

국민 안전이 기준입니다
YOUR SAFETY IS OUR STANDARD

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 가이드라인

ELISA법을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-ELISA

2024. 9.



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원



Korean Center for the
Validation of Alternative Methods
한국동물대체시험법검증센터

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭	화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (ELISA법을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-ELISA) 가이드라인(민원인 안내서)
-----------	---

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	※ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
※ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서 · 안내서 구분	<input type="checkbox"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(※지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(※안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	※ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2024년 9월 일

담당자
 확 인(부서장)

강 남 희
 이 종 권

이 안내서는 화장품 등 피부감작성 동물대체시험법(ELISA법을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-ELISA)에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2024년 9월 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 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서 등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 비임상자원연구과 및 한국동물대체시험법검증센터(KoCVAM)에 문의하시기 바랍니다.
전화번호: 043-719-5502, 5506

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2013-4-001	2013. 3.	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(Ⅳ) 제정
2	안내서-0751-01	2017. 5.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호, 2017. 5. 16.)
3	안내서-1144-01	2021. 8.	화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (ELISA법을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-ELISA) 가이드라인(민원인 안내서) 개정 - 제목 수정, 내용 정비 및 OECD 가이드라인 영문본을 추가하여 개정
4	안내서-1144-02	2024. 9.	화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (ELISA법을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-ELISA) 가이드라인(민원인 안내서) 개정 - 본시험 최고 투여용량 변경사항 반영

목 차

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(ELISA법을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-ELISA)
가이드라인(민원인 안내서)



I. 요약문	1
1. 개요	1
2. 시험원리	1
3. 제한점 및 고려사항	2
4. 시험방법	2
5. 결과판정	6
6. 시험결과 및 보고	6
II. 번역문	8
III. 원문	35

I

요약문

1 ▶ 개요

본 시험법은 피부감작성의 독성발현경로(AOP, Adverse Outcome Pathway) 중 네 번째 핵심단계(key event)인 T-세포의 활성화와 증식을 평가하는 방법으로서, UN GHS¹⁾ 기준에 따라 피부감작성물질과 비감작성물질을 평가하는 ELISA법을 이용한 국소림프절시험법(LLNA: BrdU-ELISA²⁾)이다.

본 시험법은 피부감작성 반응 중 유도기(induction phase)에 나타나는 반응을 측정하는 것으로 시험물질 적용 부위와 가까운 림프절 내에서 림프구의 증식 수준을 나타내는 5-Bromo-2-deoxyuridine(BrdU) 양을 ELISA 방법을 이용해 정량적으로 측정하여 피부감작성물질을 구별한다.

LLNA: BrdU-ELISA는 기니픽 시험(TG406)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.

또한, LLNA(TG429)와 달리 방사성 동위원소를 사용하지 않고 피부감작성을 확인할 수 있기 때문에 작업 시 방사성 노출이나 방사성 폐기물 처리 문제가 없다.

2 ▶ 시험원리

LLNA: BrdU-ELISA의 기본 원리는 피부감작성 시험물질에 의한 적용 부위와 가까운 림프절 내에서 유발되는 림프구의 증식을 평가하는 것이다. 이러한 림프구의 증식은 시험물질 적용 후 이개림프절(auricular lymph node)에서 증식된 세포의 증가를 나타내는 BrdU 양을 측정하여 평가한다. BrdU는 티미딘(thymidine)의 유사체로서 증식하는 세포의 DNA에 들어가 결합하며, BrdU의 결합(incorporation)은 과산화효소로 표지된 BrdU를 특이적으로 인지하는 항체를 사용하는 ELISA 방법으로 측정한다.

1) UN GHS: United Nations Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals
2) LLNA: BrdU-ELISA: Local Lymph Node Assay: Bromodeoxyuridine-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

3 ▶ 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: BrdU-ELISA 시험법이 해당 시험물질에 적합한지를 결정해야 한다.

특정 금속물질, 일부 계면활성제 유형의 물질(피부자극물질인 경우 빈번하게 위양성 결과가 나타남), 용해도가 매우 낮거나 불용성 물질, 잠재적 교란기능의 작용기를 포함하는 시험물질류(test chemical classes) 또는 단일 시험물질(substances) 등의 경우[예: 지방산 글루타메이트(fatty acid glutamate), 올레산(oleic acid), 올레산 에스터(oleic acid ester), 지방알코올 1(fatty alcohol 1), 지방알코올 2(fatty alcohol 2), 폴리아미노기능성실록산(polyaminofunctional siloxane)] LLNA 시험법 적용에는 제한이 있기 때문에 기니픽 시험(TG406)이 필요할 수 있다.

본 시험법의 검증 데이터베이스에 따르면 LLNA: BrdU-ELISA 시험법에서 위양성 결과가 나온 비감작성물질은 감작지수 1.6~1.9의 값을 나타냈다(예: 양성값 경계). 따라서 감작지수 값이 1.6~1.9일 때, 비감작성물질에서 양성값 경계 결과가 나올 수 있다는 가능성을 고려해야 한다.

4 ▶ 시험방법

4.1. 실험동물 및 시험물질 준비

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

고체시험물질은 마우스에 적용하기 전에 적절한 용매/부형제에 용해시키거나 현탁액(부유액)을 만들고, 필요한 경우 이를 희석해야 한다. 액체시험물질은 원물질 그대로 사용하거나 희석하여 사용한다. 의료기기에서 일반적으로 나타나는 불용성 시험물질들은 적절한 용매를 사용하여 용출 가능한 성분들이 모두 용출되도록 하는 과장용출법(exaggerated extraction)³⁾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.

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

* 제품의 사용방법을 모의한 용출법

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

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

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

4.2. 예비시험

예비시험은 전신독성이나 과도한 국소 피부자극을 유발하는 농도에 대한 정보가 없을 때, LLNA: BrdU-ELISA 본시험에서 사용할 최대 투여용량을 선택하기 위하여 실시한다. 시험의 최대 투여용량은 액체시험물질의 경우 100 % 농도를 사용하며, 고체시험물질 또는 현탁액의 경우 용해 가능한 최대 농도를 사용해야 한다.

예비시험은 LLNA: BrdU-ELISA 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(6일 차)에 측정하여 기록한다(표 1). 또한 각 마우스 양쪽 귀의 흥반을 관찰하여 표 2에 따라 점수화한다. LLNA: BrdU-ELISA 본시험을 위한 최고 투여용량은 예비시험에서 사용된 농도들 중 전신독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하지 않는 가장 높은 농도를 선택한다.

표 1. 예비시험 일정

	1일	2일	3일	4일	5일	6일
일반증상 관찰	○	○	○	○	○	○
체중 측정	○					○
귀 두께 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

1일 차에는 각 마우스의 체중, 귀 두께 및 모든 일반증상을 관찰하여 기록한다. 시험물질 희석액 25 μ L, 부형제 또는 양성대조물질(실험실 방침에 근거한 동시 또는 최근에 사용된 양성대조물질)을 양쪽 귀의 배면(귓등) 전체에 바른다. 2일 차에는 1일 차의 적용 절차를 반복하고, 일반증상 및 홍반을 관찰한다. 3일 차에는 1일 차의 적용 절차를 반복하고, 귀 두께를 측정하며 일반증상 및 홍반을 관찰한다. 4일 차에는 일반증상 및 홍반을 관찰하고, 아무것도 처리하지 않는다. 5일 차에는 BrdU(10 mg/mL) 용액 0.5 mL을 복강 내에 주사(마우스당 5 mg 주사)하고, 일반증상 및 홍반을 관찰한다. 6일 차에는 각 마우스의 체중, 귀 두께, 홍반 및 일반증상을 관찰하여 기록하며, 5일 차에 투여한 BrdU 용액이 적용된 후 약 24시간이 경과하면 동물을 안락사시킨다. 각 마우스에서 시험물질을 도포한 부위의 이개림프절을 절개하고 인산완충용액(PBS)에 넣어 보관한다(표 3).

표 3. 본시험 일정

	1일	2일	3일	4일	5일	6일
일반증상 관찰	0	0	0	0	0	0
체중 측정	0					0
귀 두께 측정	0		0			0
홍반증상 평가		0	0	0	0	0
물질 도포	0	0	0			
BrdU 용액 주사					0	
안락사						0

림프절 단일세포 현탁액은 200 마이크로 메쉬 스테인리스 스틸 거즈를 통한 부드러운 물리적인 분해 방법 또는 단일세포 현탁액을 만들 수 있는 다른 기법 등을 이용하여 준비한다. 세포 현탁액을 anti-BrdU 항체와 반응시킨 후 마이크로 플레이트리더를 이용하여 370 nm와 492 nm (참조파장)에서 흡광도를 측정한다.

4.4. 결과 평가

4.4.1. BrdU 표지 지수(BrdU labelling index)는 다음과 같이 계산한다.

$$\text{BrdU 표지 지수} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

* ABS= 흡광도, em= 방출 파장, ref= 참조 파장

4.4.2. 각 시험물질군의 결과는 평균 감작지수(SI)로 나타낸다. 감작지수는 각 시험물질군과 양성대조군 마우스의 평균 BrdU 표지 지수를 부형제대조군의 평균 BrdU 표지 지수로 나누어 계산한다.

$$\text{감작지수(SI)} = \frac{\text{시험물질군 또는 양성대조군의 평균 BrdU 표지 지수}}{\text{부형제대조군의 평균 BrdU 표지 지수}}$$

5 ▶ 결과판정

5.1 결과판정

판정기준은 평균 감작지수가 1.6 이상($SI \geq 1.6$)일 때 결과를 양성으로 간주한다.

감작지수(SI)	판정
≥ 1.6	피부감작성
< 1.6	비감작성

하지만 양성값 경계 결과(예: SI 값 1.6~1.9)에 대해서는 이러한 결괏값이 양성임을 확인하기 위해 SI 값과 함께 용량-반응 상관성 정도, 전신독성 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 14를 초과하는(> 14) 과도한 피부자극 또는 전신독성을 나타내지 않는 농도에서 부형제대조군 대비 SI가 1.6 이상(≥ 1.6)으로 양성 반응을 나타내야 한다.

6 ▶ 시험결과 및 보고

데이터는 개별 마우스 BrdU 표지 지수 값, BrdU 표지 지수의 그룹 평균, 관련 오차[예: 표준편차(SD) 또는 표준오차(SEM)], 용매/부형제대조군에 대한 각 투여군의 평균 SI를 나타내는 표 형식으로 요약한다. 시험 보고서에는 다음의 내용을 포함하도록 한다.

시험물질

- 공급원, 로트 번호, 사용기한(가능한 경우), 시험 물질의 안정성(알려진 경우)
- 단일성분물질의 경우 화학물질 식별정보, 물리적 형태, 수용성, 추가적인 관련 물리화학적 특성
- 다성분물질, UVCBs 및 혼합물의 경우 구성성분의 화학물질 정보, 정량적 비율, 관련 물리화학적 특성 등 가능한 자세히 특성 규명
- 용매/부형제 및 대조군의 식별 데이터(예: CAS 번호, 순도 등)
- 부형제 선정의 타당성에 대한 근거

실험동물

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

시험조건

- ELISA 키트의 공급원, 로트 번호, 제조업체의 품질보증/품질관리 데이터
- 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 판정기준

신뢰성 확인

- 최근 실시한 신뢰성 확인 결과 요약(사용된 시험물질, 농도, 양성대조군, 부형제대조군 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 처리군의 개별 마우스 BrdU 표지 지수, SI 값, 평균 및 관련 오차
- 용량-반응 상관성, 이상치(outliers) 분석 결과, 통계분석(적절한 경우)

결과 토의

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

II

번역문(OECD TG442B 서론)

ELISA 또는 유세포분석을 이용한 국소림프절시험법 Local lymph node assay: BrdU-ELISA or -FCM

개요

1. 피부감작성 물질이란 UN의 화학물질의 분류 및 표시에 관한 국제조화시스템(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, UN GHS)에 정의된 바와 같이 반복적 피부 접촉 후 알레르기 반응을 유도하는 물질을 일컫는다(1).
2. 피부감작에 관여하는 주요한 생물학적 현상에 대해 일반적인 동의가 있다. 피부감작과 관련된 화학적/생물학적 기전을 설명하는 독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP)의 형식으로 설명될 수 있다(2). AOP는 분자 수준의 초기 단계에서 중간 단계를 거쳐 유해효과, 즉 알레르기성 접촉성 피부염을 일으키는 과정으로 이루어진다. AOP는 유기화학물질 등의 1차 아민(라이신) 및 티올(시스테인)과 반응하는 화학물질에 중점을 둔다. 이와 관련하여, 분자 수준의 초기 단계(첫 번째 핵심단계)는 피부 단백질의 친핵성 중심에 전자친화성 물질들이 공유 결합하는 것이다. 첫 번째 핵심단계(key event)는 *in chemico* 펩타이드 반응을 이용한 피부감작성시험법[Direct Peptide Reactivity Assay(DPRA), TG442C]을 사용한다(3). AOP의 두 번째 핵심단계는 각질세포에서 발생하며, 염증 반응뿐만 아니라 항산화/전자친화성 반응요소-의존성 경로(antioxidant/electrophile response element(ARE)-dependent pathways)와 같이 특정한 세포 신호전달 경로 관련 유전자 발현의 변화를 측정하며, 생체의(*in vitro*) ARE-Nrf2 루시퍼라아제 시험법(KeratinoSens™ 또는 LuSens, TG442D)을 사용한다. 세 번째 핵심단계는 수지상세포(Dendritic Cells, DC)의 활성을 평가하는 것으로서, 일반적으로 특정 세포 표면 표지자, 케모카인, 싸이토카인의 발현을 평가하며, TG442E에 설명된 바와 같이 생체의 인체 세포주 활성화 시험법(Human Cell Line Activation Test, h-CLAT), 생체의 U937 세포주 활성화 시험법(U-SENS™) 또는 Interleukin-9 reporter 유전자 시험법(IL-8 Luc assay)을 사용한다(5). 네 번째 핵심단계는 T-세포의 증식을 평가하며, 마우스를 이용한 생체내(*in vivo*) 국소림프절시험법(Local Lymph Node Assays, LLNA)을 사용한다(6).

3. 마우스를 이용하여 피부감작성을 판별하기 위한 첫 번째 시험지침(Test Guideline, TG)인 국소림프절시험법(LLNA; TG429)은 2002년에 채택되었고 이후 개정되었다(7). LLNA 검증연구에 대한 연구내용 및 전문가 검토는 발표된 바 있다(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16). LLNA에서 림프구 증식을 측정하는 데 방사성 동위원소인 3H-티미딘(thymidine)이나 방사성 요오드(iodine)가 사용되므로 방사능의 획득, 사용 또는 폐기가 문제가 되는 지역에서는 LLNA의 적용이 제한된다.

4. 본 시험법은 LLNA를 변형시킨 비방사성 시험법이며, 림프구 증식을 측정하기 위해 ELISA 또는 유세포분석을 이용하여 비방사성 물질인 5-Bromo-2-deoxyuridine(BrdU, CAS No 59-14-3)을 사용한다.

- ELISA법을 이용한 국소림프절시험법: BrdU-ELISA(부속서 I)
- 유세포분석을 이용한 국소림프절시험법: BrdU-FCM(부속서 II)

5. LLNA와 마찬가지로 LLNA: BrdU-ELISA와 LLNA: BrdU-FCM은 피부감작성의 유도 단계와 관련되며, 용량-반응 평가에 적합한 정량적 데이터를 제공한다. 또한, DNA에 방사성을 표지하지 않고 피부감작성을 판별할 수 있기 때문에 방사능 물질에 대한 작업 시 노출이나 폐기물 처리에 문제가 없다. 결과적으로 피부감작 물질을 판별하는 데 기니픽의 사용(TG406)을 줄이고 마우스의 사용을 증가시키게 된다(17).

6. 본 시험법은 마우스를 사용하여 화학물질의 피부감작성을 평가하고자 마련하였다. TG406은 기니픽 시험, 특히 기니픽 극대화 시험과 Buehler 시험으로 이루어진다(17). LLNA(TG429)와 변형된 비방사성 시험법인 LLNA: BrdU-ELISA, FCM(TG442B), 그리고 LLNA: DA(TG442A) 모두 TG406의 기니픽 시험에 비해 동물의 수와 고통을 줄이는 장점이 있다(7)(17)(18).

참고문헌

- 1) UN, 2017. Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Seventh revised edition. United Nations, New York. Available at: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html
- 2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)_10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)_10/PART1&docLanguage=En)
- 3) OECD (2015), In Chemico Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442C, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 4) OECD (2015), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442D, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 5) OECD (2017), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442E, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 6) OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 7) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 8) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.
- 9) 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.

- 10) 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.
- 11) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- 12) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- 13) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.
- 14) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
- 15) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249- 257.
- 16) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at:
[<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- 17) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A. Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 18) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

부록 I. 용어정의

정확도(Accuracy): 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험 수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”과 “정확도(Accuracy)”는 같은 의미로 쓰임(12)

독성발현경로(Adverse Outcome Pathway, AOP): 분자 수준의 시작단계를 거쳐 체내 유해반응까지 표적 화학물질 또는 유사한 화학물질 그룹으로부터 일어나는 일련의 현상(2)

기준시험물질(Benchmark test chemical): 시험물질의 비교기준으로 사용되는 물질. 기준물질은 다음의 특성을 가져야 한다. (i) 일관성 있고 신뢰할 수 있는 공급원; (ii) 시험되는 물질과 구조적, 기능적 유사성; (iii) 알려진 물리/화학적 특성; (iv) 알려진 효과 입증 자료; (v) 원하는 반응의 범위 내 알려진 효력

위음성(False negative): 양성물질이 음성으로 판정되는 것(12)

위양성(False positive): 음성물질이 양성으로 판정되는 것(12)

유해성(Hazard): 물질이 생명체, 생태계 또는 특정 인구집단에 노출될 때, 유해영향을 야기할 가능성이 있는 물질 또는 상황(situation)의 본질적 특성

실험실간 재현성(Inter-laboratory reproducibility): 다른 실험실에서 동일한 시험절차와 시험물질로 시험을 수행하였을 때 양적 또는 질적으로 유사한 결과를 생산할 수 있는지 측정하는 것으로써 시험법의 실험실 간 전수 가능 여부를 나타내는 것(12)

실험실내 재현성(Intra-laboratory reproducibility): 동일한 실험실에서 자격을 갖춘 사람이 다른 시점에서 특별한 실험절차로 같은 결과를 생산할 수 있는 정도(12)

혼합물(Mixture): 서로 반응하지 않는 2가지 이상의 물질로 구성된 혼합물 또는 용액

단일성분물질(Mono-constituent substance): 정량적인 구성으로 정의되며, 하나의 주요성분이 적어도 80 % (w/w) 이상인 물질

다성분물질(Multi-constituent substance): 두 가지 이상의 주요성분의 양이 $\geq 10\%$ (w/w) 및 $< 80\%$ (w/w)인 물질. 다성분 물질은 생산과정의 산물이다. 혼합물과 다성분물질의 차이는 혼합물은 두 가지 이상의 물질을 화학반응 없이 섞어서 얻고, 다성분물질은 화학반응의 산물임

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

유사시험법평가기준(Performance Standards): 검증된 시험방법을 기반으로 기전적, 기능적으로 유사하게 제시된 시험방법의 비교 가능성을 평가하는 기준. 다음 사항을 포함함

- (1) 필수적 시험 방법 구성요소;
- (2) 검증된 시험방법의 허용 가능한 수행 검증을 위해 사용된 화학물질들 중에서 선택된 최소한의 기준 물질 리스트;
- (3) 검증된 시험 방법에서 얻은 내용을 기반으로 정확성과 신뢰성의 비교 수준. 이는 제시된 시험 방법이 기준 화학물질의 미니멀리스트를 이용해 평가했을 때 증명되어야 함(12)

숙련도물질(Proficiency Chemicals(substance)): 표준화된 시험 방법의 기술적인 능력을 증명하기 위해 실험실에서 사용되는 수행 기준에 포함된 기준물질. 이 물질의 선택 기준은 일반적으로 반응 범위를 대표한다는 것과 시중에서 구할 수 있는 것, 그리고 고품질의 유용한 시험자료가 있는 것

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

참고물질(Reference chemicals): 관심의 대상이 되는 종(species)이나 참고할 수 있는 *in vitro* 또는 *in vivo* 시험계(reference test system)에서의 반응이 이미 알려져 있고, 검증과정에서 선택되어 이용된 시험물질, 이 물질들은 시험법이 사용될 것으로 예상되는 시험물질 종류를 대표해야 하며, 시험물질이 일으킬 것으로 예상되는 반응의 모든 범위(강, 약, 음성)를 나타내야 한다. 검증절차의 단계, 시험법 및 시험목적에 따라 다른 참고물질 목록이 필요할 수도 있음

상관성(Relevance): 시험과 관심 효과의 관련성 및 시험이 특정 목적에 의미 있고 유용한 지에 대한 설명. 상관성은 시험이 얼마나 관심 생물학적 효과를 정확하게 측정하고 예측하는 지 나타내며, 상관성은 시험법의 정확도(일치성)를 내포함(12)

신뢰성(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰성은 실험실 내, 실험실 간 재현성(reproducibility)과 실험실 내 반복성(repeatability)으로 평가됨(12)

재현성(Reproducibility): 동일한 방법으로 동일한 물질을 시험하였을 때 나온 결과의 일치(12)

수신자 조작 특성(Receiver Operating Characteristic, ROC) 분석: 예측 모형에 대하여 최적의 판정기준값(cut-off value)을 설정하기 위한 분석. 판정기준값을 사용한 예측 모형을 통해, 시험물질이 양성 혹은 음성으로 분류될 수 있음. 판정기준값의 모든 편차는 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)의 변화에 따라 반대 방향으로 변하는 결과로 이어질 것임. ROC 분석은 대개 진단 시험에 대한 최적의 판정기준값을 구하는 데 사용함

민감도(Sensitivity): 시험법으로 모든 양성/활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 민감도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항(12)

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

특이도(Specificity): 시험법으로 모든 음성/비활성 화학물질이 정확하게 분류되는 비율. 특이도는 시험법의 범주 결정에 대한 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 중요 고려사항(12)

자극지수(Stimulation Index, SI): 시험물질의 피부감작 가능성을 평가하기 위해 산출된 값. 부형제 대조군과 시험물질 처리군의 증식 정도의 비율

물질(Substance): 생산과정을 통해 얻어지거나 자연 상태로 얻어진 화학원소들(elements)과 이들로 이루어진 구성물질(compound). 생산품의 안정성을 유지시키는데 필요한 첨가제와 생산과정에서 유래하는 불순물을 포함하지만, 해당물질의 안정성이나 조성의 변화에 영향을 주지 않고 분리될 수 있는 용매는 제외함(1)

시험물질(Test chemical): 시험의 대상이 된 물질을 말함

UVCB: 알려지지 않은 물질이거나 가변적인 구조를 가지며, 복잡한 반응물이거나 생물학적인 재료

II

번역문(OECD TG442B 부속서 I)

생체내(*in vivo*) 피부감작성: ELISA법을 이용한 국소림프절시험법
***In Vivo* Skin Sensitisation: The Local Lymph Node Assay:**
BrdU-ELISA

초기 고려사항, 적용가능성 및 제한점

1. LLNA: BrdU-ELISA 시험법은 검증 및 검토가 이루어지고 독립적인 국제 전문평가 위원단에 의해 일부 제한점을 가지면서 피부감작성 및 비감작성물질을 식별하는 데 유용한 시험법으로 추천되었다(1)(2)(3).
2. LLNA: BrdU-ELISA 시험법은 특정 제한점을 가지면서 잠재적인 피부감작성 시험물질을 식별하기 위한 변형된 비방사성 LLNA 시험법(a modified non-radioactive LLNA method)이다. 이는 생체내(*in vivo*) 시험이 필요한 모든 경우에 방사성 LLNA(TG429) 또는 기니픽 시험(TG406)(4)을 대신하여 LLNA: BrdU-ELISA 시험법을 사용해야 한다는 의미가 아니라, LLNA: BrdU-ELISA 시험법이 동일한 기능을 가지며 양성 및 음성 결과에 일반적으로 더 이상 추가적인 확인이 필요하지 않은 대체시험법으로 사용할 수 있는 것이다(1)(2). 시험을 수행하는 실험실은 시험 전 시험물질에 대해 모든 가능한 정보를 고려해야 한다. 이러한 정보에는 시험물질의 특성 및 화학 구조, 물리화학적 성질, 생체외(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*) 독성시험 결과, 구조적으로 유사한 물질의 독성시험 결과 등이 포함된다. LLNA: BrdU-ELISA 시험법이 해당 시험물질에 적합한지[일부 화학물질의 경우 LLNA: BrdU-ELISA 시험법을 사용할 수 없음(3단락 참조)]를 결정하는 것과 투여용량을 설정하는데에 이러한 정보를 참고해야 한다.
3. LLNA: BrdU-ELISA 시험법은 생체내 시험법으로서, 알레르기성 접촉 감작 활성화(allergic contact sensitising activity)의 평가에 동물 사용을 배제할 수 없다. 따라서 적절한 *in vitro*, *in chemico*, *in silico* 시험법의 적용 가능 범위를 검토하여, 이에 따라 동물 시험

대신에 이러한 접근방식의 사용 가능성을 고려해야 한다. 하지만 다른 LLNA 시험법과 마찬가지로, LLNA: BrdU-ELISA 시험법은 기니픽 시험(TG406)(4)과 비교 시, 알레르기성 접촉 감작 활성을 평가하는데 사용되는 동물의 수를 줄일 수 있다. 더욱이 LLNA: BrdU-ELISA 시험법은 TG406 시험법과는 달리 야기(challenge)에 의해 유도되는 피부 과민반응 유발이 필요하지 않기 때문에 알레르기성 접촉 감작성 시험에서 동물의 사용 방식을 상당히 개선(통증 및 고통 경감)한다. 또한, LLNA: BrdU-ELISA 시험법은 기니픽 극대화 시험(4)처럼 보조제(adjuvant)를 사용하지 않기 때문에 동물의 고통을 줄여준다. TG406(4)에 비해 LLNA: BrdU-ELISA 시험법의 이점이 있음에도 불구하고, 일부 제한점으로 인해 TG406 시험법이 필요한 경우가 있다[예: 특정 금속물질의 시험, 피부자극물질의 위양성 결과(일부 계면활성제 유형의 물질)(5)(6), 시험물질의 용해도(거의 용해되지 않거나 불용성 물질 등)]. 또한 잠재적 교란기능의 작용기를 포함하는 시험물질류(test chemical classes) 또는 단일 시험물질(substances)[예: 지방산 글루타메이트(fatty acid glutamate), 올레산(oleic acid), 올레산 에스터(oleic acid ester), 지방알코올 1(fatty alcohol 1), 지방알코올 2(fatty alcohol 2), 폴리아미노기능성 실록산(polyaminofunctional siloxane)(7)]의 경우 기니픽 시험(TG406)(4)이 필요할 수 있다. LLNA 시험에 대해 확인된 다른 제한점(6)은 LLNA: BrdU-ELISA 시험법에도 적용하는 것을 권장한다(1). 이와 같이 확인된 제한점을 제외하면 시험물질의 특성이 LLNA: BrdU-ELISA 시험법의 정확도에 영향을 주지 않는 한, 모든 시험물질에 적용할 수 있다. 또한 감작지수(SI) 1.6~1.9 값이 얻어지는 경우(31~32단락 참조) 양성 경계값 결과의 가능성을 고려해야 한다. 이는 $SI \geq 1.6$ (6단락 참조) 기준을 사용하는 43개 물질의 검증 데이터베이스에 근거하고 있는데, LLNA: BrdU-ELISA 시험법은 모든 32개 LLNA 감작성물질을 정확하게 식별했지만 비감작성물질 11개 중 2개는 잘못 식별하였고, 그 물질들은 SI 1.6~1.9의 값을 나타냈다(예: 양성값 경계)(1). 하지만 SI 값을 설정하고 시험의 예측력을 계산하는데 동일한 데이터세트가 사용되었으므로 이 결과는 실제 예측력을 과대추정한 값일 수 있다.

4. 혼합물 또는 시험하기 어려운 화학물질(예: 불안정성) 및 본 가이드라인의 적용 범위에 명확하게 포함되지 않는 시험물질에 대해서는 시험 전에 시험이 과학적으로 의미 있는 결과를 도출하는지 우선적으로 검토해야 한다.
5. 용어정의는 부록 1에 수록되어 있다.

시험 원리

6. LLNA: BrdU-ELISA 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 피부감작성물질로 판정하기 위해서는 SI 지수가 1.6 이상($SI \geq 1.6$)이어야 한다. 본 가이드라인의 시험법은 물질 적용 부위의 이개림프절(auricular lymph node)에서 증식된 세포수의 증가를 나타내는 BrdU 양의 측정을 기반으로 한다. BrdU는 티미딘(thymidine)의 유사체로서 증식하는 세포의 DNA에 들어가 결합한다. BrdU의 결합(incorporation)은 BrdU에 특이적인 과산화효소로 표지된 항체(antibody labelled with peroxidase)를 사용하는 ELISA 방법으로 측정한다. 이때, 과산화효소의 기질을 첨가하면 기질과 반응하여 특정 파장에서 정량 가능한 유색 결과물을 생성하고 이는 미량정량판독기(microtiter plate reader)를 통해 측정된다.

시험 설명

동물종 선택

7. 실험동물로는 마우스를 사용한다. LLNA: BrdU-ELISA 시험법의 검증 연구가 CBA/JN 계통으로 수행됨에 따라 해당 종이 선호되며(1)(3), 출산 및 임신 경험이 없는 암컷 마우스를 사용한다. 시험 시작 시 마우스는 8~12주령이어야 하며, 체중 편차는 최소로 하되 평균 체중의 20 %를 초과해서는 안 된다. LLNA: BrdU-ELISA 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 그룹별(8)로 바닥이 단단한 케이지(9)에서 적절한 바닥재(substrate) 및 깔짚(10)(11)(12)(13)을 사용하여 사육해야 한다. 실험동물실의 온도는 22 ± 3 °C로 유지되어야 하고, 상대습도는 최소한 30 %이상

단, 가급적 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 가급적 비침습적인 제모(14)(15)로 개체 식별을 표시하며 실험실 환경에 순화를 위해 투여 시작 전 최소 5일간 케이지에 키운다. 투여 시작 전 모든 마우스를 검사하여 육안상 피부 병변이 없음을 확인한다. 마우스는 모든 검사 과정 중 비협오적인 (non-aversive) 방법(예: cupping, tunnel handling)으로 다루어야 한다(16).

시험 용액의 조제

10. 고체시험물질은 마우스에 적용하기 전 적절한 용매/부형제에 용해시키거나 현탁액을 만들고, 필요한 경우 이를 희석해야 한다. 액체시험물질은 원물질 그대로 사용하거나 희석하여 사용한다. 의료기기에서 일반적으로 나타나는 불용성 시험물질들은 적용하기 전에 적절한 용매를 사용하여 용출 가능한 성분들이 모두 용출되도록 하는 과장용출법(exaggerated extraction)을 사용해야 한다(35). 시험물질 보관에 대한 안정성 자료가 없는 경우 시험 당일에 조제 해야 한다.

신뢰성 확인

11. 양성대조군(PC)은 반응정도가 잘 알려진 감작성물질의 적절하고 재현성 있는 민감도에 의해 본 시험이 적절하게 수행되었는지 증명하기 위해 사용한다. 실험실의 수행능력을 확인하고 실험실 내 및 실험실 간 재현성과 유사성(comparability)을 평가하기 위하여 동시 양성대조군을 포함할 것을 권고한다. 일부 규제 당국 또한 각 시험마다 양성대조군의 사용을 요구하기 때문에 LLNA: BrdU-ELISA 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(12단락 참조). 양성대조군은 감작지수가 부형제대조군 대비 1.6 이상으로 예상되는 노출 수준에서 LLNA: BrdU-ELISA 양성 반응을 나타내어야 한다. 양성대조물질의 용량은 과도한 피부자극 또는 전신독성은 야기하지 않고, 유도반응을 재현성 있고 과도하지

않게(예: SI > 14은 과한 것으로 간주됨) 유발하는 농도를 선택해야 한다. 선호하는 양성대조물질은 아세톤:올리브오일(acetone:olive oil, AOO, 4:1, v/v)에 희석한 25 % 헥실시나믹알데히드(hexyl cinnamic aldehyde, HCA)(CAS 번호 101-86-0)와 25 % 유제놀(eugenol)(CAS 번호 97-53-0)이다. 충분한 타당성이 제시되는 경우, 위의 기준에 부합하는 다른 양성대조물질을 사용할 수 있다.

12. 동시 양성대조군의 포함을 권장하는 반면, LLNA: BrdU-ELISA 시험을 정기적(최소 한 달에 한 번 이상)으로 수행하고, 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. 적절한 기간 내에(1년 미만) 최소 10회의 독립적인 시험에서 양성대조군의 일관적인 양성 결과를 도출함으로써 LLNA: BrdU-ELISA 시험법의 숙련도를 보일 수 있다.
13. LLNA: BrdU-ELISA 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 시험절차의 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(17).

15. 양성대조물질의 용매는 일관된 반응을 유발하는 것으로 알려진 부형제(예: 아세톤:올리브오일, AOO, 4:1, v/v)를 사용해야 하지만, 규제 여건에 따라 비표준 부형제(임상적/화학적으로 관련 있는 제형)가 또한 필요할 수 있다(23). 만약 동시 양성대조군을 시험물질과는 다른 부형제를 사용하여 시험하는 경우 동시 양성대조군에 대한 부형제를 별도로 시험에 포함시켜야 한다.
16. 특정 화학물질류(specific chemical class) 또는 특정 반응 범위의 시험물질을 평가하는 경우에 있어서, 기준시험물질(benchmark test chemicals)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: BrdU-ELISA 시험으로 얻은 근거 자료(supporting data)
 - 다른 동물 종이나 인체 시험으로 얻은 근거 자료(supporting data)

시험방법

동물 수 및 투여용량

17. 투여용량군당 최소 4마리의 마우스를 사용하며, 최소 3개 농도의 시험물질군, 동시 부형제대조군 및 양성대조군(실험실 규정을 근거로, 11~15단락에서 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 2와 27에 제시된 권고사항을 기반으로 한다. 3개 연속 투여용량의 경우, 보통 적절히 연속되는 농도를 선정한다(예: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 % 등). 시험농도의 선정에는 충분한 과학적 근거가 뒷받침되어야 한다. 3개의 연속되는 농도 선정 시 가능하면 시험물질과 관련된 기존의 모든 독성정보(예: 급성 독성 및 피부 자극), 구조 및 물리화학적 정보(또는 구조적으로 관련된 시험물질)를 고려하여 전신독성 또는 과도한 국소 피부 자극을 피하면서 가장 높은 농도로 노출을 최대화한다(19)(20). 이와 같은 정보가 없는 경우 사전 예비시험이 필요하다(21~24단락 참조).

19. 부형제는 시험 결과에 영향을 주지 않아야 하며, 시험물질 적용에 적합한 용액/현탁액을 만들면서 가장 높은 농도를 얻기 위하여 용해도를 최대화하는 것에 기반하여 선정해야 한다. 권장되는 부형제는 아세톤:올리브 오일(AOO, 4:1 v/v), N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide), 메틸에틸케톤(methyl ethyl ketone), 프로필렌글리콜(propylene glycol), 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide)(5)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(33단락 참조). 또한, 양성대조군 동물 수의 감소 가능 여부에 대한 평가는 개별 마우스의 자료가 수집된 경우에만 가능하다(22). 뿐만 아니라 일부 국가의 규제 당국은 개별 마우스 데이터의 수집을 요구한다. 향후 규제 당국이 원래의 방식으로 수집한 결과(예: 집단 동물 데이터)를 나중에 다른 요구사항(예: 개별 동물 데이터)에 의해 고려하는 경우, 개별 동물 데이터를 수집하는 것이 추후 필요한 중복 시험을 피함으로써 동물 복지 측면에서 이점을 제공한다.

예비시험

21. 최고 투여용량을 결정하기 위한 정보가 없는 경우(18단락 참조) LLNA: BrdU-ELISA 시험법에서 적절한 투여용량을 결정하기 위해 예비시험을 수행해야 한다. 예비시험의 목적은 전신독성(24단락 참조)이나 과도한 국소 피부자극(23단락 참조)을 유발하는 농도에 대한 정보가 없는 경우 본시험의 최대 투여용량 선택에 대한 지침을 제공하는 것이다. 시험의 최대 투여용량은 액체시험물질의 경우 100 % 농도, 고체시험물질 또는 현탁액의 경우 가능한 최대 농도이어야 한다.
22. 예비시험은 LLNA: BrdU-ELISA 본시험과 동일한 조건에서 수행되며 단, 림프절 증식은 평가하지 않고 투여용량군당 한 마리 또는 두 마리의 사용이 제안된다. 모든 마우스의 전신독성 또는 적용 부위의 국소 자극 등 모든 일반증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전 및 종료 전(6일 차)에 기록한다. 각 마우스 양쪽 귀의 홍반을 관찰하고, 표 1에 따라 점수화한다(20).

두께측정기(예: 디지털 마이크로미터 또는 피코크 다이얼 두께측정기)를 사용하여 1일 차(적용 전), 3일 차(첫 번째 적용 약 48시간 후) 및 6일 차에 귀 두께를 측정한다. 또한 6일 차의 귀 두께는 마우스를 안락사시킨 후 귀 부위를 이어핀치로 뚫어 무게를 측정하여 결정할 수 있다. 과도한 국소 자극은 홍반 점수 3 이상 또는 귀 두께가 25 % 이상 증가한 경우를 말한다(21)(22). LLNA: BrdU-ELISA 본시험을 위한 최고 투여용량은 예비시험에서 사용된 농도(18단락 참조) 중 전신독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하지 않는 가장 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(21)(22) 이외에도 부형제대조군 대비 시험물질군에서 귀 두께의 통계적으로 유의한 증가는 LLNA에서 자극을 확인하는 데 사용된다(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28). 그러나 귀 두께의 증가가 25 % 미만일 때 통계적으로 유의하게 나타날 수 있지만, 이는 특별하게 과도한 자극과 연관되지는 않는다(25)(26)(27)(28)(29).
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 전신독성(30)의 징후일 수 있으며, 따라서 LLNA: BrdU-ELISA 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 안락사시킨다(31).

본시험 일정

시험 일정은 다음과 같다.

- 1일 차:
각 마우스의 체중 및 모든 일반증상을 관찰하여 기록한다. 시험물질 희석액 25 μ L, 부형제 또는 양성대조물질(11~15단락에서 고려된 것처럼 실험실 방침에 근거한 동시 또는 최근에 사용된 양성대조물질)을 각 콧등에 바른다.
- 2일 차 및 3일 차:
1일 차의 적용 절차를 반복한다.
- 4일 차:
아무것도 처리하지 않는다.
- 5일 차:
BrdU(10 mg/mL) 용액 0.5 mL(마우스 당 5 mg)을 복강 내에 주사한다.
- 6일 차:
각 마우스의 체중 및 모든 일반증상을 기록한다. BrdU 용액을 투여하고 약 24시간 후, 마우스를 안락사시킨다. 각 마우스에서 시험물질을 도포한 부위의 이개림프절을 절개하고 인산완충용액(PBS)에 넣어 보관한다. 림프절의 확인과 절개에 대한 도표 및 세부 사항은 참고문헌(17)을 참조한다. 본시험에서 국소 피부 반응의 관찰을 위해서는 귀 홍반의 점수화 또는 귀 두께 측정(두께측정기를 사용하거나 해부 시 이어핀치 무게 측정)과 같은 추가적인 항목들이 시험 프로토콜에 포함될 수 있다.

세포 현탁액의 준비

25. 200 마이크로 메쉬 스테인리스 스틸 거즈를 통한 부드러운 물리적인 분해 또는 단일세포 현탁액(부유액)을 만들 수 있는 다른 기법(예: 일회용 플라스틱 막자를 사용하여 림프절을 으깨고 #70 나일론 메쉬로 거름)으로 각 마우스 양쪽에서 적출한 림프절의 단일세포 현탁액을 준비한다. 이 시험에서는 림프절 세포 현탁액 준비 과정이 중요하므로 모든 실험자는 사전에 숙달된 기술을 갖추고 있어야 한다. 부형제대조군 마우스의 림프절은 크기가 작기 때문에 SI 값에 인위적인(artificial) 영향을 주지 않도록 세심한 작업이 필요하다. 각 경우에 림프절 세포 현탁액의 목표량(target volume)은 결정된 최적의 양(optimised volume)(약 15 mL)으로 맞춰야 한다. 최적의 양(optimised volume)은 부형제대조군의 평균 흡광도를 0.1~0.2 이내로 얻는 것에 기반한다.

세포증식 측정(림프구 DNA의 BrdU 함량 측정)

26. BrdU는 상용 키트(검증연구에서는 Roche Applied Science, Mannheim, Germany, 사용)를 사용하여 ELISA 방법으로 측정한다. 일치하는 결과를 주는 경우 다른 BrdU-ELISA 키트를 사용할 수 있다. 림프절 세포 현탁액 100 μ l를 편평한 바닥을 가진 마이크로플레이트의 웰(well)에 넣는다(3개 반복시료). 림프절 세포를 변성 및 고정한 후 페록시다아제가 결합된 anti-BrdU 항체를 각 웰(well)에 넣어 반응을 유도한다. 이후 세척을 통해 결합되지 않은 anti-BrdU 항체를 제거하고 TMB(tetramethyl benzidine) 기질 용액을 넣고 발색체(chromogen)가 생성되도록 한다. 그리고 370 nm와 참조 파장 492 nm에서 흡광도를 측정한다. 모든 경우에 시험 조건을 최적화해야 한다(26단락 참조).

관찰

일반증상 관찰

27. 각 마우스에서 적용 부위의 국소 자극이나 전신독성에 대한 일반증상이 있는지를 최소 하루에 한 번 주의 깊게 관찰해야 한다. 모든 관찰 사항은 각 마우스 별로 체계적으로 기록하여 유지한다. 관찰(monitoring) 계획은 전신독성 또는 과도한 국소 피부 자극, 안락사가 필요한 피부 부식을 즉시 식별할 수 있는 기준을 포함해야 한다(31).

체중

28. 25단락에서 언급한 바와 같이, 각 마우스의 체중은 시험 시작 시점과 예정된 안락사 시 측정해야 한다.

결과의 계산

29. 각 시험물질군의 결과는 평균 감작지수(SI)로 나타낸다. 감작지수는 각 시험물질군과 양성대조군 마우스의 평균 BrdU 표지 지수를 부형제대조군의 평균 BrdU 표지 지수로 나누어 계산한다. 부형제대조군에 대한 감작지수의 평균은 “1”이 된다.

30. BrdU 표지 지수(BrdU labelling index)는 다음과 같이 정의된다.

$$\text{BrdU 표지 지수} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

여기서, em = 방출 파장, ref = 참조 파장

31. 판정기준은 평균 감작지수가 1.6 이상($\text{SI} \geq 1.6$)일 때 결과를 양성으로 간주한다(1). 하지만 경계값 결과(예: SI 값 1.6~1.9)를 양성으로 판정할 때에는 용량-반응 상관 정도, 통계적 유의성, 용매/부형제 및 양성대조물질 반응의 일관성을 또한 고려한다(5)(32)(33).

32. SI 1.6~1.9의 양성반응 경계값에 대해서 그러한 결괏값이 양성임을 확인하기 위해 SI 값과 함께 용량-반응 상관성, 전신독성 또는 과도한 자극의 증거, 통계적 유의성(해당되는 경우) 등의 추가 정보를 고려할 수 있다(1). 또한 알려진 피부감작성물질과 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(34)에서 자세히 논의된다.

33. 개별 마우스의 데이터 수집은 데이터의 용량-반응 상관성 여부 및 상관 정도에 대한 통계적 분석을 가능하게 한다. 모든 통계적 평가는 적절하게 보정된 시험군 간의 비교뿐 아니라 용량-반응 상관성에 대한 평가를 포함할 수 있다[예: 투여군 대비 동시 부형제대조군 짝 비교(pair-wise comparison)]. 통계분석에는 용량-반응 상관성 평가를 위한 선형 회귀법(linear regression)이나 Williams's test와 짝 비교를 위한 Dunnett's test 등이 포함된다. 통계분석의 적절한 방법을 정할 때 연구자는 데이터 변환이나 비모수 통계분석을

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.

데이터 및 보고

데이터

34. 데이터는 개별 마우스 BrdU 표지 지수 값, BrdU 표지 지수의 그룹 평균, 관련 오차(예: 표준편차(SD), 표준오차(SEM)), 용매/부형제대조군에 대한 각 투여군의 평균 SI를 나타내는 표 형식으로 요약한다.

시험 보고서

35. 시험 보고서에는 다음의 정보를 포함해야 한다.

시험물질

- 공급원, 로트 번호, 사용기한(가능한 경우)
- 시험물질의 안정성(알려진 경우)

단일성분물질

- 물리적 형태, 수용성 및 추가적인 관련 물리화학적 특성
- IUPAC 또는 CAS명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 순도, 적절하고 실질적으로 제공 가능한 불순물의 화학물질 정보 등의 화학물질 식별정보

다성분물질, UVCBs 및 혼합물

- 구성성분의 화학물질 정보, 정량적 비율, 관련 물리화학적 특성 등 가능한 자세히 특성 규명

대조군

- 식별 데이터(예: CAS 번호, 가능한 경우 출처, 순도, 알려진 불순물, 로트 번호)
- 물리적 성질 및 물리화학적 특성(예: 휘발성, 안정성, 용해도)

용매/부형제

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

실험동물

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

시험조건

- ELISA 키트의 공급원, 로트 번호, 제조업체의 품질보증/품질관리 데이터(항체 민감도, 특이도 및 검출 한계)
- 시험물질 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)
- 물질 도포 및 샘플링 일정에 관한 세부사항
- 독성 측정 방법
- 양성 또는 음성 판정기준
- 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, 양성대조군, 부형제대조군, 기준시험물질에 대한 정보 포함)
- 실험실의 동시 또는 과거 양성대조군과 동시 부형제대조군 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 시점 및 예정된 안락사 시 개별 마우스 체중, 각 처리군의 평균과 관련 오차(예: SD, SEM)
- 각 마우스 도포 부위의 피부 자극을 포함한 독성 증상 및 발생 경과
- 각 처리군의 개별 마우스 BrdU 표지 지수 및 SI 값의 표
- 각 처리군 마우스의 BrdU 표지 지수 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
- 통계분석(적절한 경우)

결과 토의

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

참고문헌

- (1) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10- 7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:
[<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]
- (2) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf]
- (3) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.
- (4) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (6) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at:
[<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

- (7) 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.
- (8) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (9) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C
- (10) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Animals* 2002;36:243- 270
- (11) Van Loo PLP, Kruitwagenb CLJJ, Koolhaasc JM, Van de Weerdd HA, Van Zutphena LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 2002;76(1):65-81
- (12) Wübel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. *Trends in Neuroscience*. 2001;24:207-211
- (13) Wübel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs. Published January 2007. <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichmentandsystematicrandomization.pdf>. Accessed April 06, 2018
- (14) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangenberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Laboratory Animals*. 2013;47:2-11.
- (15) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. <https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf>, Published 2008. Accessed 9 April 2018.
- (16) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*. 2010;7:825-826

- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at:
[<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:
[<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (24) 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.
- (25) 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.

- (26) 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.
- (27) 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.
- (28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (30) 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.html].
- (31) 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>]
- (32) 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.
- (33) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ.l Health*, 53, 563-79.

- (34) 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.
- (35) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.

OECD/OCDE

442B

Adopted:
25 June 2018
Corrected: 25 June 2024

*OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS*Local lymph node assay: BRDU-ELISA or –FCM

GENERAL INTRODUCTION

1. A skin sensitiser refers to a substance that will lead to an allergic response following repeated skin contact as defined by the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) (1).
2. There is general agreement regarding the key biological events underlying skin sensitisation. The current knowledge of the chemical and biological mechanisms associated with skin sensitisation has been summarised in the form of an Adverse Outcome Pathway (AOP) (2), starting with the molecular initiating event through intermediate events to the adverse effect, namely allergic contact dermatitis. This AOP focuses on chemicals that react with thiol (i.e. cysteine) and primary amines (i.e. lysine) such as organic chemicals. In this instance, the molecular initiating event (i.e. the first key event) is the covalent binding of electrophilic substances to nucleophilic centres in skin proteins. The first key event can be addressed using the in chemico Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) TG 442C (3). The second key event in this AOP takes place in the keratinocytes and includes inflammatory responses as well as changes in gene expression associated with specific cell signalling pathways such as the antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways. This key event can be addressed using the in vitro ARE-Nrf2 Luciferase Test Methods (KeratinSens™ or LuSens) TG 442D (4). The third key event is the activation of dendritic cells (DC), typically assessed by expression of specific cell surface markers, chemokines and cytokines, and can be addressed using either the in vitro Human Cell Line Activation Test (h-CLAT), the in vitro U937 Cell Line Activation Test (U-SENS™) or the Interleukin-9 Reporter Gene assay (IL-8 Luc assay) as described in TG 442E (5). The fourth key event is T-cell proliferation, which is indirectly assessed in the in vivo murine Local Lymph Node Assays (LLNA) (6).
3. The first Test Guideline (TG) for the determination of skin sensitisation in the mouse, the Local Lymph Node Assay (LLNA; TG 429) was adopted in 2002, and has since then been revised (7). The details of the validation of the LLNA and a review of the associated work have been published (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). In the LLNA, radioisotopic thymidine or iodine is used to measure lymphocyte proliferation and therefore the assay has limited use in regions where the acquisition, use, or disposal of radioactivity is problematic.
4. This Test Guideline describes two non-radioactive modifications to the LLNA test method, which utilise non-radiolabelled 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS] No 59-14-3) in an ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay] - or FCM [Flow Cytometry Method]-based test system to measure lymphocyte proliferation:

The Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA (Appendix I), and

The Local Lymph Node Assay: BrdU-FCM (Appendix II).
5. Similar to the LLNA, the LLNA: BrdU-ELISA and the LLNA: BrdU-FCM study the induction phase of skin sensitisation and provide quantitative data suitable for dose-response assessment. Furthermore, an ability to detect skin sensitisers without the necessity for using a radiolabel for DNA eliminates the potential for occupational exposure to radioactivity and waste disposal issues. This in turn may allow for the increased use of mice to detect

OECD/OCDE

442B

skin sensitisers, which could further reduce the use of guinea pigs to test for skin sensitisation potential (i.e. TG 406) (17).

6. This Test Guideline is designed for assessing skin sensitisation potential of chemicals in animals. TG 406 utilises guinea pig tests, notably the guinea pig maximisation test and the Buehler test (17). The LLNA (TG 429) (7) and the non-radioactive modifications, LLNA: BrdU-ELISA and FCM (TG 442 B) and LLNA: DA (TG 442 A) (18), all provide an advantage over the guinea pig tests in TG 406 (17) in terms of reduction and refinement of animal use.

Literature

- 1) UN, 2017. Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) Seventh revised edition. United Nations, New York. Available at: https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html
- 2) OECD (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Available at: [ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1](https://www.oecd.org/ENV/JM/MONO(2012)10/PART1)
- 3) OECD (2015), In Chemico Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442C, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 4) OECD (2015), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442D, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 5) OECD (2017), In Vitro Skin Sensitisation, Test Guideline No. 442E, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 6) OECD (2010), The Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 429, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 7) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 8) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitizing potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.
- 12) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

OECD/OCDE**442B**

- 13) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.
- 14) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
- 15) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249- 257.
- 16) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 17) OECD (2010). OECD Guidelines for Chemical Testing No. 442A.Skin sensitization: Local Lymph Node assay: DA. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>].
- 18) 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>]

OECD/OCDE

442B

Annex I – 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 (12).

AOP (Adverse Outcome Pathway): sequence of events from the chemical structure of a target chemical or group of similar chemicals through the molecular initiating event to an in vivo outcome of interest (2).

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

False negative: A test chemical incorrectly identified as negative or non-active by a test method, when in fact it is positive or active (12). The false negative rate is one indicator of the test method performance.

False positive: A test chemical incorrectly identified as positive or active by a test, when in fact it is negative or non-active (12). The false positive rate is one indicator of the test method performance.

Hazard: Inherent property of an agent or situation having the potential to cause adverse effects when an organism, system or (sub) population is exposed to that agent.

Inter-laboratory reproducibility: A measure of the extent to which different qualified laboratories, using the same protocol and testing the same test chemical, 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 (12).

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 (12).

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more substances in which they do not react.

Mono-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which one main constituent is present to at least 80% (w/w).

Multi-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which more than one main constituent is present in a concentration $\geq 10\%$ (w/w) and $< 80\%$ (w/w). A multi-constituent substance is the result of a manufacturing process. The difference between mixture and multi-constituent substance is that a mixture is obtained by blending of two or more substances without chemical reaction. A multi-constituent substance is the result of a chemical reaction.

OECD/OCDE

442B

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

Performance standards: Standards, based on a validated test method, that provide a basis for evaluating the comparability of a proposed test method that is mechanistically and functionally 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 comparable 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 (12).

Proficiency chemicals (substances): A subset of the Reference Chemicals included in the Performance Standards that can be used by laboratories to demonstrate technical competence with a standardised test method. Selection criteria for these substances typically include that they represent the range of responses, are commercially available, and have high quality reference data available.

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 (substances): A set of chemicals to be used to demonstrate the ability of a new test method to meet the acceptability criteria demonstrated by the validated reference test method(s). 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.

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 (12).

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 and intra-laboratory repeatability (12).

Reproducibility: The agreement among results obtained from testing the same substance using the same test protocol (see reliability) (12).

Receiver operating Characteristic (ROC) analysis: An analysis to set an optimal cut-off value for the prediction model. The prediction models using cut-off values allow test chemical to be categorized as positive or negative. Any variation of the cut-off value will result in changes of the sensitivity and specificity, in opposite directions. ROC analysis is commonly used to obtain optimal cutoff values for diagnostic tests.

Sensitivity: The proportion of all positive / active chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (12).

OECD/OCDE

442B

Skin sensitisation: 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 sensitisation.

Specificity: The proportion of all negative / inactive chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (12).

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

Substance: Chemical elements and their compounds in the natural state or obtained by any production process, including any additive necessary to preserve the stability of the product and any impurities deriving from the process used, but excluding any solvent which may be separated without affecting the stability of the substance or changing its composition (1).

Test chemical: The term "test chemical" is used to refer to what is being tested. It is not related to the applicability of the test methods to the testing of mono-constituent substances, multi-constituent substances and/or mixtures.

UVCB: substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials.

Appendix I: In Vivo Skin Sensitisation: The Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

1. The LLNA: BrdU-ELISA has been validated and reviewed, and recommended by an international independent scientific peer review panel as considered useful for identifying skin sensitising and non-sensitising test chemicals, with certain limitations (1) (2) (3).
2. The LLNA: BrdU-ELISA is a modified non-radioactive LLNA method for identifying potential skin sensitising test chemicals, with specific limitations. This does not necessarily imply that in all instances the LLNA: BrdU-ELISA should be used in place of the radioactive LLNA (TG 429) or guinea pig tests (i.e. TG 406) (4), when the use of an in vivo method is deemed necessary, 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 (1) (2). The testing laboratory should consider all available information on the test chemical prior to conducting the study. Such information will include the identity and chemical structure of the test chemical; its physicochemical properties; the results of any other in vitro or in vivo toxicity tests on the test chemical; and toxicological data on structurally related test chemicals. This information should be considered in order to determine whether the LLNA: BrdU-ELISA is appropriate for the test chemical (given the incompatibility of limited types of test chemicals with the LLNA: BrdU-ELISA [see paragraph 3]) and to aid in dose selection.
3. The LLNA: BrdU-ELISA is an in vivo method and, as a consequence, will not eliminate the use of animals in the assessment of allergic contact sensitising activity. Therefore, consideration should be given to the applicability domain of suitable in vitro, in chemico and in silico methods and consequently, the possibility of using these approaches rather than testing on animals. Like other LLNA test methods, the LLNA: BrdU-ELISA has, however, the potential to reduce the animal use for this purpose when compared to the guinea pig tests (TG 406) (4). Moreover, the LLNA: BrdU-ELISA offers a substantial refinement of the way in which animals are used for allergic contact sensitisation testing, since unlike TG 406, the LLNA: BrdU-ELISA does not require that challenge-induced dermal hypersensitivity reactions be elicited. Furthermore, the LLNA: BrdU-ELISA does not require the use of an adjuvant, as is the case for the guinea pig maximisation test (4). Thus, the LLNA: BrdU-ELISA reduces animal distress. Despite the advantages of the LLNA: BrdU-ELISA over TG 406 (4), there are certain limitations applicable to the LLNA test, that may necessitate the use of TG 406 (e.g. the testing of certain metals, false positive findings with certain skin irritants [such as some surfactant-type substances] (5) (6), solubility of the test chemicals [such as rarely soluble or non-soluble substances]). In addition, test chemical classes or substances containing functional groups shown to act as potential confounders (e.g. fatty acid glutamate, oleic acid, oleic acid ester, fatty alcohol 1, fatty alcohol 2, polyaminofunctional siloxane (7)) may necessitate the use of guinea pig tests (i.e. TG 406 (4)). Other limitations that have been identified for the LLNA (6) have also been recommended to apply to the LLNA: BrdU-ELISA (1). Other than such identified limitations, the LLNA: BrdU-ELISA should be applicable for testing any test chemicals unless there are properties associated with these substances that may interfere with the accuracy of the LLNA: BrdU-ELISA. In addition, consideration should be given to the possibility of borderline positive results when Stimulation Index (SI) values between 1.6 and 1.9 are obtained (see paragraphs 31-32) in the LLNA: BrdU-ELISA. This is based on the validation database of 43 substances using an SI ≥ 1.6 (see paragraph 6) for which the LLNA: BrdU-ELISA correctly identified all 32 LLNA sensitisers, but incorrectly identified two of 11 LLNA non-sensitisers with SI values between 1.6 and 1.9 (i.e. borderline positive) (1). However, as the same dataset was used for setting the SI-values and

OECD/OCDE

442B

calculating the predictive properties of the test, the stated results may be an over-estimation of the real predictive properties.

4. When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are meaningful scientifically.
5. Definitions are provided in the Annex 1 of the General Introduction.

PRINCIPLE OF THE TEST

6. The basic principle underlying the LLNA: BrdU-ELISA is that sensitisers induce proliferation of lymphocytes in the lymph nodes draining the site of test chemical 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 sensitisation. Proliferation is measured by comparing the mean proliferation in each test group to the mean proliferation in the vehicle treated control group (VC). The ratio of the mean proliferation in each treated group to that in the concurrent VC group, termed the SI, is determined, and should be ≥ 1.6 before further evaluation of the test chemical as a potential skin sensitiser is warranted. The methods described here are based on the use of measuring BrdU content to indicate an increased number of proliferating cells in the draining auricular lymph nodes. BrdU is an analogue of thymidine and is similarly incorporated into the DNA of proliferating cells. The incorporation of BrdU is measured by ELISA, which utilises an antibody specific for BrdU that is also labelled with peroxidase. When the substrate is added, the peroxidase reacts with the substrate to produce a coloured product that is quantified at a specific absorbance using a microtiter plate reader.

DESCRIPTION OF THE ASSAY

Selection of animal species

7. The mouse is the species of choice for this test. Validation studies for the LLNA: BrdU-ELISA were conducted exclusively with the CBA/JN strain, which is therefore considered the preferred strain (1) (3). Young adult female mice, which are nulliparous and non-pregnant, are used. At the start of the study, animals should be between 8-12 weeks old, and the weight variation of the animals should be minimal and not exceed 20% of the mean weight. Alternatively, other strains or males may be used when sufficient data are generated to demonstrate that significant strain and/or gender-specific differences in the LLNA: BrdU-ELISA response do not exist.

Housing and feeding conditions

8. Mice should be group-housed (8) on solid-bottomed cages (9) with suitable substrate and nesting material (10) (11) (12) (13), unless adequate scientific rationale for alternative 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, humanely marked to permit individual identification preferably by non-invasive hair clipping (14) (15), 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

OECD/OCDE

442B

all animals are examined to ensure that they have no observable skin lesions. During all examinations, the mice should be handled using non-aversive methods such as cupping or tunnel handling (16).

Preparation of dosing solutions

10. Solid test chemicals should be dissolved or suspended in solvents/vehicles and diluted, if appropriate, prior to application to an ear of the mice. Liquid test chemicals may be applied neat or diluted prior to dosing. Insoluble chemicals, such as those generally seen in medical devices (35), 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 chemicals should be prepared daily unless stability data demonstrate the acceptability of storage.

Reliability check

11. Positive controls (PC) are used to demonstrate appropriate performance of the assay by responding with adequate and reproducible sensitivity to a sensitising test chemical for which the magnitude of the response is well characterised. Inclusion of a concurrent PC is recommended because it demonstrates competency of the laboratory to successfully conduct each assay and allows for an assessment of intra-, and inter-laboratory reproducibility and comparability. Some regulatory authorities also require a PC for each study and therefore users are encouraged to consult the relevant authorities prior to conducting the LLNA: BrdU-ELISA. 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: BrdU-ELISA response at an exposure level expected to give an increase in the $SI \geq 1.6$ over the VC group. The PC dose should be chosen such that it does not cause excessive skin irritation or systemic toxicity and the induction is reproducible but not excessive (e.g. $SI > 14$ would be considered excessive). Preferred PC test chemicals are 25% hexyl cinnamic aldehyde (CAS No 101-86-0) and 25% eugenol (CAS No 97-53-0) in acetone: olive oil (4:1, v/v). There may be circumstances in which, given adequate justification, other PC test chemicals, meeting the above criteria, may be used.

12. While inclusion of a concurrent PC group is recommended, there may be situations in which periodic testing (i.e. at intervals ≤ 6 months) of the PC test chemical may be adequate for laboratories that conduct the LLNA: BrdU-ELISA regularly (i.e. conduct the LLNA: BrdU-ELISA 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: BrdU-ELISA 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: BrdU-ELISA (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 chemical 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

OECD/OCDE

442B

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 (17).

15. Although the PC test chemical 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 (18). If the concurrent PC test chemical is tested in a different vehicle than the test chemical, then a separate VC for the concurrent PC should be included.

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

- structural and functional similarity to the class of the test chemical being tested;
- known physical/chemical characteristics;
- supporting data from the LLNA: BrdU-ELISA;
- 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 chemical, plus a concurrent VC group treated only with the vehicle for the test chemical, and a PC group (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 chemical, 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 the references 2 and 27. Three 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 chemical of interest (and/or structurally related test chemicals) 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 (19) (20). 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 chemical. Recommended vehicles are acetone: olive oil (4:1 v/v), N,N-dimethylformamide, methyl ethyl ketone, propylene glycol, and dimethyl sulphoxide (5) 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 chemical 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.

OECD/OCDE

442B

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 chemical and VC group measurements (see paragraph 33). In addition, evaluating the possibility of reducing the number of mice in the PC group is only feasible when individual animal data are collected (18). Further, some national regulatory authorities require the collection of individual animal data. Regular collection of individual animal data provides an animal welfare advantage by avoiding duplicate testing that would be necessary if the test chemical results originally collected in one manner (e.g. via pooled animal data) were to be considered later by regulatory authorities with other requirements (e.g. individual animal data).

Pre-screen test

21. In the absence of information to determine the highest dose to be tested (see paragraph 18), a pre-screen test should be performed in order to define the appropriate dose level to test in the LLNA: BrdU-ELISA. The purpose of the pre-screen test is to provide guidance for selecting the maximum dose level to use in the main LLNA: BrdU-ELISA 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 a concentration of 100% of the test chemical 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: BrdU-ELISA 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 (20). 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 irritation is indicated by an erythema score ≥ 3 and/or ear thickness of $\geq 25\%$ on any day of measurement (21) (22). The highest dose selected for the main LLNA: BrdU-ELISA study will be the highest dose used in the pre-screen concentration series (see paragraph 18) that did 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 (21) (22), a statistically significant increase in ear thickness in the treated mice compared to solvent/vehicle control mice has also been used to identify irritants in the LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). However, while statistically significant increases

OECD/OCDE

442B

can occur when ear thickness is less than 25%, they have not been associated specifically with excessive irritation (25) (26) (27) (28) (29).

24. The following clinical observations may indicate systemic toxicity (30) when used as part of an integrated assessment and therefore may indicate the maximum dose level to use in the main LLNA: BrdU-ELISA: 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 showing signs of severe pain and distress should be humanely killed (31).

Main study experimental schedule

The experimental schedule of the assays 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 chemical, 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.
- Day 4:
No treatment.
- Day 5:
Inject 0.5 mL (5 mg/mouse) of BrdU (10 mg/mL) solution intra-peritoneally.
- Day 6:
Record the weight of each animal and any clinical observation. Approximately 24 hours (24 h) after BrdU injection, humanely kill the animals. Excise the draining auricular lymph nodes from each mouse ear and process separately in phosphate buffered saline (PBS) for each animal. Details and diagrams of the lymph node identification and dissection can be found in reference (17). 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 into the study protocol.

Preparation of cell suspensions

25. From each mouse, a single-cell suspension of lymph node cells (LNC) excised bilaterally is prepared by gentle mechanical disaggregation through 200 micron-mesh stainless steel gauze or another acceptable technique for generating a single-cell suspension (e.g. use of a disposable plastic pestle to crush the lymph nodes followed by passage through a #70 nylon mesh). The procedure for preparing the LNC suspension is critical in this assay and therefore every operator should establish the skill in advance. Further, the lymph nodes in VC animals are small, so careful operation is important to avoid any artificial

OECD/OCDE**442B**

effects on SI values. In each case, the target volume of the LNC suspension should be adjusted to a determined optimised volume (approximately 15 mL). The optimised volume is based on achieving a mean absorbance of the VC group within 0.1-0.2.

Determination of cellular proliferation (measurement of BrdU content in DNA of lymphocytes)

26. BrdU is measured by ELISA using a commercial kit (e.g. in the validation study the Roche Applied Science, Mannheim, Germany, was used). Other BrdU ELISA kits may be used if they provide consistent results. Briefly, 100 µL of the LNC suspension is added to the wells of a flat-bottom microplate in triplicate. After fixation and denaturation of the LNC, peroxidase-conjugated anti-BrdU antibody is added to each well and allowed to react. Subsequently, the anti-BrdU antibody is removed by washing and the substrate solution is then added and allowed to produce chromogen. Absorbance at 370 nm with a reference wavelength of 492 nm is then measured. In all cases, assay test conditions should be optimised (see paragraph 26).

OBSERVATIONS***Clinical observations***

27. 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 (31).

Body weights

28. 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

29. Results for each treatment group are expressed as the mean SI. The SI is derived by dividing the mean BrdU labelling index/mouse within each test chemical group and the PC group by the mean BrdU labelling index for the solvent/VC group. The average SI for the VCs is then one.

30. The BrdU labelling index is defined as:

$$\text{BrdU labelling index} = (\text{ABSem} - \text{ABS blankem}) - (\text{ABSref} - \text{ABS blankref})$$

Where; em = emission wavelength; and ref = reference wavelength.

31. The decision process regards a result as positive when $SI \geq 1.6$ (1). However, the strength of the dose-response relationship, the statistical significance and the consistency of the solvent/vehicle and PC responses may also be used when determining whether a borderline result (i.e. SI value between 1.6 and 1.9) is declared positive (5) (32) (33).

32. For a borderline positive response between an SI of 1.6 and 1.9, users may want to consider additional information such as dose-response relationship, evidence of systemic toxicity or excessive irritation, and where appropriate, statistical significance together with SI values to confirm that such results are positives (1). Consideration should also be given to various properties of the test chemical, including whether it has a structural relationship to known skin sensitisers, whether it causes excessive

OECD/OCDE

442B

skin irritation in the mouse, and the nature of the dose-response observed. These and other considerations are discussed in detail elsewhere (34).

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

DATA AND REPORTING

Data

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

Test report

35. The test report should contain the following information:

Test chemical

- source, lot number, limit date for use, if available;
- stability of the test chemical, if known;

Mono-constituent substance

- physical appearance, water solubility, and additional relevant physicochemical properties;
- chemical identification, such as IUPAC or CAS name, CAS number, SMILES or InChI code, structural formula, purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc.

Multi-constituent substance, UVBCs and mixtures

- characterised as far as possible by chemical identity (see above), quantitative occurrence and relevant physicochemical properties of the constituents.

Controls

- identification data (e.g. CAS number, if available; source; purity; known impurities; lot number);
- physical nature and physicochemical properties (e.g. volatility, stability, solubility);

OECD/OCDE**442B*****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

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

Reliability check

a summary of results of latest reliability check, including information on test chemical, concentration, PC, VC and benchmark test chemical used, as appropriate;
concurrent and/or historical PC and concurrent VC 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 humane 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 BrdU labelling indices and SI values for each treatment group;
mean and associated error term (e.g. SD, SEM) for BrdU labelling index/mouse for each treatment group and the results of outlier analysis for each treatment group;

OECD/OCDE

442B

calculated SI and an appropriate measure of variability that takes into account the inter-animal variability in both the test chemical and control groups;

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 chemical should be considered a skin sensitizer.

Literature

- (1) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]
- (2) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRpt2009.pdf]
- (3) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraiishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitizing potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (4) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (6) OECD (2010), Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (7) 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.
- (8) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (9) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C

OECD/OCDE

442B

- (10) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Animals* 2002;36:243- 270
- (11) Van Loo PLP, Kruitwagenb CLJJ, Koolhaasc JM, Van de Weerdd HA, Van Zutphen LFM, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 2002;76(1):65-81
- (12) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. *Trends in Neuroscience*. 2001;24:207-211
- (13) Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. NC3Rs. Published January 2007. <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Refinementenvironmentalenrichmentandsystematicrandomization.pdf>. Accessed April 06, 2018
- (14) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verbost P and Spangenberg E. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Laboratory Animals*. 2013;47:2-11.
- (15) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. <https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf>. Published 2008. Accessed 9 April 2018.
- (16) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*. 2010;7:825-826
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at:
[<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (24) 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.

OECD/OCDE

442B

- (25) 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.
- (26) 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.
- (27) 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.
- (28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (30) 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].
- (31) 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>]
- (32) 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.
- (33) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (34) 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.
- (35) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.

**“화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(ELISA법을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-ELISA)
가이드라인(민원인 안내서)”**

발 행 일 2024년 9월
발 행 인 식품의약품안전평가원장
편 집 위 원 장 독성평가연구부장 오재호
편 집 위 원 이종권, 김주환, 강남희, 길가애, 차민희
문 의 처 Tel : 043-719-5502, 5506
주 소 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