systematically recorded with records being maintained for each mouse. Monitoring plans should include criteria to promptly identify those mice exhibiting systemic toxicity, excessive local skin irritation, or corrosion of skin for euthanasia (36).

Body weights

29. As stated in paragraph 25, individual animal body weights should be measured at the start of the test and at the scheduled humane kill.

442A

OECD/OCDE

CALCULATION OF RESULTS

30. Results for each treatment group are expressed as the mean SI. The SI is derived by dividing the mean RLU/mouse within each test substance group and the PC group by the mean RLU/mouse for the solvent/VC group. The average SI for the VCs is then one.

31. The decision process regards a result as positive when $SI \geq 1.8$ (10). However, the strength of the dose-response relationship, the statistical significance and the consistency of the solvent/vehicle and PC responses may also be used when determining whether a borderline result (*i.e.* SI value between 1.8 and 2.5) is declared positive (2) (3) (37).

32. For a borderline positive response between an SI of 1.8 and 2.5, users may want to consider additional information such as dose-response relationship, evidence of systemic toxicity or excessive irritation, and where appropriate, statistical significance together with SI values to confirm that such results are positives (10). Consideration should also be given to various properties of the test substance, including whether it has a structural relationship to known skin sensitizers, whether it causes excessive skin irritation in the mouse, and the nature of the dose-response relationship observed. These and other considerations are discussed in detail elsewhere (4).

33. Collecting data at the level of the individual mouse will enable a statistical analysis for presence and degree of dose-response relationship in the data. Any statistical assessment could include an evaluation of the dose-response relationship as well as suitably adjusted comparisons of test groups (*e.g.* pair-wise dosed group versus concurrent solvent/vehicle control comparisons). Statistical analyses may include, *e.g.* linear regression or Williams's test to assess dose-response trends, and Dunnett's test for pair-wise comparisons. In choosing an appropriate method of statistical analysis, the investigator should maintain an awareness of possible inequalities of variances and other related problems that may necessitate a data transformation or a non-parametric statistical analysis. In any case, the investigator may need to carry out SI calculations and statistical analyses with and without certain data points (sometimes called "outliers").

DATA AND REPORTING

Data

34. Data should be summarised in tabular form showing the individual animal RLU values, the group mean RLU/animal, its associated error term (*e.g.* SD, SEM), and the mean SI for each dose group compared against the concurrent solvent/vehicle control group.

Test report

35. The test report should contain the following information:

Test substance and control test substances:

- identification data (*e.g.* CAS number, if available; source; purity; known impurities; lot number);
- physical nature and physicochemical properties (*e.g.* volatility, stability, solubility);
- if formulation, composition and relative percentages of components;

Solvent/vehicle:

- identification data (purity; concentration, where appropriate; volume used);

- justification for choice of vehicle;

Test animals:

- source of CBA mice;
- microbiological status of the animals, when known;
- number and age of animals;
- source of animals, housing conditions, diet, etc;

Test conditions:

- the source, lot number and manufacturer's quality assurance/quality control data for the ATP kit;
- details of test substance preparation and application;
- justification for dose selection (including results from pre-screen test, if conducted);
- vehicle and test substance concentrations used, and total amount of test substance applied;
- details of food and water quality (including diet type/source, water source);
- details of treatment and sampling schedules;
- methods for measurement of toxicity;
- criteria for considering studies as positive or negative;
- details of any protocol deviations and an explanation on how the deviation affects the study design and results;

Reliability check:

- a summary of results of latest reliability check, including information on test substance, concentration and vehicle used;
- concurrent and/or historical PC and concurrent negative (solvent/vehicle) control data for testing laboratory;
- if a concurrent PC was not included, the date and laboratory report for the most recent periodic PC and a report detailing the historical PC data for the laboratory justifying the basis for not conducting a concurrent PC;

Results:

- individual weights of mice at start of dosing and at scheduled kill; as well as mean and associated error term (*e.g.* SD, SEM) for each treatment group;
- time course of onset and signs of toxicity, including dermal irritation at site of administration, if any, for each animal;
- time of animal sacrifice and time of ATP measurement for each animal;
- a table of individual mouse RLU values and SI values for each dose treatment group;
- mean and associated error term (*e.g.* SD, SEM) for RLU/mouse for each treatment group and the results of outlier analysis for each treatment group;
- calculated SI and an appropriate measure of variability that takes into account the inter-animal variability in both the test substance and control groups;
- dose response relationship;
- statistical analyses, where appropriate;

Discussion of results:

442A

OECD/OCDE

- a brief commentary on the results, the dose-response analysis, and statistical analyses, where appropriate, with a conclusion as to whether the test substance should be considered a skin sensitizer.

LITERATURE

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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) 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
- (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, 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, 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, 249-257.
- (10) 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: [\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/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: [\[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf).

442A

OECD/OCDE

- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (15) 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.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) 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
- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) 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.
- (25) 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>

- (26) 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.
- (27) 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>].
- (28) 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.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) 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.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm]
- (36) 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>]
- (37) 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.

442A

OECD/OCDE

- (38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

ANNEX 1

DEFINITIONS

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with “concordance” to mean the proportion of correct outcomes of a test method (38).

Benchmark substance: A sensitizing or non-sensitizing substance used as a standard for comparison to a test substance. A benchmark substance should have the following properties; (i) a consistent and reliable source(s); (ii) structural and functional similarity to the class of substances being tested; (iii) known physical/chemical characteristics; (iv) supporting data on known effects, and (v) known potency in the range of the desired response.

False negative: A substance incorrectly identified as negative or non-active by a test method, when in fact it is positive or active.

False positive: A substance incorrectly identified as positive or active by a test, when in fact it is negative or non-active.

Hazard: The potential for an adverse health or ecological effect. The adverse effect is manifested only if there is an exposure of sufficient level.

Inter-laboratory reproducibility: A measure of the extent to which different qualified laboratories, using the same protocol and testing the same test substances, can produce qualitatively and quantitatively similar results. Inter-laboratory reproducibility is determined during the pre-validation and validation processes, and indicates the extent to which a test can be successfully transferred between laboratories, also referred to as between-laboratory reproducibility (38).

Intra-laboratory reproducibility: A determination of the extent that qualified people within the same laboratory can successfully replicate results using a specific protocol at different times. Also referred to as within-laboratory reproducibility (38).

Outlier: An outlier is an observation that is markedly different from other values in a random sample from a population.

Quality assurance: A management process by which adherence to laboratory testing standards, requirements, and record keeping procedures, and the accuracy of data transfer, are assessed by individuals who are independent from those performing the testing.

Reliability: Measures of the extent that a test method can be performed reproducibly within and between laboratories over time, when performed using the same protocol. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility (38).

Skin sensitization: An immunological process that results when a susceptible individual is exposed topically to an inducing chemical allergen, which provokes a cutaneous immune response that can lead to the development of contact sensitization.

Stimulation Index (SI): A value calculated to assess the skin sensitization potential of a test substance that is the ratio of the proliferation in treated groups to that in the concurrent vehicle control group.

442A**OECD/OCDE**

Test substance: Any material tested using this TG, whether it is a single compound or consists of multiple components (e.g. final products, formulations). When testing formulations, consideration should be given to the fact that certain regulatory authorities only require testing of the final product formulation. However, there may also be testing requirements for the active ingredient(s) of a product formulation.

“화장품 등 피부감작성 동물대체시험법(국소림프절시험법: DA) 가이드라인(민원인 안내서)”

발행일	2021년 8월
발행인	식품의약품안전평가원장 서경원
편집위원장	독성평가연구부장 정자영
편집위원	윤해성, 김광진, 윤소영, 강남희, 이정선, 이용선, 홍미혜, 차민희, 김수용
도움주신분	김규봉(단국대학교), 허용(대구가톨릭대학교), 정미숙(바이오톡스텍)
문의처	식품의약품안전평가원, 특수독성과 Tel : 043-719-5153, 5155 Fax : 043-719-5150
주소	충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

공익신고자 보호제도란?

- 공익신고자등(친족 또는 동거인 포함)이 공익신고등으로 인하여 피해를 받지 않도록 비밀보장, 불이익보호조치, 신분보호조치 등을 통하여 보호하는 제도

[공직자 부조리 및 공직신고안내]

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 >공직자 부조리 신고” 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 “국민소통 >신고 센터 >부패·공익신고 상담” 코너

보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과.
전화 044-200-7773

