

발간등록번호

11-1471000-000420-14

# 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (국소림프절시험법) 가이드라인 (민원인 안내서)

2021. 8.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

독성평가연구부 특수독성과

# 지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

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

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

<b>등록대상 여부</b>	<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.		
<b>지침서·안내서 구분</b>	<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
<b>기타 확인 사항</b>	<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.	
<b>상기 사항에 대하여 확인하였음.</b>		
<b>2021년 8월 31일</b>		
<b>담당자 확 인(부서장)</b>		<b>강남희 김광진</b>

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	B1-2007-4-002	2007.11.	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(I) 제정
2	안내서-0748-01	2017.5.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16) 제목을 “ 화장품 등 피부감작성
3	안내서-1142-01	2021.8.	동물대체시험법(국소림프절시험법) 가이드라인”으로 수정, 내용 정비 및 OECD 가이드라인 영문본을 추가하여 개정

# 목 차

I. 개요 .....	6
II. 시험원리 .....	6
III. 제한점 및 고려사항 .....	7
IV. 시험방법 .....	7
V. 결과 판정 .....	11
VI. 시험결과 및 보고 .....	12

- 별첨 1 : 번역본 (OECD TG 429)
- 별첨 2 : 원문 (OECD TG 429)

# 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (국소림프절시험법) 가이드라인

## I. 개요

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

본 시험법은 피부감작성 반응 중 유도기(induction phase)에 나타나는 반응을 측정하는 것으로 시험물질 적용 부위와 가까운 림프절 내에서 증식된 세포를 생체내(*in vivo*) 방사능 표지법(radioactive labelling)을 이용해 정량적으로 측정하여 피부감작물질을 구별한다.

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

## II. 시험원리

LLNA 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 방사성 동위원소로 표지된 티미딘(예:  $^3\text{H}$ -thymidine) 양을 측정하여 평가한다.  $^3\text{H}$ -thymidine은 분열 중인 세포로 유입되며 섬광 계수기(scintillation counting)를 사용하여 측정한다. 티미딘의 유입량은 세포 증식의 양에 비례한다. 시험결과는 부형제대조군의 평균 증식에 대한 시험물질군의 평균 증식의 비율인 감작지수(Stimulation Index, SI)로 나타내며, 시험물질을 피부감작물질로 판정하기 위해서는 SI 지수가 3 이상( $\text{SI} \geq 3$ )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 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 시험법 적용에는 제한이 있기 때문에 기니픽 시험(TG 406)이 필요할 수 있다.

### IV. 시험방법

#### 4.1 실험동물 및 시험물질 준비

실험동물은 CBA/Ca 또는 CBA/J 계통의 마우스를 사용하며 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 전에 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)<sup>1)</sup>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 구조적

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

으로 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% 헥실시나믹알데히드(hexyl cinnamic aldehyde, HCA)(CAS 번호 101-86-0)와 N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide)에 희석한 5% 머캅토벤조티아졸(mercaptobenzothiazole)(CAS No 149-30-4)이 권장된다. 동시 양성대조군을 포함하는 것을 권장하지만 LLNA 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(별첨 1-12항 참조).

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

## 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 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(6일차)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
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. 시험물질 희석액 25  $\mu$ L, 부형제 또는 양성대조물질(실험실 방침에 근거한 동시 또는 최근에 사용된 양성대조물질)을 각 귓등에 바른다. 2일차에는 1일차의 적용 절차를 반복하고, 일반증상 및 홍반을 관찰한다. 3일차에는 1일차의 적용 절차를 반복하고, 귀두께를 측정하며 일반증상 및 홍반을 관찰한다. 4일차 및 5일차에는 일반증상 및 홍반을 관찰하고, 아무것도 처리하지 않는다. 6일차에는 ( $^3$ H)-methylthymidine 20  $\mu$  Ci( $7.4 \times 10^5$  Bq)가 포함된 인산완충용액(PBS) 250  $\mu$ L를 모든 시험군 및 대조군 마우스의 꼬리 정맥에 주사한다. 또는 2  $\mu$  Ci( $7.4 \times 10^4$  Bq)  $^{125}$ I-iododeoxyuridine 및  $10^{-5}$ M fluorodeoxyuridine가 포함된 PBS 250  $\mu$ L를 꼬리 정맥에 주사한다. 5시간 후 마우스를 안락사 시킨다. 또한 각 마우스의 체중, 귀두께, 홍반 및 일반증상을 관찰하여 기록한다. 각 마우스에서 시험물질을 도포한 부위의 이개 림프절을 절개하고 각 동물별로 PBS에 넣어 보관하거나(개별 동물 접근법) 각 투여군 별로 PBS에 넣어 보관한다.

다(집단 투여군 접근법)(표 3).

표 3. 본시험 일정

	1일	2일	3일	4일	5일	6일
일반증상 관찰	○	○	○	○	○	○
체중 측정	○					○
귀두께 측정	○		○			○
홍반 평가		○	○	○	○	○
물질 도포	○	○	○			
방사성동위원소 용액 주사						○
안락사						○

림프절 단일세포 현탁액은 200 마이크로 메쉬 스테인리스 스틸 거즈를 통한 부드러운 물리적인 분해 방법이나 또는 단일 세포 현탁액을 만들 수 있는 다른 기법 등을 이용하여 준비한다. 림프절 세포 현탁액에서 DNA는 5% trichloroacetic acid(TCA)로 침전시키며, (<sup>3</sup>H)-methylthymidine의 결합(incorporation)은 β-scintillation counting으로 측정하고 <sup>125</sup>I-iododeoxyuridine의 결합은 <sup>125</sup>I 계수로 측정한다.

#### 4.4 rLLNA

특정 상황에서 피부감작 가능성의 음성 예측을 확인하기 위한 규제적 요구가 있는 경우, 더 적은 수의 동물을 사용하는 rLLNA(reduced LLNA) 시험법을 사용할 수 있다. 그러나 rLLNA 시험법을 사용하기 위해서는 사용에 대한 명확한 타당성 및 과학적 근거를 제시해야 한다. 또한 rLLNA는 용량-반응 정보를 제공하지 않기 때문에 이러한 정보가 필요한 경우에는 rLLNA를 사용해서는 안 된다.

#### 4.5 결과 평가

각 시험물질군의 결과는 평균 감작지수로 나타낸다.

- (1) 개별 동물 접근법을 사용하는 경우, 감작지수는 각 시험물질군과 양성대조군 마우스의 평균 DPM(disintegrations per minute) 값을 부형제대조군의 평균 DPM 값으로 나누어 계산한다.

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

(2) 집단 투여군 접근법을 사용하는 경우, 감작지수는 각 시험물질군의 집단 DPM 값을 집단 부형제대조군의 DPM 값으로 나누어 계산하며 이를 통해 평균 감작지수 값을 산출한다.

## V. 결과 판정

### 5.1 결과 판정

판정기준은 평균 감작지수가 3 이상( $SI \geq 3$ )일 때 결과를 양성으로 간주한다.

감작지수(SI)	판정
$\geq 3$	피부감작성
$< 3$	비감작성

하지만 경계값 결과에 대해서는 이러한 결과 값이 양성임을 확인하기 위해 SI 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 SI가 20을 초과하는( $> 20$ ) 과도한 피부자극 또는 전신독성을 나타내지 않는 농도에서 부형제대조군 대비 SI가 3 이상( $\geq 3$ )으로 양성 반응을 나타내야 한다.

## VI. 시험결과 및 보고

데이터는 표 형식으로 요약한다. 개별 동물 접근법을 사용하는 경우 개별 동물 DPM 값, DPM 값의 그룹 평균, 관련 오차(예: 표준편차(SD) 또는 표준오차(SEM)), 동시 부형제대조군 대비 각 투여군의 평균 SI를 나타낸다. 집단 투여군 접근법을 사용하는 경우 DPM의 평균/중간 값, 동시 부형제대조군과 비교한 각 투여군의 평균 SI를 나타낸다. 시험결과보고서에는 다음의 내용을 포함하도록 한다.

### 시험물질

- 식별 데이터(예: CAS 번호(가능한 경우), 출처, 순도, 알려진 불순물, 로트 번호)
- 물리적 성질 및 물리화학적 특성(예: 휘발성, 안정성, 용해도)
- 용매/부형제의 식별 데이터(예: 순도, 농도 등)
- 부형제 선정의 타당성에 대한 근거

### 실험동물

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

### 시험조건

- 시험물질 준비와 적용 등에 관한 세부사항
- 투여 용량 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, 양성대조군, 부형제 대조군 등)
- 실험실의 동시 또는 과거 양성대조군과 동시 부형제대조군 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 DPM 값 및 SI 값을 담은 표(개별 동물 접근법) 또는 DPM 값 및 SI 값의 평균/중간 값을 담은 표(집단 투여군 접근법)
- 개별 동물 접근법을 사용하는 경우 각 처리군 마우스의 DPM 평균 및 관련 오차(예: SD, SEM)와 각 처리군의 이상치(outliers) 분석 결과
- 용량-반응 상관성, 통계 분석(적절한 경우)

## 결과 토의

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

피부감작성: 국소림프절시험법

Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay

**개요**

1. OECD 화학물질 시험 가이드라인은 과학 발전 및 규제 요구의 변화, 동물 복지 등을 고려하여 주기적으로 검토되고 있다. 마우스에서 피부감작성을 확인하기 위한 최초의 시험 가이드라인인 국소림프절시험법(LLNA, TG 429)은 2002년에 채택되었다(1). LLNA 시험법 검증의 세부 사항 및 관련 연구에 대한 검토 내용이 발표되었다(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11). 개정된 LLNA 시험법은 경험 내용 및 과학적 데이터의 평가에 기반한다(12). 본 문서는 동물에서 화학물질의 피부감작 가능성을 평가하기 위해 개발된 두 번째 시험 가이드라인이다. 다른 피부감작성 시험 가이드라인(TG 406)은 기니픽 시험, 특히 기니픽 극대화 시험 및 Buehler 시험을 이용한다(13). LLNA 시험법은 동물 복지 측면에서 TG 406(13)보다 장점을 가진다. 개정된 본 LLNA 시험 가이드라인에 포함된 유사시험법평가기준(Performance Standards, PS)(부록 2)은 지침서 34(14)의 원칙에 따라 LLNA와 기능적 및 기전적으로 유사한 신규 또는 개정된 시험법의 유효성을 평가하는 데 사용될 수 있다.

2. LLNA 시험법은 피부감작성의 유도기(induction phase)를 다루며 용량-반응 평가에 적절한 정량적 데이터를 제공한다. 기니픽 시험법(TG 406)(13)의 양성대조물질로 권장되는 약한/중간의 피부감작물질도 LLNA를 사용하는데 적합하다는 점을 주목해야 한다(6)(8)(15). rLLNA(reduced LLNA) 접근법은 실험동물의 수를 40%까지 줄일 수 있으며 본 시험 가이드라인에서 선택사항으로 기술된다(16)(17)(18). rLLNA는 본 시험 가이드라인에 기술된 바와 같이 다른 모든 LLNA 프로토콜 기준(specifications)을 준수하고, 피부감작 가능성의 음성 예측을 확인하기 위한 규제적 요구가 있는 경우 사용할 수 있다. 음성 결과의 예측은 4항에 기술된 모든 유효한 정보를 기반으로 이루어져야 한다. rLLNA 접근법을 적용하기 전에 해당 접근법 사용에 대한 명확한 타당성 및 과학적 근거를 제공해야 한다. rLLNA에서 예상과 달리 양성 또는 불분명한 결과가 나오는 경우에는 결과를 해석하거나 명확하게 하기 위해 추가 시험이 필요할 수 있다.

UN의 화학물질 분류 및 표시에 관한 국제조화 시스템(UN Globally Harmonized System of classification and Labelling of Chemical, UN GHS)의 하위 카테고리처럼 용량-반응 정보가 필요한 경우에는 피부감작성 시험물질의 유해성 식별을 위해 rLLNA를 사용해서는 안 된다.

3. 용어정의는 부록 1에 수록되어 있다.

## 초기 고려사항 및 제한점

4. LLNA 시험법은 피부감작물질 식별을 위한 대체시험법이다. 이는 모든 경우에 기니픽 시험(TG 406)(13)을 대신하여 LLNA 시험법을 사용해야 한다는 의미가 아니라, LLNA 시험법이 동일한 기능을 가지며 양성 및 음성 결과에 일반적으로 더 이상 추가적인 확인이 필요하지 않은 대체시험법으로 사용할 수 있는 것이다. 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 시험법이 해당 시험물질에 적합한지(일부 화학물질의 경우 LLNA 시험법을 사용할 수 없음[5항 참조])를 결정하는 것과 투여용량을 설정하는데에 이러한 정보를 참고해야 한다.

5. LLNA 시험법은 생체내 시험법으로서, 알레르기성 접촉 감작 활성화(allergic contact sensitising activity)의 평가에 동물 사용을 배제할 수 없지만 알레르기성 접촉 감작 활성을 평가하는데 사용되는 동물의 수를 줄일 수 있다. 또한 LLNA 시험법은 알레르기성 접촉 감작성 시험에서 동물의 사용 방식을 상당히 개선(통증 및 고통 경감)한다. LLNA 시험법은 감작성의 유도기(induction phase) 동안 시험물질에 의해 활성화된 면역반응에 기초하고 있다. LLNA 시험법은 기니픽 시험(TG 406)(13)과는 달리 야기(challenge)에 의해 유도되는 피부 과민반응 유발이 필요하지 않다. 또한, LLNA 시험법은 기니픽 극대화 시험(13)처럼 보조제(adjuvant)를 사용하지 않기 때문에 동물의 통증 및 고통을 줄여준다. TG 406(4)에 비해 LLNA 시험법의 이점이 있음에도 불구하고, 일부 제한점으로 인해 TG 406 시험법이 필요한 경우가 있다(예: 특정 금속물질의 LLNA 위음성 결과, 특정 피부자극물질의 위양성 결과[일부 계면활성제 유형의 물질](19)(20) 또는 시험물질의 용해도)(13). 또한 잠재적 교란기능의 작용기를 포함하는 시험물질류(test chemical classes) 또는 단일 시험물질(substances)의 경우(21) 기니픽 시험(TG 406)(13)이 필요할 수 있다. 또한 대부분 농약제제(formulations)로 구성된 제한된

LLNA 검증연구 데이터베이스에 근거하여 LLNA 시험법은 기니픽 시험보다 이러한 제제의 시험물질에 대해 양성 결과를 나타낼 가능성이 더 높다(22). 그러나 제제를 시험하는 경우 LLNA 시험법이 제대로 기능한다는 것을 입증하기 위해 결과가 알려진 유사한 시험물질을 기준시험물질(benchmark test substances)로서 포함시키는 것을 고려할 수 있다(16항 참조). 이와 같이 확인된 제한점을 제외하면 시험물질의 특성이 LLNA 시험법의 정확도에 영향을 주지 않는 한, 모든 시험물질에 적용할 수 있다.

## 시험 원리

6. LLNA 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, Stimulation Index, SI)을 계산하며, 시험물질을 피부감작물질로 판정하기 위해서는 SI 지수가 3 이상( $SI \geq 3$ )이어야 한다. 본 가이드라인의 시험법은 물질 적용 부위의 이개 림프절(auricular lymph node)에서 증식된 세포수의 증가를 측정하기 위해 생체내(*in vivo*) 방사능 표지법(radioactive labelling)을 활용하는 것에 기초한다. 그러나 유사시험법평가기준의 요건을 완전히 충족하는 경우 증식된 세포수를 평가하기 위해 다른 평가항목(endpoint)을 사용할 수 있다(부록 2).

## 시험 설명

### 동물종 선택

7. 실험동물로는 건강한 마우스를 사용한다. 임신 및 출산 경험이 없는 암컷 CBA/Ca 또는 CBA/J 계통의 마우스를 사용한다. 시험 시작 시 마우스는 8~12주령이어야 하며, 체중 편차는 최소로 하되 평균 체중의 20%를 초과해서는 안 된다. LLNA 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(23)해야 한다. 실험동물실의 온도는  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지되어야 하고, 상대 습도는 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 시험 물질들은 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 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 3 이상( $\geq$ )으로 예상되는 노출 수준에서 LLNA 양성 반응을 나타내어야 한다. 양성대조물질의 용량은 과도한 피부자극 또는 전신독성은 야기하지 않고, 유도반응을 재현성 있고 과도하지 않게(예: SI > 20은 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 번

호 101-86-0)와 N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide)에 희석한 5% 머캅토벤조티아졸(mercaptobenzothiazole) (CAS No 149-30-4)이다(부록 2의 표 1 참조). 충분한 타당성이 제시되는 경우, 위의 기준에 부합하는 다른 양성대조물질을 사용할 수 있다.

12. 동시 양성대조군의 포함을 권장하는 반면, LLNA 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 시험법의 숙련도를 보일 수 있다.

13. LLNA 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 문서화하기 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(12).

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(24). 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 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 가끔씩(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 (3)과 (5)에 제시된 권고사항에 기초하여 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(3)(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 기반

하여 선정해야 한다. 권장되는 부형제는 아세톤 : 올리브 오일(AOO, 4:1 v/v), N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide), 메틸에틸케톤(methyl ethyl ketone), 프로필렌 글리콜(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(35항 참조). 또한, 양성대조군 동물 수의 감소 가능 여부에 대한 평가는 개별 마우스의 자료가 수집된 경우에만 가능하다(12). 뿐만 아니라 일부 국가의 규제 당국은 개별 마우스 데이터의 수집을 요구한다. 그럼에도 불구하고 일부 규제당국은 집단 동물 데이터를 받아들일 수 있는 것으로 고려할 수 있으며, 이러한 경우 시험자는 개별 또는 집단 동물데이터의 수집 중 선택할 수 있다.

### 예비시험

21. 최고 투여용량을 결정하기 위한 정보가 없는 경우(18항 참조), LLNA 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 용해 가능한 최대 농도를 사용해야 한다.

22. 예비시험은 LLNA 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(6일차)에 기록한다. 각 마우스 양쪽 귀의 흥반을 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) 및 6일차에 측정한다. 또한 6일차의 귀 두께는 마우스를 안락사 시킨 후 귀 부위를 이어편치로 찢어 무게를 측정하여 결정할 수 있다. 과도한 국소 자극은 흥반 점수 3 이상 또는 귀 두께가 25% 이상 증가한 경우를 말한다(26)(27). LLNA 본시험의 최고 투여용량은 예비시험

에서 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)(36)의 징후일 수 있으며 따라서 LLNA 본시험의 최대 투여용량을 시사할 수 있다. 또한 무기력 또는 무반응 증상, 통증과 괴로움, 경미하거나 일시적인 것 이상의 모든 일반증상, 1~6일 차 5% 초과 체중감소 및 치사율은 평가 시 고려되어야 한다. 빈사 상태의 마우스 또는 심한 통증과 고통을 보이는 마우스는 안락사 시킨다(37).

### 본시험 일정

25. 시험 일정은 다음과 같다.

- 1일차(Day 1):

각 마우스의 체중 및 모든 일반증상을 관찰하여 기록한다. 시험물질 희석액 25  $\mu$ L, 부형제 또는 양성대조물질(11~15항에서 고려된 것처럼 실험실 방침에 근거한 동시 또는 최근에 사용된 양성대조물질)을 각 귓등에 바른다.

- 2일차 및 3일차(Day 2 and 3):

1일차의 적용 절차를 반복한다.

- 4일차 및 5일차(Day 4 and 5):

아무것도 처리하지 않는다.

- 6일차(Day 6):

각 마우스의 체중을 기록한다. ( $^3\text{H}$ )-methylthymidine 20  $\mu\text{Ci}$ ( $7.4 \times 10^5$  Bq)가 포함된 인산완충용액(PBS) 250  $\mu\text{L}$ 를 모든 시험군 및 대조군 마우스의 꼬리 정맥에 주사한다. 대안으로,  $^{125}\text{I}$ -iododeoxyuridine 2  $\mu\text{Ci}$ ( $7.4 \times 10^4$  Bq) 및 fluorodeoxyuridine  $10^{-5}\text{M}$ 이 포함된 PBS 250  $\mu\text{L}$ 를 꼬리 정맥에 주사한다. 5시간 후 마우스를 안락사 시킨다. 각 마우스에서 시험물질을 도포한 부위의 이개 림프절을 절개하고 각 동물별로 PBS에 보관하거나(개별 동물 접근법) 절개한 이개 림프절을 각 시험물질군 별로 PBS에 보관한다(집단 투여군 접근법). 림프절의 확인과 절개에 대한 도표 및 세부 사항은 참고문헌(12)을 참조한다. 본시험에서 국소 피부 반응의 관찰을 위해서는 귀 홍반의 점수화 또는 귀 두께 측정(두께 측정기를 사용하거나 해부 시 이어편치 무게 측정)과 같은 추가적인 항목들이 시험 프로토콜에 포함될 수 있다.

### 세포 현탁액의 준비

26. 개별 동물 접근법(individual animal approach) 또는 집단 투여군 접근법(pooled treatment group approach)을 사용하여 200 마이크로 메쉬 스테인리스 스틸 거즈를 통한 부드러운 물리적인 분해 또는 단일 세포 현탁액을 만들 수 있는 다른 기법으로 각 마우스 양쪽에서 적출한 림프절의 단일 세포 현탁액을 준비한다. 림프절 세포 현탁액은 PBS로 2회 추가 세척하고 DNA는 5% trichloroacetic acid(TCA)로 4°C에서 18시간 동안 침전시킨다(3). 세포침전물(pellet)은 TCA 1 mL에 재현탁하고  $^3\text{H}$  계수를 위해 섬광 유체(scintillation fluid) 10 mL이 담긴 바이알로 옮기거나  $^{125}\text{I}$  계수를 위해 감마(gamma) 계수 튜브로 옮긴다.

### 세포증식 측정(결합된 방사성동위원소 측정)

27. (<sup>3</sup>H)-methylthymidine의 결합(incorporation)은 β-scintillation counting으로 측정하고 <sup>125</sup>I-iododeoxyuridine의 결합은 <sup>125</sup>I-계수(<sup>125</sup>I-counting)로 측정하며, DPM(disintegrations per minute)으로 나타낸다. 사용된 접근법에 따라 결합(incorporation)은 DPM/마우스(개별 동물 접근법) 또는 DPM/투여군(집단 투여군 접근법)으로 표시한다.

## **rLLNA**

28. 특정 상황에서 피부감작 가능성의 음성 예측을 확인하기 위한 규제적 요구가 있는 경우, 본 시험 가이드라인의 다른 모든 LLNA 프로토콜 기준(specifications)을 준수한다면 더 적은 동물을 사용하는 rLLNA 프로토콜(16)(17)(18) 옵션이 사용될 수 있다. rLLNA 접근법을 적용하기 전에, 사용에 대한 명확한 타당성 및 과학적 근거를 제시해야 한다. 양성 또는 불분명한 결과가 나타나는 경우에는 결과를 해석하거나 명확하게 하기 위해 추가 시험이 필요할 수 있다.

29. 투여군 수의 감소가 LLNA와 rLLNA 시험법 프로토콜의 유일한 차이이며, 이러한 이유로 rLLNA는 용량-반응 정보를 제공하지 않는다. 따라서 용량-반응 정보가 필요한 경우 rLLNA를 사용해서는 안 된다. 다수 용량의 LLNA와 마찬가지로 rLLNA에서 평가된 시험물질 농도는 마우스에서 명확한 전신독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하지 않는 최대 농도이어야 한다(18항 참조).

## **관찰**

### **일반증상 관찰**

30. 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(37).

### **체중**

31. 25항에서 언급한 바와 같이, 각 마우스의 체중은 시험 시작 시점과 예정된 안락사 시 측정해야 한다.

## 결과의 계산

32. 각 시험물질군의 결과는 평균 감작지수로 나타낸다. 개별 동물 접근법을 사용하는 경우, 감작지수는 각 시험물질군과 양성대조군 마우스의 평균 DPM을 부형제대조군의 평균 DPM으로 나누어 계산한다. 부형제대조군에 대한 감작지수의 평균은 “1”이 된다. 집단 투여군 접근법을 사용하는 경우, 감작지수는 각 시험물질군의 집단 방사능 결합을 집단 부형제대조군의 방사능 결합으로 나누어 계산하며 이를 통해 평균 SI 값을 산출한다.

33. 판정기준은 감작지수가 3 이상( $SI \geq 3$ )일 때 결과를 양성으로 간주한다. 하지만 경계값 결과(borderline result)를 양성으로 판정할 때에는 용량-반응 상관 정도, 통계적 유의성, 용매/부형제 및 양성대조물질 반응의 일관성을 또한 고려한다(4)(5)(6).

34. 도출된 결과를 명확히 할 필요가 있는 경우, 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(7)에서 자세히 논의된다.

35. 개별 마우스의 방사능 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 SI 계산 및 통계적 분석을 모두 수행해야 할 필요가 있다.



## 시험자료 및 보고

### 데이터

36. 데이터는 표 형식으로 요약한다. 개별 동물 접근법을 사용하는 경우 개별 동물 DPM 값, DPM 값의 그룹 평균, 관련 오차(예: 표준편차(SD), 표준오차(SEM)), 동시 부형제대조군 대비 각 투여군의 평균 SI를 나타낸다. 집단 투여군 접근법을 사용하는 경우 DPM의 평균/중간 값, 동시 부형제대조군에 대한 각 투여군의 평균 SI를 나타낸다.

### 시험 보고서

37. 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), 사용 용량)
- 부형제 선정의 타당성에 대한 근거

#### 실험동물

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

#### 시험조건

- 시험물질의 준비와 적용에 관한 세부사항
- 투여 용량 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 마우스의 DPM 값 및 SI 값을 담은 표(개별 동물 접근법) 또는 DPM 값 및 SI 값의 평균/중간 값을 담은 표(집단 투여군 접근법)
- 개별 동물 접근법을 사용하는 경우 각 처리군 마우스의 DPM 평균 및 관련 오차(예: SD, SEM)와 각 처리군의 이상치(outliers) 분석 결과
- SI 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 (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) 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.
- (4) 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 sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 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 sensitising 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
  - (12) 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)]
  - (13) OECD (1992), Skin Sensitisation. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
  - (14) 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>]
  - (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
  - (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
  - (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [[http://ecvam.jrc.it/ft\\_doc/ESAC26\\_statement\\_rLLNA\\_20070525-1.pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf)]
  - (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:

[<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]

- (19) 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 Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: [[http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)]
- (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), Non-radioactive 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) OECD (1987), Acute Dermal Toxicity, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (36) 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](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm)]

- (37) 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>]

## 부록 1. 용어 정의

**정확도(Accuracy):** 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면임. 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”과 “정확도(Accuracy)”는 같은 의미로 쓰임(14).

**기준 시험물질(Benchmark test substance):** 시험물질의 비교 기준으로 사용되는 감작성 및 비감작성 물질. 기준물질은 다음의 특성을 가져야 함. (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.

**추정농도임계값(Estimated concentration threshold, ECt):** 양성반응을 나타내는 자극지수가 되는데 필요한 시험물질의 추정 농도.

**추정농도3(Estimated concentration three, EC3):** 자극지수가 3이 되는데 필요한 시험물질의 추정 농도.

**위음성(False negative):** 양성 또는 활성 시험물질이 시험법에 의해 음성 또는 비활성 시험물질로 잘못 식별되는 것.

**위양성(False positive):** 음성 또는 비활성 시험물질이 시험에 의해 양성 또는 활성 시험물질로 잘못 식별되는 것.

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

**실험실간 재현성(Inter-laboratory reproducibility):** 다른 실험실에서 동일한 시험절차와 시험물질로 시험을 수행했을 때, 양적 및 질적으로 유사한 결과를 나타내는 정도. 실험실간 재현성은 사전검증 및 검증 단계에서 결정되고 실험실간에 시험이 성공적으로 전수될 수 있음을 보여주며, between-laboratory reproducibility라고도 함(14).

**실험실내 재현성(Intra-laboratory reproducibility):** 동일한 실험실에서 자격을 갖춘 사람이 다른 시점에 특별한 시험절차로 같은 결과를 성공적으로 재현할 수 있는 정도. 또한 within-laboratory reproducibility라고도 함(14).

**유사시험(Me-too test):** 검증 및 승인된 참조 시험법과 구조적 및 기능적으로 유사한 시험법에 대한 구어적 표현. 이러한 시험법은 추적 검증의 대상이 됨. 유사한 시험법과



교차 사용됨(14).

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

**유사시험법평가기준(Performance standards, PS):** 검증된 시험법을 기반으로 기능적 및 기전적으로 유사하게 제시된 시험법의 비교 가능성을 평가하는 기준. 다음 사항을 포함함 (i) 필수 시험법 구성요소, (ii) 검증된 시험법의 허용 가능한 수행도를 입증하는데 사용된 화학물질 중에서 선택된 참고 화학물질의 최소 목록, (iii) 검증된 시험법에서 얻은 값을 기반으로 한 정확도 및 신뢰도의 유사성(참고 화학물질의 최소 목록을 사용하여 평가할 때 제시된 시험방법이 입증되어야 함)(14)이 포함.

**독점적 시험법(Proprietary test method):** 특허 및 저작권, 상표 등에 의해 제조 및 유통이 제한되는 시험법.

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

**참고 화학물질(Reference chemicals):** 생체외(*in vitro*) 또는 생체내(*in vivo*) 시험계의 반응이나 관련 종이 알려진 경우, 검증 단계에서 사용하기 위해 선별된 화학물질. 이러한 물질은 시험법이 사용될 것으로 예상되는 시험물질 종류를 대표해야 하며, 화학물질이 일으킬 것으로 예상되는 반응의 모든 범위(강, 약, 음성)를 나타내야 함. 검증절차의 단계, 시험법 및 시험목적에 따라 다른 참고물질 목록이 필요할 수도 있음(14).

**상관성(Relevance):** 시험과 효과의 관련성 및 시험이 특정 목적에 의미 있고 유용한지에 대한 설명. 상관성은 시험이 얼마나 생물학적 효과를 정확하게 측정하고 예측하는지 나타내며, 시험법의 정확도(일치성)를 내포함(14).

**신뢰도(Reliability):** 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실내, 실험실간 재현성(reproducibility)으로 평가됨(14).

**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.

**자극지수(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 고려해야 함. 단, 제품 제형의 활성 성분에 대한 시험 요건이 있을 수 있음.

**검증된 시험법(Validated test method):** 특정 목적에 대한 상관성(정확도 포함) 및 신뢰도를 판단하는 유효성 연구가 완료된 시험법. 검증된 시험법이 정확도와 신뢰도 측면에서 제시된 목적에 부합한다고 여겨지는 수행도를 충분히 달성하지 못할 수도 있다는 점에 유의해야 함(14).

## 부록 2. 피부감작성에 대한 유사 또는 변형된 LLNA 시험법 평가를 위한 유사 시험법평가기준

### 개요

1. 유사시험법평가기준(PS)의 목적은 독점적(저작권, 상표, 등록) 및 비독점적 신규 시험법이 특정 시험 목적에 충분한 정확도와 신뢰도를 가지는지에 대한 기준을 제시하는 것이다. 검증되고 승인된 시험법을 바탕으로 하는 PS는 유사한 과학적인 원리에 기초하여 유사한 시험법(구어적으로는 "유사"시험)의 신뢰도 및 정확도를 평가하는 데 사용될 수 있고 동일한 생물학적 또는 독성 효과를 측정하거나 예측할 수 있다(14).
2. 변형된 시험법(승인된 시험법에 대한 잠재적인 개선안)의 채택에 앞서, 제안된 변경 사항이 시험 수행에 미치는 영향 및 검증 과정의 다른 요소에 대해 이용 가능한 정보에 미치는 영향의 정도를 평가해야 한다. 제안된 변경 사항의 수와 특성, 이러한 변경을 위해 생성된 데이터 및 근거 자료에 따라, 새로운 시험에 대해 기술된 대로 동일한 검증 과정을 진행하거나 또는 해당되는 경우 기존의 PS를 사용하여 신뢰도 및 상관성을 제한적으로 평가해야 한다(14).
3. 본 시험 가이드라인에 따라 사용하도록 제안된 유사 또는 변형된 시험법은 LLNA 점수의 전체 범위를 나타내는 화학물질을 사용하여 신뢰도 및 정확도를 평가해야 한다. 불필요한 동물 사용을 방지하기 위해, 모델 개발자는 PS 및 본 시험 가이드라인의 지침에 따라 검증연구를 시작하기 전에 OECD와 협의할 것을 강력하게 권고한다.
4. 본 유사시험법평가기준은 미국-ICCVAM, 유럽-ECVAM, 일본-JaCVAM의 조화된 유사시험법평가기준(12)에 기반하고 있으며 LLNA와 유사한 또는 변형된 시험법의 유효성을 평가하는 데 사용된다. 유사시험법평가기준은 필수 시험법 구성요소, 권장되는 참고물질, 제안된 시험법이 충족하거나 초과해야 하는 정확도 및 신뢰도의 기준으로 구성된다.

### I. 필수 시험법 구성요소

5. 유사 또는 변형된 LLNA 시험법이 기능적 및 기전적으로 LLNA와 유사하고,

동일한 생물학적 영향을 측정하기 위해서는 시험법 프로토콜에 다음의 구성요소를 포함시켜야 한다.

- 시험물질은 마우스의 양쪽 귀에 국소적으로 적용해야 한다.
- 시험물질 적용 부위와 가까운 림프절에서 림프구의 증식을 측정해야 한다.
- 림프구 증식은 피부감작성 유도기에서 측정해야 한다.
- 시험물질의 경우, 선택된 최고 투여용량이 마우스의 전신 독성이나 과도한 국소 피부자극을 유발하지 않는 최대 농도이어야 한다. 양성 참고물질의 경우, 최고 투여용량은 최소한 해당 참고 시험물질의 LLNA EC3 값만큼 높아야 하며(표 1 참조), 마우스에 전신 독성이나 과도한 국소 피부자극이 나타나지 않아야 한다.
- 각 시험마다 동시 부정제대조군을 포함해야 하며, 해당되는 경우 동시 양성 대조군도 사용해야 한다.
- 투여용량군 당 4마리 이상의 동물을 사용해야 한다.
- 개별 또는 집단 동물 데이터를 수집할 수 있다.

이러한 기준 중 하나라도 충족하지 않으면 본 유사시험법평가기준은 유사 또는 변형된 시험법의 유효성에 사용될 수 없다.

## II. 최소 참고물질 목록

6. US-ICCVAM, EC-ECVAM, 일본-JaCVAM의 조화된 유사시험법평가기준(12)에서는 필수로 사용해야 하는 최소의 참고물질 18개와 LLNA 유사시험법평가기준에 포함된 선택적인 참고물질 4개(인체 및 기니픽 시험 결과(TG406)(13)와 비교 시 LLNA에서 위양성 또는 위음성 결과가 나온 물질이며 이에 따라 LLNA와 동일하거나 더 나은 수행도를 보여주는 기회를 제공함)를 확인했다. 이러한 물질을 확인하는 선정 기준은 다음과 같다.

- 참고물질 목록은 피부감작성에 일반적으로 시험되는 물질 유형 및 LLNA 시험법이 측정 또는 예측할 수 있는 반응 범위를 보여준다.
- 시험물질은 잘 정의된 화학구조를 가진다.
- 각 물질에 대한 기니픽 시험(TG 406)(13)의 LLNA 데이터 및 (가능한 경우) 인체 데이터가 있다.
- 상업적 공급원에서 물질을 구할 수 있다.

권장되는 참고물질은 표 1에서 확인한다. 제안된 참고물질을 사용하는 시험은 표 1에

있는 부형제를 이용하여 평가해야 한다. 목록의 물질을 사용할 수 없는 경우에는 언급된 선정기준에 부합하며, 타당성이 충분한 다른 물질을 사용할 수 있다.

표 1: LLNA 유사시험법평가기준을 위한 권장되는 참고물질

번호	물질 <sup>1</sup>	CAS No	형태	부형제 <sup>2</sup>	EC3 % <sup>3</sup>	N <sup>4</sup>	0.5~2.0x EC3	실제 EC3 범위	LLNA vs GP	LLNA vs 인체
1	5-Chloro-2-methyl-4-i sothiazolin-3-one(CM I)/2-methyl-4-isothia zolin-3-one(MI) <sup>5</sup>	26172-55-4/ 2682-20-4	액체	DMF	0.009	1	0.0045-0.0 18	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	고체	AOO	0.049	15	0.025-0.09 9	0.02-0.094	+/+	+/+
3	4-Phenylenediamine	106-50-3	고체	AOO	0.11	6	0.055-0.22	0.07-0.16	+/+	+/+
4	Cobalt chloride	7646-79-9	고체	DMSO	0.6	2	0.3-1.2	0.4-0.8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	액체	AOO	1.5	47	0.77-3.1	0.5-3.3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzothia zole	149-30-4	고체	DMF	1.7	1	0.85-3.4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	액체	AOO	9.2	6	4.6-18.3	5.1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	액체	AOO	9.7	21	4.8-19.5	4.4-14.7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	액체	AOO	10.1	11	5.05-20.2	4.9-15	+/+	+/+
10	Phenyl benzoate	93-99-2	고체	AOO	13.6	3	6.8-27.2	1.2-20	+/+	+/+

11	Cinnamic alcohol	104-54-1	고체	AOO	21	1	10.5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	고체	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Methyl methacrylate	80-62-6	액체	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Chlorobenzene	108-90-7	액체	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	Isopropanol	67-63-0	액체	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	Lactic acid	50-21-5	액체	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	Methyl salicylate	119-36-8	액체	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Salicylic acid	69-72-7	고체	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-
LLNA에 대해 향상된 수행도를 보여주는 추가 물질										
19	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	고체	DMF	8.1	5	4.05-16.2	1.5-17.1	+/-	+/-
20	Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	액체	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Xylene	1330-20-7	액체	AOO	95.8	1	47.9-100	NC	+/**	+/-
22	Nickel chloride	7718-54-9	고체	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

약어: AOO(acetone: olive oil) = 아세톤 : 올리브오일(4:1, v/v), CAS No(CAS 번호) = 화학초록서비스 번호, DMF(N,N-dimethylformamide) = N,N-디메틸포름아미드, DMSO(dimethyl sulfoxide) = 디메틸설폭사이드, DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene) = 2,4-디니트로클로로벤젠, EC3(estimated concentration needed to produce a stimulation

index of 3) = SI 3을 만드는 데 필요한 추정 농도, GP(guinea pig test result) = 기니픽 시험 결과(TG406)(13),HCA(hexylcinnamicaldehyde)=헥실시나믹알데히드, Liq = 액체, LLNA(murine local lymph node assay result) = murine 국소림프절시험결과(TG429)(1),MEK(methylethylketone)=메틸에틸케톤, NA(not applicable) = SI < 3이므로 해당없음, NC(not calculated) = 단일 시험의 데이터이므로 계산되지 않음, Sol(solid) = 고체, Veh(test vehicle) = 시험 부형제.

1 시험물질은 보관이 가능하다는 것을 증명하는 안정성 자료가 없는 경우 시험 당일에 조제해야 한다.

2 서로 다른 부형제가 LLNA의 수행도에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있으므로, 각 참고물질에 대한 권장하는 부형제를 사용해야 한다(24)(32).

3 두 개 이상의 EC3 값이 가능한 평균값. 음성물질(자극지수 < 3)의 경우, 최대 시험 농도가 제공된다.

4 데이터가 수집된 LLNA 연구의 수.

5 카톤 CG(CAS No 55965-84-9)로 상용화, CMI:MI = 3:1 혼합물. 각 성분의 상대농도는 1.1~1.25%(CMI) 및 0.3~0.45%(MI)다. 비활성 성분은 마그네슘염(21.5~24%) 및 구리질산염(0.15~0.17%)이며 나머지 제형은 물 74~77%다. 카톤 CG는 Sigma-Aldrich 및 Rohm & Haas(현재 Dow Chemical Corporation)에서 구입 가능하다.

\* = 임상 패치 시험결과가 없고, 패치 시험 키트 알레르기 유발 항원으로 포함되지 않았으며, 인체 감작성에 대한 사례 보고가 없다는 것에 근거하여 인체에서는 감작물질이 아닌 것으로 추정됨.

\*\* = GP 데이터 없음.



### III. 신뢰도 및 정확도 기준 정의

7. 유사 또는 변형된 LLNA 시험법의 정확도는 필수로 사용해야 하는 최소 참고물질 18개를 사용하여 평가하는 경우 LLNA PS의 기준을 충족하거나 또는 초과해야 한다. 신규 또는 변형된 시험법은 "예/아니오" 결정에 따라 올바른 분류가 이루어져야 한다. 하지만 신규 또는 변형된 시험법이 필수로 사용해야 하는 최소 참고물질 모두를 정확하게 분류하지 못할 수 있다. 예를 들어, 약 감작물질 중 하나가 잘못 분류되면, 잘못 분류된 근거 및 적절한 추가 데이터(예: 잘못 분류된 참고물질과 유사한 물리적 및 화학적, 감작성 특성을 가지는 다른 물질에 대한 정확한 분류를 제공하는 시험결과)를 고려하여 동등한 수행도를 설명할 수 있다. 이때는 신규 또는 변형된 LLNA 시험법의 검증 상황은 사례별로 평가된다.

#### 실험실내 재현성

8. 실험실내 재현성을 결정하기 위해서는 LLNA에서 잘 규명된 감작성 물질을 사용하여 신규 또는 변형된 LLNA 시험법을 평가해야 한다. 따라서 LLNA PS는 HCA(hexyl cinnamic aldehyde) 반복 시험결과의 변동성에 근거한다. 실험실내 재현성을 평가할 때, HCA에 대한 임계 추정 농도(threshold estimated concentration, ECt)는 1주일 이상의 간격으로 4번에 걸쳐 산출해야 한다. 허용 가능한 실험실내 재현성은 각 HCA 시험에서 ECt 값을 5~20%로 얻을 수 있는 실험실의 역량으로 나타나며, 이는 LLNA에서 HCA(10%)에 대한 평균 EC3의 0.5~2.0배 범위를 의미한다(표 1 참조).

#### 실험실간 재현성

9. 신규 또는 변형된 LLNA 시험법의 실험실간 재현성은 LLNA에서 잘 규명된 감작성 물질 두 가지를 사용하여 평가해야 한다. LLNA PS는 각기 다른 실험실의 HCA 및 DNCB(2,4-dinitrochlorobenzene) 검사 결과 변동성에 근거한다. ECt 값은 최소 3곳 이상의 실험실에서 실시된 단일 시험에서 독립적으로 산출해야 한다. 허용 가능한 실험실간 재현성을 입증하기 위해, 각 실험실은 ECt값이 HCA에 대해 5~20%, DNCB에 대해 0.025~0.1%이어야 하며, 이는 LLNA에서 각각 HCA(10%) 및 DNCB(0.05%)에 대한 평균 EC3의 0.5~2.0배 범위를 의미한다(표 1 참조).

## OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

### Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay

#### 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 original Test Guideline (TG) for the determination of skin sensitization in the mouse, the Local Lymph Node Assay (LLNA; TG 429) was adopted in 2002 (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) (10) (11). The updated LLNA is based on the evaluation of experience and scientific data (12). This is the second TG to be designed for assessing skin sensitization potential of chemicals in animals. The other TG (*i.e.* TG 406) utilises guinea pig tests, notably the guinea pig maximisation test and the Buehler test (13). The LLNA provides advantages over TG 406 (13) with regard to animal welfare. This updated LLNA TG includes a set of Performance Standards (PS) (Annex 1) that can be used to evaluate the validation status of new and/or modified test methods that are functionally and mechanistically similar to the LLNA, in accordance with the principles of Guidance Document No. 34 (14).

2. The LLNA studies the induction phase of skin sensitization and provides quantitative data suitable for dose-response assessment. It should be noted that the mild/moderate sensitizers which are recommended as suitable positive control (PC) test substances for guinea pig test methods (*i.e.* TG 406) (13) are also appropriate for use with the LLNA (6) (8) (15). A reduced LLNA (rLLNA) approach, which could use up to 40% fewer animals is also described as an option in this TG (16) (17) (18). The rLLNA may be used when there is a regulatory need to confirm a negative prediction of skin sensitizing potential, provided there is adherence to all other LLNA protocol specifications, as described in this Test Guideline. Prediction of a negative outcome should be made based on all available information as described in paragraph 4. Before applying the rLLNA approach, clear justifications and scientific rationale for its use should be provided. If, against expectations, a positive or equivocal result is obtained in the rLLNA, additional testing may be needed in order to interpret or clarify the finding. The rLLNA should not be used for the hazard identification of skin sensitising test substances when dose-response information is needed, such as sub-categorisation for UN Globally Harmonized System of classification and Labelling of Chemicals.

#### DEFINITIONS

3. Definitions used are provided in Annex 2.

#### INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

4. The LLNA provides an alternative method for identifying potential skin sensitizing test substances. This does not necessarily imply that in all instances the LLNA should be used in place of guinea pig tests (*i.e.* TG 406) (13), 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. 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;

© 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.*

and toxicological data on structurally related test substances. This information should be considered in order to determine whether the LLNA is appropriate for the test substance (given the incompatibility of limited types of test substances with the LLNA- see paragraph 5) and to aid in dose selection.

5. The LLNA 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 the number of animals required for this purpose. Moreover, the LLNA offers a substantial refinement (less pain and distress) of the way in which animals are used for allergic contact sensitization testing. The LLNA is based upon consideration of immunological events stimulated by chemicals during the induction phase of sensitization. Unlike guinea pig tests (*i.e.* TG 406) (13) the LLNA does not require that challenge-induced dermal hypersensitivity reactions be elicited. Furthermore, the LLNA does not require the use of an adjuvant, as is the case for the guinea pig maximisation test (13). Thus, the LLNA reduces animal pain and distress. Despite the advantages of the LLNA over TG 406, it should be recognised that there are certain limitations that may necessitate the use of TG 406 (13) (*e.g.* false negative findings in the LLNA with certain metals, false positive findings with certain skin irritants [such as some surfactant type chemicals] (19) (20), or solubility of the test substance). In addition, test substance classes or substances containing functional groups shown to act as potential confounders (21) may necessitate the use of guinea pig tests (*i.e.* TG 406) (13). Further, based on the limited validation database, which consisted primarily of pesticide formulations, the LLNA is more likely than the guinea pig test to yield a positive result for these types of test substances (22). However, when testing formulations, one could consider including similar test substances with known results as benchmark test substances to demonstrate that the LLNA is functioning properly (see paragraph 16). Other than such identified limitations, the LLNA should be applicable for testing any test substances unless there are properties associated with these test substances that may interfere with the accuracy of the LLNA.

#### PRINCIPLE OF THE TEST

6. The basic principle underlying the LLNA 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 Stimulation Index (SI), is determined, and should be  $\geq 3$  before classification of the test substance as a potential skin sensitizer is warranted. The methods described here are based on the use of *in vivo* radioactive labelling to measure an increased number of proliferating cells in the draining auricular lymph nodes. However, other endpoints for assessment of the number of proliferating cells may be employed provided the PS requirements are fully met (Annex 1).

#### DESCRIPTION OF THE ASSAY

##### *Selection of animal species*

7. The mouse is the species of choice for this test. Young adult female mice of CBA/Ca or CBA/J strain, 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 response do not exist.

##### *Housing and feeding conditions*

8. Mice should be group-housed (23), 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 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 are used to demonstrate appropriate performance of the assay by responding with adequate and reproducible sensitivity to a sensitising 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. A PC for each study is also required by some regulatory authorities and therefore users are encouraged to consult the relevant authorities prior to conducting the LLNA. 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 response at an exposure level expected to give an increase in the SI  $> 3$  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 (*i.e.* SI  $> 20$ ). Preferred PC test substances are 25% hexyl cinnamic aldehyde (Chemical Abstracts Service [CAS] No 101-86-0) in acetone: olive oil (4:1, v/v) and 5% mercaptobenzothiazole (CAS No 149-30-4) in *N,N*-dimethylformamide (see Annex 1, Table 1). 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  $\leq 6$  months) of the PC test substance may be adequate for laboratories that conduct the LLNA regularly (*i.e.* conduct the LLNA at a frequency of no less than once per 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 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 (*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 (12).

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 (24). 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 sensitisation potential of these types of test substances. Appropriate benchmark test 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;
- 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 (3) and (5). 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 (3) (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 (19) 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 35). In addition, evaluating the possibility of reducing the number of mice in the PC group is feasible when individual animal data are collected (12). Further, some national regulatory authorities require the collection of individual animal data. Nonetheless, pooled animal data may be considered acceptable by some regulatory authorities and in such situations, users may have the option of collecting either individual or pooled 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. The purpose of the pre-screen test is to provide guidance for selecting the maximum dose level to use in the main LLNA 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 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 6). 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), and Day 6. Additionally, on Day 6, ear thickness could be determined by ear punch weight determinations, which should be performed after the animals are humanely killed. Excessive local skin irritation is indicated by an erythema score  $\geq 3$  and/or an increase in ear thickness of  $\geq 25\%$  on any day of measurement (26) (27). The highest dose selected for the main LLNA study will be the next lower dose in the pre-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) (32) (33) (34).

24. The following clinical observations may indicate systemic toxicity (35)(36) when used as part of an integrated assessment and therefore may indicate the maximum dose level to use in the main LLNA: 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 6, and mortality should be considered in the evaluation. Moribund animals or animals obviously in pain or showing signs of severe and enduring distress should be humanely killed (37).

#### *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 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 and 3:  
Repeat the application procedure carried out on Day 1.
- Days 4 and 5:  
No treatment.
- Day 6:  
Record the weight of each animal. Inject 250 µL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 µCi ( $7.4 \times 10^5$  Bq) of tritiated ( $^3\text{H}$ )-methyl thymidine into all test and control mice via the tail vein. Alternatively, inject 250 µL sterile PBS containing 2 µCi ( $7.4 \times 10^4$  Bq) of  $^{125}\text{I}$ -iododeoxyuridine and  $10^{-5}\text{M}$  fluorodeoxyuridine into all mice via the tail vein. Five hours (5 h) later, humanely kill the animals. Excise the draining auricular lymph nodes from each mouse ear and process together in PBS for each animal (individual animal approach); alternatively excise and pool the lymph nodes from each ear in PBS for each treatment group (pooled treatment group approach). Details and diagrams of the lymph node identification and dissection can be found in reference (12). 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. A single-cell suspension of lymph node cells (LNC) excised bilaterally using the individual animal approach or alternatively, the pooled treatment group approach is prepared by gentle mechanical disaggregation through 200 micron-mesh stainless steel gauze or another acceptable technique for generating a single-cell suspension. The LNC are washed twice with an excess of PBS and the DNA is precipitated with 5% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C for 18h (3). Pellets are either re-suspended in 1 mL TCA and transferred to scintillation vials containing 10 mL of scintillation fluid for <sup>3</sup>H-counting, or transferred directly to gamma counting tubes for <sup>125</sup>I-counting.

#### *Determination of cellular proliferation (incorporated radioactivity)*

27. Incorporation of <sup>3</sup>H-methyl thymidine is measured by  $\beta$ -scintillation counting as disintegrations per minute (DPM). Incorporation of <sup>125</sup>I-iododeoxyuridine is measured by <sup>125</sup>I-counting and also is expressed as DPM. Depending on the approach used, the incorporation is expressed as DPM/mouse (individual animal approach) or DPM/treatment group (pooled treatment group approach).

#### *Reduced LLNA*

28. In certain situations, when there is a regulatory need to confirm a negative prediction of skin sensitizing potential an optional rLLNA protocol (16) (17) (18) using fewer animals may be used, provided there is adherence to all other LLNA protocol specifications in this TG. Before applying the rLLNA approach, clear justifications and scientific rationale for its use should be provided. If a positive or equivocal result is obtained, additional testing may be needed in order to interpret or clarify the finding.

29. The reduction in number of dose groups is the only difference between the LLNA and the rLLNA test method protocols and for this reason the rLLNA does not provide dose-response information. Therefore, the rLLNA should not be used when dose-response information is needed. Like the multi-dose LLNA, the test substance concentration evaluated in the rLLNA should be the maximum concentration that does not induce overt systemic toxicity and/or excessive local skin irritation in the mouse (see paragraph 18).

### **OBSERVATIONS**

#### *Clinical observations*

30. 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 (37).

#### *Body weights*

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

### **CALCULATION OF RESULTS**

32. Results for each treatment group are expressed as the SI. When using the individual animal approach, the SI is derived by dividing the mean DPM/mouse within each test substance group, and the PC



group, by the mean DPM/mouse for the solvent/VC group. The average SI for the VCs is then one. When using the pooled treatment group approach, the SI is obtained by dividing the pooled radioactive incorporation for each treatment group by the incorporation of the pooled VC group; this yields a mean SI.

33. The decision process regards a result as positive when  $SI \geq 3$ . However, the strength of the dose-response, the statistical significance and the consistency of the solvent/vehicle and PC responses may also be used when determining whether a borderline result is declared positive (4)(5)(6).

34. If it is necessary to clarify the results obtained, consideration should be given to various properties of the test substance, including whether it has a structural relationship to known skin sensitizers, whether it causes excessive local skin irritation in the mouse, and the nature of the dose-response relationship seen. These and other considerations are discussed in detail elsewhere (7).

35. Collecting radioactivity 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 VC comparisons). Statistical analyses may include, *e.g.* linear regression or William'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

36. Data should be summarised in tabular form. When using the individual animal approach, show the individual animal DPM values, the group mean DPM/animal, its associated error term (*e.g.* SD, SEM), and the mean SI for each dose group compared against the concurrent VC group. When using the pooled treatment group approach, show the mean/median DPM and the mean SI for each dose group compared against the concurrent VC group.

### Test report

37. 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:

- 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:

- summary of results of latest reliability check, including information on test substance, concentration and vehicle used;
- concurrent and/or historical PC and concurrent NC 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;
- a table of individual mouse (individual animal approach) or mean/median (pooled treatment group approach) DPM values and SI values for each treatment group;
- mean and associated error term (*e.g.* SD, SEM) for DPM/mouse for each treatment group and the results of outlier analysis for each treatment group when using the individual animal approach;
- calculated SI and an appropriate measure of variability that takes into account the inter-animal variability in both the test substance and control groups when using the individual animal approach;
- dose-response relationship;
- statistical analyses, where appropriate;

Discussion of results:

- 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 (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) 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.
- (4) 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 sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) 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 sensitising 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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)]
- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- (14) 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>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006). The local lymph node assay and skin sensitization: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007). Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA). European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [[http://ecvam.jrc.it/ft\\_doc/ESAC26\\_statement\\_rLLNA\\_20070525-1.pdf](http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf)]
- (18) ICCVAM (2009). The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) 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 Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf)]
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) ICCVAM (2009). ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996). Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)
- (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), Non-radioactive 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) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- (36) 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](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acuteTox/Tox_workshop.htm)

- (37) 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>

ANNEX 1PERFORMANCE STANDARDS FOR ASSESSMENT OF PROPOSED SIMILAR OR MODIFIED LLNA TEST METHODS FOR SKIN SENSITIZATIONINTRODUCTION

1. The purpose of Performance Standards (PS) is to communicate the basis by which new test methods, both proprietary (*i.e.* copyrighted, trademarked, registered) and non-proprietary can be determined to have sufficient accuracy and reliability for specific testing purposes. These PS, based on validated and accepted test methods, can be used to evaluate the reliability and accuracy of other similar test methods (colloquially referred to as “me-too” tests) that are based on similar scientific principles and measure or predict the same biological or toxic effect (14).
2. Prior to adoption of modified test methods (*i.e.* proposed potential improvements to an approved test method), there should be an evaluation to determine the effect of the proposed changes on the test’s performance and the extent to which such changes affect the information available for the other components of the validation process. Depending on the number and nature of the proposed changes, the generated data and supporting documentation for those changes, they should either be subjected to the same validation process as described for a new test, or, if appropriate, to a limited assessment of reliability and relevance using established PS (14).
3. Similar or modified test methods proposed for use under this Test Guideline should be evaluated to determine their reliability and accuracy using chemicals representing the full range of the LLNA scores. To avoid unwarranted animal use, it is strongly recommended that model developers contact OECD before starting validation studies in accordance with the PS and guidance provided in this Test Guideline.
4. These PS are based on the US-ICCVAM, EC-ECVAM and Japanese-JaCVAM harmonised PS (12), for evaluating the validity of similar or modified versions of the LLNA. The PS consists of essential test method components, recommended reference substances, and standards for accuracy and reliability that the proposed test method should meet or exceed.

I. Essential test method components

5. To ensure that a similar or modified LLNA test method is functionally and mechanistically analogous to the LLNA and measures the same biological effect, the following components should be included in the test method protocol:
  - The test substance should be applied topically to both ears of the mouse;
  - Lymphocyte proliferation should be measured in the lymph nodes draining from the site of test substance application;
  - Lymphocyte proliferation should be measured during the induction phase of skin sensitization;
  - For test substances, the highest dose selected should be the maximum concentration that does not induce systemic toxicity and/or excessive local skin irritation in the mouse. For positive reference substances, the highest dose should be at least as high as the LLNA EC3 values of the corresponding reference test substances (see Table 1) without producing systemic toxicity and/or excessive local skin irritation in the mouse;

- A concurrent VC should be included in each study and, where appropriate, a concurrent PC should also be used;
- A minimum of four animals per dose group should be used;
- Either individual or pooled animal data may be collected.

If any of these criteria are not met, then these PS cannot be used for validation of the similar or modified test method.

## II. Minimum list of reference substances

6. The US-ICCVAM, EC-ECVAM and Japanese-JaCVAM harmonized PS (12) identified 18 minimum reference substances that should be used and four optional reference substances (*i.e.* substances that produced either false positive or false negative results in the LLNA, when compared to human and guinea pig results (*i.e.* TG 406) (13), and therefore provide the opportunity to demonstrate equal to or better performance than the LLNA) that are included in the LLNA PS. The selection criteria for identifying these substances were:

- The list of reference substances represented the types of substances typically tested for skin sensitization potential and the range of responses that the LLNA is capable of measuring or predicting;
- The substances had well-defined chemical structures;
- LLNA data from guinea pig tests (*i.e.* TG 406) (13) and (where possible) data from humans were available for each substance; and
- The substances were readily available from a commercial source.

The recommended reference substances are listed in Table 1. Studies using the proposed reference substances should be evaluated in the vehicle with which they are listed in Table 1. In situations where a listed substance may not be available, other substances that meet the selection criteria mentioned may be used, with adequate justification.



TABLE 1: RECOMMENDED REFERENCE SUBSTANCES FOR THE LLNA PS.

Number	Substance <sup>1</sup>	CAS No	Form	Veh <sup>2</sup>	EC3 % <sup>3</sup>	N <sup>4</sup>	0.5x - 2.0x EC3	Actual EC3 Range	LLNA vs. GP	LLNA vs. Human
1	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one (CMI)/ 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MI) <sup>5</sup>	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0.009	1	0.0045-0.018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0.049	15	0.025-0.099	0.02-0.094	+/+	+/+
3	4-Phenylenediamine	106-50-3	Sol	AOO	0.11	6	0.055-0.22	0.07-0.16	+/+	+/+
4	Cobalt chloride	7646-79-9	Sol	DMSO	0.6	2	0.3-1.2	0.4-0.8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Liq	AOO	1.5	47	0.77-3.1	0.5-3.3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	Sol	DMF	1.7	1	0.85-3.4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Liq	AOO	9.2	6	4.6-18.3	5.1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9.7	21	4.8-19.5	4.4-14.7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Liq	AOO	10.1	11	5.05-20.2	4.9-15	+/+	+/+
10	Phenyl benzoate	93-99-2	Sol	AOO	13.6	3	6.8-27.2	1.2-20	+/+	+/+
11	Cinnamic alcohol	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10.5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Methyl methacrylate	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Chlorobenzene	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	Isopropanol	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/*
16	Lactic acid	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	Methyl salicylate	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Salicylic acid	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

Number	Substance <sup>1</sup>	CAS No	Form	Veh <sup>2</sup>	EC3 % <sup>3</sup>	N <sup>4</sup>	0.5x - 2.0x EC3	Actual EC3 Range	LLNA vs. GP	LLNA vs. Human
<b>Optional Substances to Demonstrate Improved Performance Relative to the LLNA</b>										
19	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	Sol	DMF	8.1	5	4.05-16.2	1.5-17.1	+/-	+/-
20	Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Xylene	1330-20-7	Liq	AOO	95.8	1	47.9-100	NC	+/**	+/-
22	Nickel chloride	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Abbreviations: AOO = acetone: olive oil (4:1, v/v); CAS No = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimethylformamide; DMSO = dimethyl sulfoxide; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzene; EC3 = estimated concentration needed to produce a stimulation index of 3; GP = guinea pig test result (*i.e.* TG 406) (13); HCA = hexyl cinnamic aldehyde; Liq = liquid; LLNA = murine local lymph node assay result (*i.e.* TG 429) (1); MEK = methyl ethyl ketone; NA = not applicable since stimulation index <3; NC = not calculated since data was obtained from a single study; Sol = solid; Veh = test vehicle.

<sup>1</sup> Test substances should be prepared daily unless stability data demonstrate the acceptability of storage.

<sup>2</sup> Because of the potential impact of different vehicles on the performance of the LLNA, the recommended vehicle for each reference substance should be used (24)(32).

<sup>3</sup> Mean value where more than one EC3 value was available. For negative substances (*i.e.* with stimulation index <3, the highest concentration tested is provided).

<sup>4</sup> Number of LLNA studies from which data were obtained.

<sup>5</sup> Commercially available as Kathon CG (CAS No 55965-84-9), which is a 3:1 mixture of CMI and MI. The relative concentrations of each component range from 1.1% to 1.25% (CMI) and 0.3% to 0.45% (MI). The inactive components are magnesium salts (21.5% to 24%) and copper nitrate (0.15% to 0.17%), with the remaining formulation 74% to 77% water. Kathon CG is readily available through Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (now Dow Chemical Corporation).

\* = Presumed to be a non-sensitizer in humans based on the fact that no clinical patch test results were located, it is not included as a patch test kit allergen, and no case reports of human sensitisation were located.

\*\* = GP data not available.

### **III. Defined reliability and accuracy standards**

7. The accuracy of a similar or modified LLNA test method should meet or exceed that of the LLNA PS when it is evaluated using the 18 minimum reference substances that should be used. The new or modified test method should result in the correct classification based on a "yes/no" decision. However, the new or modified test method might not correctly classify all of the minimum reference substances that should be used. If, for example, one of the weak sensitizers were misclassified, a rationale for the misclassification and appropriate additional data (e.g. test results that provide correct classifications for other substances with physical, chemical, and sensitizing properties similar to those of the misclassified reference substance) could be considered to demonstrate equivalent performance. Under such circumstances, the validation status of the new or modified LLNA test method would be evaluated on a case-by-case basis.

#### **Intra-laboratory reproducibility**

8. To determine intra-laboratory reproducibility, a new or modified LLNA test method should be assessed using a sensitizing substance that is well characterized in the LLNA. Therefore, the LLNA PS are based on the variability of results from repeated tests of hexyl cinnamic aldehyde (HCA). To assess intra-laboratory reliability, threshold estimated concentration (ECt) values for HCA should be derived on four separate occasions with at least one week between tests. Acceptable intra-laboratory reproducibility is indicated by a laboratory's ability to obtain, in each HCA test, ECt values between 5% and 20%, which represents the range of 0.5-2.0 times the mean EC3 specified for HCA (10%) in the LLNA (see Table 1).

#### **Inter-laboratory reproducibility**

9. Inter-laboratory reproducibility of a new or modified LLNA test method should be assessed using two sensitizing substances that are well characterized in the LLNA. The LLNA PS are based on the variability of results from tests of HCA and 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in different laboratories. ECt values should be derived independently from a single study conducted in at least three separate laboratories. To demonstrate acceptable inter-laboratory reproducibility, each laboratory should obtain ECt values of 5% to 20% for HCA and 0.025% to 0.1% for DNCB, which represents the range of 0.5-2.0 times the mean EC3 concentrations specified for HCA (10%) and DNCB (0.05%), respectively, in the LLNA (see Table 1).

## ANNEX 2

## 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 (14).

**Benchmark test 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) 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.

**Estimated concentration threshold (ECt):** Estimated concentration of a test substance needed to produce a stimulation index that is indicative of a positive response.

**Estimated concentration three (EC3):** Estimated concentration of a test substance needed to produce a stimulation index of three.

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

**False positive:** A test 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 (14).

**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 (14).

**Me-too test:** A colloquial expression for a test method that is structurally and functionally similar to a validated and accepted reference test method. Such a test method would be a candidate for catch-up validation. Interchangeably used with similar test method (14).

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

**Performance standards (PS):** Standards, based on a validated test method, that provide a basis for evaluating the comparability of a proposed test method that is functionally and mechanistically similar. Included are; (i) essential test method components; (ii) a minimum list of Reference Chemicals selected

from among the chemicals used to demonstrate the acceptable performance of the validated test method; and (iii) the similar levels of accuracy and reliability, based on what was obtained for the validated test method, that the proposed test method should demonstrate when evaluated using the minimum list of Reference Chemicals (14).

**Proprietary test method:** A test method for which manufacture and distribution is restricted by patents, copyrights, trademarks, etc.

**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.

**Reference chemicals:** Chemicals selected for use in the validation process, for which responses in the *in vitro* or *in vivo* reference test system or the species of interest are already known. These chemicals should be representative of the classes of chemicals for which the test method is expected to be used, and should represent the full range of responses that may be expected from the chemicals for which it may be used, from strong, to weak, to negative. Different sets of reference chemicals may be required for the different stages of the validation process, and for different test methods and test uses (14).

**Relevance:** Description of relationship of the test to the effect of interest and whether it is meaningful and useful for a particular purpose. It is the extent to which the test correctly measures or predicts the biological effect of interest. Relevance incorporates consideration of the accuracy (concordance) of a test method (14).

**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 (14).

**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.

**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.

**Validated test method:** A test method for which validation studies have been completed to determine the relevance (including accuracy) and reliability for a specific purpose. It is important to note that a validated test method may not have sufficient performance in terms of accuracy and reliability to be found acceptable for the proposed purpose (14).

## “화장품 등 피부감작성 동물대체시험법(국소림프절시험법)

### 가이드라인(민원인 안내서)”

---

발행일	2021년 8월
발행인	식품의약품안전평가원장 서경원
편집위원장	독성평가연구부장 정자영
편집위원	윤혜성, 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?

— 공익신고자(친족 또는 동거인 포함)등이 공익신고 등으로 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