



화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 가이드라인

유세포분석을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-FCM

2024. 9.



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원



KoCVAM
Korean Center for the
Validation of Alternative Methods
한국동물대체시험법검증센터

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(유세포분석을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-FCM)
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(유세포분석을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-FCM)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)

※ 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	안내서-0883-01	2018. 8.	화장품 피부감작성 동물대체시험법 가이드라인(민원인 안내서) 제정
2	안내서-0883-02	2024. 9.	화장품 등 피부감작성 동물대체시험법 (유세포분석을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-FCM) 가이드라인(민원인 안내서) 개정 - 본시험 최고 투여용량 변경사항 반영

목 차

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



I. 요약문	1
1. 개요	1
2. 시험원리	1
3. 제한점 및 고려사항	2
4. 시험방법	2
5. 결과판정	7
6. 시험결과 및 보고	8
II. 번역문	10
III. 원문	40

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 유세포분석을 이용한 국소림프절시험법(LLNA: BrdU-FCM²⁾)이다.

본 시험법은 기존 방사성 동위원소를 사용하는 국소림프절시험법(LLNA, TG429)을 대체하기 위한 방법으로, 피부감작성 반응 중 유도기(induction phase)에 나타나는 반응을 측정하는 시험법이다. 시험물질 적용 부위와 가까운 림프절 내에서 림프절 단일세포의 증식수준을 나타내는 티미딘(thymidine) 유사체인 5-Bromo-2-deoxyuridine(BrdU)를 유세포분석기로 측정하여 감작성을 평가하는 것이다.

LLNA: BrdU-FCM은 LLNA와 마찬가지로 기니픽 시험(TG406) 대비 사용되는 동물의 수를 줄일 수 있으며, 면역보조제 사용이 불필요하여 동물의 고통을 줄일 수 있는 장점이 있다.

또한, LLNA(TG492)와 달리 방사성 동위원소를 사용하지 않고 피부감작성을 확인할 수 있기 때문에 작업 시 방사성 노출이나 방사성 폐기물 처리 문제가 없다.

2 ▶ 시험원리

LLNA: BrdU-FCM의 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 플루오레세인 이소티오시안산(fluorescein isothiocyanate, FITC)으로 표지된 BrdU 특이적 항체를 사용하여 유세포분석기를 통해 BrdU 양성세포 수를 정량화한다.

1) UN GHS: United Nations Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals

2) LLNA: BrdU-FCM: Local Lymph Node Assay: Bromodeoxyuridine-Flow Cytometry Method

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-FCM이 해당 시험물질에 적합한지를 결정해야 한다.

특정 금속물질, 일부 계면활성제와 같이 위양성 결과를 나타내는 피부자극제, 불용성시험물질 등의 LLNA 적용은 제한점이 존재하기 때문에 이러한 물질들은 기니픽 시험(TG406)으로 평가해야 한다. 또한 시험물질이 잠재적 교란원인으로서 작용하는 작용기를 포함하는 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)] 기니픽 시험이 필요할 수 있다.

본 시험법의 검증연구에 있어서 LLNA 결과와 비교 시 중감작성(moderate)인 2-메르캅토벤조티아졸(2-mercaptobenzothiazole)과 약감작성(weak)인 메틸메타크릴레이트(methyl methacrylate)는 위음성 결과를 나타내었음을 참고한다.

규제목적으로 혼합물에 대해 평가할 경우, 본 시험법의 적용이 적절한 지를 검토해야 한다.

4 ▶ 시험방법

4.1. 시험 준비 및 투여용액의 준비

실험동물은 임신과 출산 경험이 없는 8~12주령의 건강한 암컷 마우스를 사용한다. 검증연구에 사용된 BALB/c 마우스(Specific pathogen free)가 선호 종으로 여겨지나, CBA/J 종도 사용될 수 있다. 최소 5일 이상 순화시키며, 순화 기간 동안 매일 일반증상을 관찰한다. 마우스 종 선택, 사육조건 등의 상세한 사항은 번역문의 부속서 II 7~8단락을 참조한다.

고체시험물질은 실험동물에 도포하기 전에 적절한 용매/부형제를 선정해야 하며, 액체시험물질은 원물질 혹은 도포 전에 희석하여 처리한다. 의료기기와 같이 불용성 시험물질인 경우 적절한 용매/부형제를 사용하여 추출과정을 거치도록 해야 하며, 시험물질에 대한 안정성 자료가 확보되지 않은 경우 시험 당일에 제조하도록 한다.

4.2. 신뢰성 확인

양성대조군을 사용하여 본 시험에 대한 수행능력을 점검해야 한다. 양성대조군은 부형제대조군에 비해 감작지수(stimulation index, SI)가 2.7 이상 증가할 것으로 기대하는 농도에서 LLNA: BrdU-FCM 양성반응을 야기해야 하며, 과도한 피부자극 또는 전신독성을 나타내지 않고 SI > 27의 과도한 반응을 유발하지 않는 농도를 선택한다.

양성대조물질로는 아세톤:올리브오일(acetone:olive oil, AOO, 4:1, v/v)에 희석한 25 % hexyl cinnamic aldehyde(HCA)와 25 % eugenol을 사용하는 것이 권장되나 상황에 따라 정확한 판정을 위해 다른 양성대조물질을 사용할 수 있다. 매 시험마다 양성대조군을 포함할 것을 권장하나, 최소 한 달에 한 번 이상 유세포분석을 정기적으로 수행하거나, 배경시험자료(historical database)를 통해 양성대조군의 재현성 있는 결과들이 도출되고 있음을 증명할 수 있다면 주기적 시험도 가능하다(번역문의 부속서Ⅱ 12단락 참조).

LLNA: BrdU-FCM 시험방법의 변경(인원, 재료 및 시약, 마우스의 공급처 등)이 있을 경우 반드시 해당 시험에 양성대조군을 포함시켜야 한다.

4.3. 동물 수 및 투여용량 설정

투여용량 군 당 최소 4마리의 마우스를 사용하고, 시험물질의 농도는 최소 3단계이며 동시에 처리된 부형제대조군, 양성대조군을 포함하도록 한다. 시험물질의 농도는 대개 적절한 3개의 연속되는 농도를 선정한다(예: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 % 등). 시험물질과 관련된 모든 독성학적, 구조적, 물리화학적 정보를 고려하여 전신독성이나 과도한 국소 피부 자극을 피할 수 있는 최고 농도를 선택하며, 이와 같은 정보가 없을 경우 예비시험을 수행한다.

4.4. 예비시험(pre-screen test)

예비시험은 전신독성이나 과도한 국소 피부자극을 유발하는 농도에 대한 정보가 없을 때, LLNA: BrdU-FCM 본시험에서 사용할 최대 투여용량을 선택하기 위하여 실시한다. 시험되는 최대 투여용량은 액체 시험물질의 경우 100 % 농도이며, 고체 또는 현탁액(부유액)의 경우는 적용가능한 최대 농도이다. 물질 도포는 시험 1, 2, 3일차에 이루어지며, 양쪽 귀의 뒷면에 골고루 물질을 25 μ l씩 도포하고, 빈 케이지에 두었다가 물질이 모두 흡수되면 깔짚이 있는 케이지로 다시 옮겨준다.

예비시험은 LLNA: BrdU-FCM 본시험과 동일한 조건 하에서 수행되지만, 림프절 증식을 평가하지 않으며 투여용량 군 당 한 마리 혹은 두 마리의 마우스를 사용하도록 권장한다. 전신독성 또는 도포 부위의 국소 자극 등 임상 증상을 매일 관찰하며, 측정일 중 어느 하루라도 흥반 점수 ≥ 3 이거나 귀 두께 $\geq 25\%$ 이면 과도한 국소 자극을 나타내는 것으로 간주한다. LLNA: BrdU-FCM 본시험을 위한 최고 투여용량은 예비시험에서 사용된 농도들 중 전신독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하지 않는 가장 높은 농도를 선택한다.



표 1. 예비시험에 있어서 관찰 및 측정항목

관찰 및 측정항목	측정시기
체중	시험 1일차와 6일차
임상증상	매일
흥반	매일(양쪽 귀)
귀두께 측정	시험 1, 3, 6일차

표 2. 흥반 증상에 따른 부여 점수

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

4.5. 본시험 수행

4.5.1. 동물실험

실험동물은 시험 전 최소 5일 이상 순화 후, 8주령이 되면 아래와 같이 군 분리를 실시하며, 이상 징후가 있는 개체를 제외하고 군 당 4마리 이상을 사용한다.

- BrdU 용액 주사 및 물질 도포를 하지 않은 공시료군: $n = 1$
- 물질 도포 없이 BrdU 용액만을 주사하는 무처리군: $n = 1$
- 부형제를 도포하고 BrdU 용액을 주사하는 부형제대조군: $n \geq 4$
- 양성대조물질을 도포하고 BrdU 용액을 주사하는 양성대조군: $n \geq 4$
- 시험물질을 도포하고 BrdU 용액을 주사하는 시험군: 시험물질 농도별 $n \geq 4$

음성대조군은 부형제대조군으로 하고, 양성대조군은 AOO에 용해시킨 25 % HCA를 사용한다. 시험군은 예비시험을 통해 결정된 3단계 농도로 구성하고, 각 농도별 4마리 이상의 동물을 사용한다. 일정별 시험 수행내용은 아래에서 설명하는 바와 같다. 각 개체별로 도포부위에서의 국소자극, 전신독성 등 모든 일반증상을 매일 관찰한다.

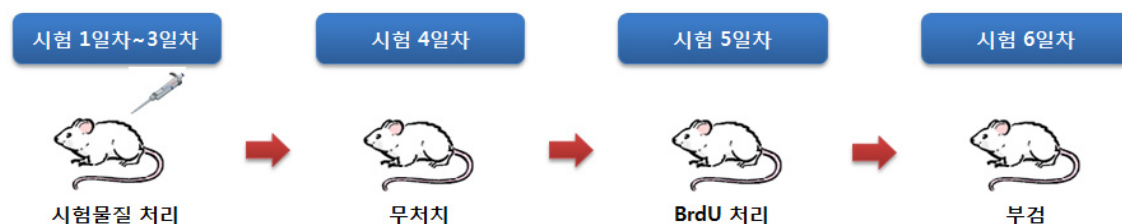


표 3. 본시험에서의 일정별 처리 내용

수행 일자	수행내용
1	<ul style="list-style-type: none"> - 개별 마우스에 표식 - 시험물질, 용매/부형제, 양성대조물질을 양쪽 귀의 뒷면에 25 μL 씩 도포
2~3	- 시험 첫째 날과 같이 시험물질 도포
4	- 시험물질을 도포하지 않음
5	- BrdU 용액(20 mg/mL)을 마우스 당 0.1 mL 씩 복강투여
6	<ul style="list-style-type: none"> - 마우스 안락사 - 림프절 적출

표 4. 본시험에 있어서 관찰 및 측정항목

관찰 및 측정항목	측정시기
체중	시험 1일차와 6일차
일반증상	매일
홍반	매일(양쪽 귀)
귀두께 측정	시험 1, 3, 6일차

4.5.2. 림프절 적출 및 림프절 단일세포 현탁액 준비

유세포분석기를 이용하여 BrdU 양성 림프절 단일세포 비율(%)을 결정하기 위해서는 위에서 설명한 4가지 마우스군으로부터 림프절 적출을 수행한다. 6-well 플레이트에 단일세포 분리 망(cell strainer)을 넣고, 냉장상태로 보존된 PBS 1 mL를 분주하여 적출한 양쪽 이개림프절을 넣고, 시약스폰으로 밀면서 으깨어 하얀 이개림프절 막만 남을 때까지 세포를 분리한다. Well과 단일세포 분리 망에 냉장상태로 보존된 PBS 1 mL를 추가하여 남아있는 세포를 모아 5 mL 튜브에 옮겨 총 2 mL의 단일세포 현탁액을 만든다. 현탁액의 세포수를 측정하여 유세포분석을 위한 최적의 조건인 1.5×10^6 개의 세포를 준비한다. 단일세포 현탁액(1.5×10^6)은 시중에 판매하고 일관성 있는 결과를 생산하는 항(anti)-BrdU 항체 키트(FITC BrdU Flow Kit)를 사용하여 준비하며, 이 키트에서 제공하는 완충액을 첨가하고 DNase를 처리하여 세척한 다음, FITC-결합 항-BrdU 항체를 첨가한 후, 한 번 더 세척한 다음 7-aminoactinomycin(7-AAD) 용액을 첨가한다.

4.5.3. BrdU 양성 림프절 단일세포 비율(%) 측정

- 1) 공시료를 이용하여 세포가 존재하지 않는 Q2 구역(오른쪽 위)을 설정(그림 1A).
- 2) 무처리 시료를 이용하여 BrdU 양성세포(%)가 전체 세포의 약 1 %가 되는 Q2 구역 설정(그림 1B).
- 3) Q2 구역의 백분율은 10,000개의 림프절 단일세포에서 FITC 표지된 항 BrdU-항체 양성 림프절 단일세포의 비율을 나타낸다.

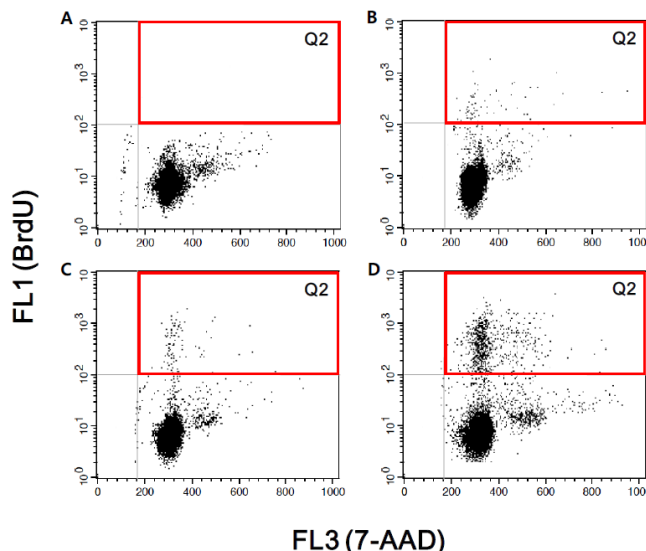


그림 1. BrdU 양성 세포(Q2)의 백분율을 산출하기 위한 유세포분석기의 설정

A: 공시료, B: 무처리군 시료, C: 부형제대조군 시료, D: 시험물질 또는 양성대조군 시료

4.5.4. BrdU 양성 세포(%)의 계수

부형제대조군 처리군(그림 1C), 시험물질 처리군 및 양성대조군 처리군(그림 1D)에 대한 유세포분석을 수행한다. '4분위(Quadrant) 분석 및 통계 결과'를 통해 각 처리군에 대한 Q2 구역 백분율을 구한다.

4.5.5. 감작지수(Stimulation Index) 및 EC2.7(Estimated Concentration) 산출

부형제대조군의 BrdU 양성 림프절 단일세포의 수는 채취한 마우스 림프절 단일세포의 수와 10,000개의 림프절 단일세포(유세포분석기를 이용하여 산출)의 BrdU 양성값의 비율을 곱하여 산출한다. 시험물질 처리군의 BrdU 양성인 림프절 단일세포의 수는 앞서 설명된 방법과 동일하게 산출한다. 각각의 SI 값은 시험물질 처리군 내 개체 당 BrdU 양성의 림프절 단일세포의 수를 부형제대조군 처리군 내 BrdU 양성의 림프절 단일세포의 평균으로 나눈 값이다. 각 시험물질군의 평균 SI는 개별 SI를 바탕으로 산출한다.

$$\text{감작지수(SI)} = \frac{\text{시험물질군의 노출된 마우스 당 BrdU 양성 단일 림프절 세포 수}}{\text{부형제대조군의 BrdU 양성 평균 림프절 세포 수}}$$

EC2.7는 감작지수(SI)가 2.7을 나타내는 시험물질의 농도(%)이며, 그 값을 구하는 공식은 번역문의 부속서 II-부록(Annex) 1~5단락을 참조한다.

5 ▶ 결과판정

유세포분석을 이용한 피부감작시험법의 판정기준은 아래와 같다.

감작지수(SI)	판정
≥ 2.7	피부감작성
< 2.7	비감작성

6 ▶ 시험결과 및 보고

데이터는 표 형식으로 요약하여 나타내며, 각 마우스에 대한 BrdU-양성 림프절 단일세포의 수, 마우스 당 BrdU-양성 림프절 단일세포의 그룹 평균수나 이와 연계된 오차들(예: SD, SEM), 동시 용매/부형제 대조군 대비 각 투여군에 대한 평균 감작지수(SI)를 제시하도록 한다. 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

- FCM 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, 생체외(*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 생체외 인체 세포주 활성화 시험법(Human Cell Line Activation Test, h-CLAT), 생체외 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.
- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • 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: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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 시험결과와 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 II)

생체내(*in vivo*) 피부감작성: 유세포분석을 이용한 국소림프절시험법***In Vivo* Skin Sensitisation: The Local Lymph Node Assay:****BrdU-FCM****초기 고려사항 및 제한점**

1. LLNA: BrdU-FCM은 검증되었고, 국제적으로 전문평가를 받은 이후, 피부감작성 및 비감작성 시험물질을 판별하는 유용한 시험법으로 권고되고 있으나 일부 제한점이 존재한다(1)(2)(3)(4). LLNA: BrdU-FCM 검증연구는 유사하거나 변형된 LLNA 피부감작성 시험법을 평가하기 위한 유사시험법평가기준(Performance Standards, PS)에 따라 수행되었다.
2. LLNA: BrdU-FCM은 피부감작성 시험물질을 식별하기 위한 변형된 비방사성 국소림프절시험법이며, 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 이는 생체내 시험법이 필요한 것으로 간주될 때의 모든 경우에 있어 방사성 LLNA(TG429) 혹은 기니픽 시험(TG406)을 LLNA: BrdU-FCM으로 반드시 대체하여 사용해야 한다는 의미는 아니다. 다만, 이 시험법은 동등한 장점을 갖고 있으며 음성 및 양성 결과에 대한 추가적인 확인이 요구되지 않을 때 단독의 대체시험법으로 사용할 수 있다(1)(2)(5). 시험을 수행하고자 하는 실험실은 시험을 시작하기 전에 시험물질에 대하여 모든 정보를 고려해야 한다. 이와 같은 정보에는 시험물질의 물질명 및 화학적 구조, 물리화학적 성질, 시험물질에 대한 모든 생체외 및 생체내 독성시험 결과, 시험물질과 구조적으로 관련된 물질의 독성시험결과 등이 포함된다. 또한 평가하고자 하는 시험물질에 대하여 LLNA: BrdU-FCM이 적절한 방법인지[특정 유형의 시험물질인 경우, LLNA: BrdU-FCM 사용이 부적합할 수도 있음(3단락 참조)]를 고찰해야 하며, 투여용량 설정에 있어서 이러한 정보들을 참고해야 한다.
3. LLNA: BrdU-FCM은 생체내 방법이므로, 알레르기성 접촉 감작 활성을 평가하는 데 동물 사용이 배제될 수 없다. 따라서 동물을 사용하는 시험법 대신 적절한 *in vitro*, *in chemico*

및 *in silico* 시험법의 적용과 이러한 방법들을 사용한 접근법도 고려해야 한다. LLNA: BrdU-FCM은 다른 LLNA와 마찬가지로, 기니픽 시험(TG406)과 비교 시 사용되는 동물의 수를 줄일 수 있다(5). 또한 LLNA: BrdU-FCM은 TG406과 달리 과도한 피부감작을 유도하지 않기 때문에 알레르기성 접촉 감작성을 평가하기 위해 동물이 사용되지만 실제로 동물의 고통을 경감할 수 있는 시험법이다. 또한 기니픽 극대화 시험에서는 면역보조제를 사용해야 하지만, LLNA: BrdU-FCM에서는 이러한 면역보조제가 필요하지 않다(5). 따라서 LLNA: BrdU-FCM의 경우 동물의 고통을 줄일 수 있다.

이처럼 TG406과 비교 시 LLNA: BrdU-FCM은 장점을 지니고 있지만, 시험법 사용에 있어서 제한점이 존재하여 TG406의 사용이 불가피할 수 있다(예: 특정 금속 물질, 일부 계면활성제와 같이 위양성결과를 나타내는 특정 피부자극제, 불용성 시험물질)(5)(6)(7). 또한 잠재적 교란원인물질로서 작용한다고 판단되는 작용기를 포함하는 물질이나 물질 그룹인 경우(예: fatty acid glutamate, oleic acid, oleic acid ester, fatty alcohol 1, fatty alcohol 2, polyaminofunctional siloxane) 기니픽 시험(TG406)이 필요할 수 있다(5)(8). 기존 LLNA 시험법이 가지고 있는 제한점은 LLNA: BrdU-FCM도 가지고 있는 것으로 여겨진다(1)(7). 이러한 제한점 이외에 LLNA: BrdU-FCM의 정확도에 영향을 줄 수 있는 특성을 포함하지 않는 시험물질인 경우, LLNA: BrdU-FCM을 적용할 수 있다. 검증연구에 따르면 LLNA: BrdU-FCM은 LLNA 결과와 비교 시 TG429 유사시험법평가기준의 22개 참고물질 중 20개를 정확하게 식별하였다(1). LLNA 변형 시험법들에서 예측하는 데 한계를 나타내는 1개의 중감작성 물질 2-메르캅토벤조티아졸(2-mercaptobenzothiazole)와 1개의 약감작성 물질 메틸 메타크릴레이트(methyl methacrylate)의 경우, LLNA: BrdU-FCM에서도 위음성의 예측 결과를 나타냈다(1)(2)(9). 그러나 감작지수(Stimulation Index, SI) 값을 설정하고 시험법의 예측력을 계산하는 데 동일한 데이터 세트가 사용되었기 때문에 해당 결과는 실제 예측력보다 과대 예측되었을 수도 있다.

4. 규제 목적으로 혼합물에 대한 시험자료를 도출하기 위해 본 시험법을 사용하는 경우, 시험을 수행하기 전에 본 시험법이 그러한 혼합물의 평가에 적절한 결과를 생산할 수 있을 지와 만일 그렇다면 그 이유가 무엇인지를 고려해야 한다. 그러나 이 같은 고려사항은 혼합물의 시험에 대한 규제적 요건이 이미 존재하는 경우에는 필요하지 않다.

5. 용어정의는 부록 1에 수록되어 있다.

시험원리

6. LLNA: BrdU-FCM의 기본 원리는 감작성 시험물질이 도포 부위의 림프절 내 림프구의 증식을 유도한다는 것이다. 림프구 증식은 투여용량 및 도포된 알레르기 유발 항원의 감작능에 비례하여 나타나며, 감작성의 정량적 측정값을 구하는 데 있어 간단한 방법이 될 수 있다. 림프구의 증식은 각 시험군에서의 평균 림프구 증식을 부형제 처리 대조군(vehicle treated control group, VC)의 평균 림프구 증식과 비교하여 측정한다. 부형제 처리 대조군의 평균 증식에 대한 시험 처리군의 평균 증식의 비율을 감작지수(SI)로 정의하며, 잠재적 피부감작성 물질로 판정이 되어 시험물질에 대한 추가적인 시험을 이용하여 평가하기 전 SI 지수가 ≥ 2.7 이 되어야 한다.

본 시험법은 이개림프절 내 증식하는 세포의 수를 계수하기 위해 BrdU 양을 측정한다. BrdU는 티미딘(thymidine)의 유사체로서, 증식하는 세포의 DNA에 결합한다. BrdU의 결합은 유세포분석을 이용하여 측정할 수 있는데, 이 유세포분석은 플루오레세인 이소티오시안산(fluorescein isothiocyanate, FITC)으로 표지된 BrdU 특이적 항체가 사용된다. 유세포분석은 림프절 단일세포의 수를 분석하는데 널리 사용되고 있는 유세포분석기를 사용하여 살아있는 BrdU 양성 세포의 수를 정량화한다.

시험 설명

동물종 선택

7. 실험동물로는 마우스를 사용한다. LLNA: BrdU-FCM에 대한 검증연구는 BALB/c 종에 대해서 광범위하게 수행되었기 때문에 BALB/c가 선호 종으로 여겨진다(1)(2). CBA/J 종 또한 LLNA: BrdU-FCM에 사용될 수 있다. CBA/J 종 반응은 BALB/c 종 반응과 높은 상관성을 나타내며 BALB/c 종의 반응보다 좀 더 민감하다(2)(10)(11)(12). 그러나 각각의 마우스 종에 있어서 ROC(Receiver Operating Characteristic) 분석 후, 민감도를 최대화할 수 있도록 하기 위해 다른 판정기준치(cut-off)를 적용해야 할 수도 있다. 어린 성체의 암컷으로서 임신과 출산 경험이 없는 마우스를 사용한다. 본시험에 사용되는 마우스는 8~12주령이어야 하며, 마우스의 체중 편차는 최소로 하되, 평균 체중의 20 %를 초과해서는 안 된다. 대체적으로 다른 종이나 수컷을 사용할 수 있으나, LLNA: BrdU-FCM 시험법과 종이나 성별에 의한 차이가 없다는 것을 증명할 충분한 데이터가 있어야 한다.

사육 및 사료조건

8. 마우스는 개별사육에 대한 충분한 과학적 근거가 제시되지 않는다면 집을 지을 수 있는 적절한 깔짚이 있는 단단한 케이지(9)에서 그룹사육(8)을 해야 한다(10)(11)(12)(13). 사육실의 온도는 22 ± 3 °C로 유지되어야 한다. 상대습도는 사육실 청소 시를 제외하고 최소한 30 %가 되어야 하고 70 %를 넘지 않아야 하며, 50~60 %의 범위에 있어야 한다. 조명은 12시간 간격으로 낮과 밤을 설정하여 조절한다. 사료는 일반적인 마우스 사료를 사용하며 사료와 물을 자유롭게 공급한다.

실험동물 준비

9. 마우스는 무작위로 선발하고 상처 나지 않게 개체식별[예: 제모(hair clipping)(14)(15)] 한다. 또한 시험물질 처리 전 최소 5일간 순화한다. 시험물질 처리 전 모든 마우스에 대한 피부 병변 유무를 검사한다. 모든 검사 동안 cupping과 tunnel handling과 같은 윤리적인 방법으로 마우스를 다룬다(16).

시험 용액의 조제

10. 고체시험물질은 마우스에 도포하기 전, 적절한 용매/부형제에 용해 또는 현탁시켜야 하며 필요하다면, 마우스 한쪽 귀에 시험물질을 도포하기 전에 그 용액을 희석해야 한다. 액체시험물질은 원물질 또는 도포 전에 희석하여 도포한다. 의료기기에서 일반적으로 알려진 불용성 물질들(35)은 마우스 한쪽 귀에 물질을 도포하기 전에 추출가능한 모든 성분이 추출될 수 있도록 적절한 용매를 사용하여 가혹조건으로 추출하여 해야 한다. 시험물질은 보관이 가능하다는 것을 증명할 만한 안정성 자료가 없다면 시험 당일에 조제해야 한다.

실효성 확인

11. 양성대조군(PC, Positive control)은 반응강도가 잘 알려진 감작성 물질을 이용하여 적절하고 재현성 있는 반응을 보여줌으로써 본 시험이 적절하게 수행되었는지 확인하기 위하여 사용한다. 실험실의 시험수행 능력을 확인하고 실험실 내 및 실험실 간 재현성과 비교가능성을 평가하기 위하여 적절한 양성대조군을 포함하여 실험할 것을 권고한다. 일부 규제당국에서는 각각의 시험마다 양성대조군을 요구할 수 있기 때문에 LLNA: BrdU-FCM을 수행하기 전에 관계당국과 상의할 것을 권장한다.

매 실험마다 양성대조군의 사용을 주기적 양성대조군 사용으로 인해 야기될 수 있는 추가적인 동물실험을 피하기 위해 권장한다. 양성대조군은 음성대조군 대비 자극지수가 2.7을 초과할 것으로 예측되는 노출수준에서 LLNA: BrdU-FCM 양성 반응을 나타내어야 한다. 양성대조군의 용량은 과도한 피부자극 또는 전신독성을 나타내지 않고 유도반응은 재현성 있게 나타나지만 과도한 반응 ($SI > 27$)을 유발하지 않는 농도를 선택해야 한다. 선호되는 양성물질은 아세톤:올리브 오일(acetone:olive oil, AOO, 4:1, v/v)에 희석한 25 % hexylcinnamic aldehyde(HCA, CAS No. 101-86-0)와 25 % eugenol(CAS No. 97-53-0)이지만 상황에 따라 적절한 타당성이 제시되고, 위의 조건에 부합한다면 다른 양성대조물질을 사용할 수 있다.

12. 시험마다 양성대조군을 포함할 것을 권장하지만, LLNA: BrdU-FCM을 정기적으로 수행하고 있고(즉, LLNA: BrdU-FCM을 최소 한 달에 한 번 이상 수행), 양성대조군의 재현성 있고 정확한 결과를 얻기 위해 양성대조군의 데이터베이스를 확립한 실험실이라면 양성대조물질에 대한 주기적 시험(예: 6개월 미만 간격)도 가능하다. 적절한 기간 내(즉, 1년 미만)에 최소 10회의 양성대조군에 대한 독립적인 시험에서 일관되게 양성결과를 생성함으로써 LLNA: BrdU-FCM에 대한 숙련도를 증명할 수 있다.
13. LLNA: BrdU-FCM에 대한 시험 방법적 변경(예: 훈련받은 인원, 시험에 사용하는 재료 및 시약, 장비, 마우스의 공급처 등의 변경)이 있을 경우 반드시 해당시험에 양성대조군을 포함시켜야 한다. 그리고 이 같은 변경은 항상 시험보고서에 기록을 남겨야 한다. 양성대조군 결과의 일관성 있는 기록을 위해 신규 배경시험자료 확립의 필요성을 결정함에 있어서 이러한 변경이 이전에 확립된 배경시험자료의 적절성에 어떠한 영향을 미치는 지를 고려해야 한다.
14. 시험자는 양성대조군에 대한 주기적인 시험을 결정할 때, 매 시험마다 양성대조군을 사용하지 않고 수행된 시험에서 도출된 음성 시험결과에 대한 적절성과 수용가능성에 대한 영향들을 고려해야 한다. 예를 들어, 주기적인 양성대조군의 시험을 할 때 위음성 결과가 나왔다면, 양성결과가 나온 마지막 양성대조군 시험과 위음성 결과가 나온 양성대조군 시험 사이에 수행된 음성 판정 시험물질의 결과에 대해서는 신뢰할 수 없다. 매 실험마다 양성대조군을 포함할 것인가 양성대조군에 대한 주기적인 시험을 수행할 것인가를 결정할 때에는 이러한 시험결과들을 주의 깊게 고려해야 한다. 배경시험자료를 통해 양성대조군에 사용되는 마우스의 수를 줄일 수 있는 점이 과학적으로 입증되었을 때, 매번 사용되는 양성대조군의 마우스 수를 줄일 수 있다.

15. 양성대조물질은 일관된 반응을 유발한다고 알려진 부형제(예: 아세톤:올리브오일, 4:1, v/v)를 사용하여 시험을 수행해야 하지만, 규제상황에 따라 비표준 부형제(임상적/화학적으로 관련 있는 제형)를 이용한 실험이 요구될 수 있다. 만약 양성대조물질을 시험물질과 다른 부형제에 녹여 시험을 수행하였다면 양성대조군에 대한 부형제대조군을 별도로 시험에 포함시켜야 한다.
16. 특정한 화학물질 그룹이나 반응 범위를 갖는 시험물질을 평가할 경우, 기준물질(benchmark chemical)은 본 시험법이 이런 종류의 시험물질의 피부감작능을 평가하는데 적절하다는 것을 증명하기 위해 필요할 수도 있다. 적절한 기준물질은 다음과 같은 특성을 가져야 한다:
 - 시험물질의 그룹과 구조적 기능적으로 유사성을 지닐 것
 - 물리적/화학적 특성이 알려져 있을 것
 - LLNA: BrdU-FCM에 대한 시험자료가 있을 것
 - 다른 동물 종이나 인체 시험자료가 있을 것

시험방법

동물 수 및 투여용량

17. 투여용량 군 당 최소 4마리의 마우스를 사용하며, 최소 3개의 농도로 설정된 시험물질, 부형제로 이루어진 부형제대조군, 양성대조군(실험실 규정을 근거로 하여 11~15단락에서 언급된 것을 고려하여 동시 도포 또는 최근 시험결과값 사용)을 준비한다. 특히 간헐적으로 양성대조군을 시험한 경우, 양성대조군의 복수의 투여용량을 고려하도록 한다. 시험물질로 처리를 하지 않은 경우를 제외하고, 대조군 마우스는 처리군 마우스와 동일한 방식으로 취급 및 처리해야 한다.
18. 투여용량 및 부형제 선택은 참고문헌 2번과 19번에 제시된 권고사항을 기반으로 한다. 3개의 투여용량의 경우, 대개 적절하게 연속되는 농도에서 선정한다(예: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 % 등). 시험에 사용될 연속 농도를 선정하는 데 충분한 과학적 근거가 뒷받침되어야 한다. 3개의 연속적인 농도를 선정함에 있어서, 가능하다면 시험 물질과 관련된 기존의 모든 독성학적 정보(예: 급성 독성 및 피부 자극), 구조적, 물리화학적 정보(또는 구조적으로 관련된 시험물질)들을 고려해야 한다. 이는 전신독성 또는 과도한 국소 피부 자극을 피하면서도 최고 농도로 노출을 최대화하기 위함이다(16)(17). 이와 같은 정보가 없을 경우에는 예비시험(pre-screen test)이 요구된다(21~24단락 참조).

19. 시험물질을 도포하는데 적절한 용액/현탁액을 조제해야 하며, 용해도를 최대화하는 것에 중점을 두어 가장 높은 농도를 얻을 수 있는 부형제를 선정해야 한다. 본 시험법의 부형제로 권장하는 것은 아세톤:올리브 오일(AOO, 4:1 v/v), N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide), 메틸에틸케톤(methyl ethylketone), 프로필렌글리콜(propylene glycol), 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide)(6)이지만, 충분한 과학적 근거가 뒷받침된다면 다른 부형제들도 사용할 수 있다. 어떤 경우 추가대조군으로서 시험물질이 시판되는 형태와 같은 제제 또는 임상적으로 적합한 용매를 사용해야 할 경우도 있다. 친수성물질인 경우, 적절한 용해제(예: 1 % Pluronic® L92)를 사용하여 시험물질 용액이 피부를 젖게 하고, 도포하는 즉시 용액이 흘러넘치지 않도록 특별한 주의를 기울여야 한다. 전체가 수용성인 부형제는 피해야 한다.
20. 개별 마우스의 림프절 채취를 통해 마우스 간의 변동성 평가와 시험군과 부형제대조군 간의 차이에 대한 통계적 비교가 가능하다(33단락). 또한, 개별 마우스에 대한 데이터가 수집될 때 양성대조군에 사용되는 마우스 수를 줄일 수 있는지에 대한 가능성을 평가할 수 있다(14). 이와 더불어, 일부 국가의 규제 당국에서는 각각의 마우스 데이터를 수집하도록 요구하고 있다. 마우스 데이터를 합하는 방식으로 수집하여 시험물질 결과들을 도출하는 경우, 향후에 또다른 규제당국이 요구에 따라 개별 마우스 데이터를 생산해야할 수도 있기 때문에 이러한 중복시험을 피하기 위해 개별 마우스 데이터를 정기적으로 수집하는 일이 동물복지 차원에서 필요하다.

예비시험

21. 시험 시 최고 농도를 결정하기 위한 정보가 없다면(18단락 참조), 예비시험을 수행하여 LLNA: BrdU-FCM에서 시험할 적정 투여용량을 정해야 한다. 예비시험은 전신독성(24단락 참조)이나 과도한 국소 피부자극(23단락 참조)을 유발하는 농도에 대한 정보가 없을 때, LLNA: BrdU-FCM 본시험에서 사용할 최대 투여용량을 선택하기 위하여 실시한다. 액체 시험물질의 경우, 시험되는 최대 투여용량은 100 % 농도이며, 고체 또는 현탁액의 경우는 가능한 최대 농도이다.
22. 예비시험은 LLNA: BrdU-FCM 본시험과 동일한 조건 하에서 수행되지만, 림프절 증식을 평가하지 않으며 투여용량 군 당 적은 수의 마우스를 사용한다. 투여용량 군 당 한 마리 혹은 두 마리의 마우스를 사용하도록 권장한다. 모든 마우스는 전신독성 또는 도포 부위의 국소 자극 등 모든 일반증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전과 종료 전(6일차)에 측정한다.

각 마우스의 양쪽 귀의 홍반을 관찰하고, 표1에 따라 점수화한다(17). 귀 두께는 두께측정기(예: 디지털 마이크로미터 혹은 피콕 다이얼 두께측정기)를 사용하여 1일차(도포 전), 3일차(첫 번째 도포 약 48시간 후) 및 6일차에 측정한다. 또한 6일차에는 마우스를 인도적으로 희생시킨 후 귀 부위를 적출하여 무게를 측정한다. 측정일 중 어느 하루라도 홍반 점수 ≥ 3 이거나 귀 두께 $\geq 25\%$ 이면 과도한 국소 자극을 나타내는 것으로 간주한다(18)(19). LLNA: BrdU-FCM 본시험을 위한 최고 투여용량은 예비시험에서 사용된 농도들(18단락 참조) 중 전신독성이나 과도한 국소 피부 자극을 유발하지 않는 가장 높은 농도를 선택한다.

표 1. 홍반 증상에 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. LLNA에서는 자극을 판정하기 위해 귀 두께(18)(19)가 25 % 증가와 함께 용매/부형제 대조군과 비교 시 시험물질 처리군의 귀 두께가 통계적으로 유의한 증가를 나타내는지의 여부를 확인해야 한다(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25). 그러나 귀 두께가 25 % 보다 적을 때에는 통계적으로 유의한 증가가 나타날 수 있더라도, 특별하게 과도한 자극과 관련되지는 않는다(22)(23)(24)(25)(26).
24. 통합 평가의 일환으로 사용할 경우 다음의 임상 결과는 전신독성(27)을 나타낼 수 있으며, 본 LLNA: BrdU-FCM 에 사용할 최대 투여용량을 나타낼 수 있다: 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, 혈떡임, 수포음과 같이 호흡의 빈도 및 강도의 변화), 음수 섭취량 변화. 또한 무기력 또는 무반응 증상, 경미한 또는 일시적인 통증과 괴로움 이상의 모든 임상 증상, 또는 1일차부터 6일차까지 체중감소가 5 %를 초과하는 것 및 치사율은 평가에 고려되어야 한다. 빈사상태의 마우스 또는 심한 통증과 고통을 보이는 마우스는 안락사시킨다(28).

본시험 일정

시험일정은 다음과 같다.

- 1일 차
각 마우스의 체중 및 모든 임상적 관찰 사항을 개별적으로 확인하고 기록한다. 시험물질의 적정 희석액, 부형제, 또는 양성대조군(11~15단락에서 고려된 사항으로 실험실 규정에 따라 동시 도포 또는 최근 시험결과값 사용)을 각 귓등에 25 μ L씩 도포한다.
- 2일차 및 3일차:
1일차에 수행했던 적용 방법대로 다시 도포한다.
- 4일차:
아무런 처치를 하지 않는다.
- 5일차:
BrdU(20 mg/mL) 용액 0.1 mL(마우스 당 2 mg)을 복강 내에 투여한다.
- 6일차:
각 마우스의 체중과 모든 임상적 관찰 사항을 기록한다. BrdU를 투여하고 약 24시간 후, 마우스를 안락사시킨다. 각 마우스로부터 이개림프절(drainage auricular lymph nodes)을 적출하고, 각 마우스 별로 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)에 처리한다. 림프절의 확인 및 해부에 관한 모식도와 자세한 사항은 참고문헌(14)에서 확인할 수 있다. 본시험에서 국소 피부 반응을 좀 더 관찰하기 위하여 귀 홍반의 점수 또는 귀 두께 측정(두께측정기를 사용하거나 해부 시 귀를 적출하여 무게 측정)과 같은 추가적인 매개변수가 시험 프로토콜에 포함될 수 있다.

세포 현탁액의 준비

25. 각 마우스에서 얻어진 양쪽 림프절을 적출한 후 림프절 단일세포(lymph node cells)의 단일세포 현탁액(부유액)은, 200 μ m-메쉬 스테인리스 스틸 거즈 또는 다른 방법(예: # 70 나일론 메쉬 위에서 일회용 플라스틱 막자를 사용하여 림프절을 분쇄)을 이용하여 준비한다.

본 시험법에서 림프절 단일세포 현탁액을 준비하는 과정은 중요하므로 모든 실험자는 사전에 이러한 기술을 숙지해야 한다. 또한 부형제대조군 마우스의 림프절은 작기 때문에 작업에 신중을 기하여 감작지수 값에 대한 모든 인위적 영향을 피하도록 한다. 림프절 단일세포는 적정 용량(예: 2 mL)의 차가운 PBS를 추가하고, 필요한 경우 림프절 단일세포 현탁액은 희석할 수 있다(예: 1/10로 희석). 림프절 단일세포의 수는 계수해야 하고, 다음 단계에서 1.5×10^6 림프절 단일세포가 필요하다.

세포증식 측정(BrdU-양성 림프구의 측정)

26. 시중에 판매되는 키트(예: 검증연구에서는 BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA) 사용)를 사용한 후, 유세포분석을 통해 BrdU 양성 림프구의 수를 계수한다. 다른 항(anti)-BrdU 항체 키트가 일관성 있는 결과를 나타낸다면 이러한 키트도 사용할 수 있다. 간략히 말해서, 림프절 단일세포 현탁액(1.5×10^6)을 원심분리하여 PBS로 한 번 세척한 후 재현탁한다. 세포는 키트에서 제공하는 완충액을 추가하고 DNase를 처리한다. 세척 후에 FITC-결합 항-BrdU 항체를 추가하고, 한 번 더 세척 후 7-aminoactinomycin D (7-AAD) 용액을 추가한다. 살아있는 7-AAD-발현 세포(10^4 세포) 내 BrdU-양성 세포의 수는 유세포분석기로 측정한다.

관찰

일반증상 관찰

27. 각 마우스별로, 도포 부위의 국소 자극 혹은 전신독성 등 모든 일반증상을 최소 하루에 한 번 주의 깊게 관찰해야 한다. 모든 관찰 사항은 각 마우스별로 체계적으로 기록하도록 한다. 모니터링 계획은 전신독성, 과도한 국소 피부자극 또는 안락사가 필요한 피부 부식 등을 보이는 마우스들을 신속하게 식별할 수 있도록 기준을 포함해야 한다(28).

체중

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

결과의 계산

29. 각 처리군(treatment group)에 대한 결과는 감작지수(SI) 평균으로 나타낸다. LLNA: BrdU-FCM의 감작지수는 시험군이나 양성대조군의 마우스 당 BrdU-양성 림프절 단일세포의 수를 부형제대조군의 마우스 당 BrdU-양성 림프절 단일세포의 평균 수로 나누어 구한다. 부형제대조군에 대한 감작지수의 평균은 “1”이 된다.
30. BrdU-양성 림프절 단일세포의 수는 다음과 같이 정의한다(부록 1~7단락 참조):

$$\text{BrdU-양성 림프절 단일세포의 수} = \text{BrdU-양성 세포의 \%}(Q23)\text{의 \%} \times \text{림프절 단일세포의 수}$$
31. 판정기준은 $SI \geq 2.7$ 의 결과를 양성으로 간주한다(1)(2)(10). 다만, 경계 값(borderline result)이 양성인지의 여부를 결정할 때에는 용량-반응 관계, 통계적 유의성 및 용매/부형제와 양성대조군 반응의 일관성 또한 사용될 수 있다(6)(29)(30).
32. 도출된 결과를 명확히 할 필요가 있을 경우, 알려진 피부감작성 물질과 시험물질이 구조적 연관이 있는지의 여부와 같은 시험물질의 다양한 속성 및 관찰된 용량 반응 관계의 본질을 고려해야 한다. 이 외 기타 고려사항에 대해서는 추후 자세히 논의하도록 한다(31).
33. 각 마우스 처리농도 별 데이터를 수집함으로써, 데이터 내 용량-반응 간 관계가 존재하는지, 존재한다면 그 정도는 어떠한지에 대해 통계적 분석이 가능하다. 모든 통계적 평가에는 용량-반응 관계에 대한 평가는 물론이고, 시험군 간의 적절한 보정비교를 할 수 있다[예: 시험물질의 투여군 대비 용매/부형제 대조군 간의 짝 비교(pair-wise comparison)]. 통계 분석은 선형 회귀나 용량-반응 경향 평가를 위한 William's test, 짝 비교를 위한 Dunett's test 등이 포함될 수 있다. 적절한 통계 분석법을 선택할 때 연구자는 편차의 가능한 불균등 및 데이터 변형이나 비모수 통계 분석이 필요할 수 있는 문제에 대해 인지해야 한다. 모든 경우에, 연구자는 특정 데이터 포인트(“이상치”라고도 함)의 유무에 관계없이, SI 계산 및 통계적 분석을 수행해야 할 수 있다.

3) 유세포분석의 '4분위 통계(Quadrant Statistics)'로부터 수집된 퍼센트 데이터(Q2 지역 %)

데이터 및 보고

데이터

34. 데이터는 표 형식으로 요약하여 나타내며, 각 마우스에 대한 BrdU-양성 림프절 단일세포의 수, 마우스 당 BrdU-양성 림프절 단일세포의 그룹 평균수나 이와 연계된 오차들(예: SD, SEM), 동시 용매/부형제 대조군 대비 각 투여군에 대한 평균 감작지수(SI)를 제시하도록 한다.

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
- IUPAC이나 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 순도, 적절하고 실질적으로 제공 가능한 불순물의 화학물질 정보 등의 화학물질 식별정보

다성분물질, UVCBs 및 혼합물

- 정확한 화학구조와 분자구조를 알 수 없는 물질(UVCB) 및 혼합물
- (위에서 설명된)화학적 식별에 의한 특성, 구성 성분의 비율과 성분의 물리화학적 특성

대조군

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

용매/부형제

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

실험동물

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

시험조건

- FCM 키트의 공급원, 로트 번호, 제조업체의 품질보증/품질관리 데이터(항체 민감도, 특이도 및 검출 한계)
- 시험물질의 준비와 적용에 관한 세부사항
- 투여 용량 선정의 타당성에 대한 근거(수행된 경우, 예비시험에 대한 결과 포함)
- 사용된 부형제와 시험물질 농도, 적용된 시험물질의 총량
- 사료와 음용수 품질에 관한 세부사항(식이 유형/공급원, 음용수원 등)
- 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) OECD (2018), Local Lymph Node Assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method (LLNA: BrdU-FCM) Validation Study Report, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 283, ENV/JM/MONO(2018)43, OECD, Paris.
- (2) OECD (2018), Summary of the Peer Review of the Validation Study for LLNA: BrdU-FCM Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No.284, ENV/JM/MONO(2018)44, OECD, Paris.
- (3) Yang H, Na J, Jang WH, Jung MS, Jeon JY, Heo Y, Yeo KW, Jo JH, Lim KM, Bae SJ. (2015), Appraisal of within- and between-laboratory reproducibility of non-radioisotopic local lymph node assay using flow cytometry, LLNA: BrdU-FCM: Comparison of OECD TG429 performance standard and statistical evaluation. Toxicology Letters 234: 172-179.
- (4) Ahn IY, Kim TS, Jung ES, Yi JS, Jang WH, Jung KM, Park MY, Jung MS, Jeon EY, Yeo KY, Jo JH, Park JE, Kim CY, Park YC, Seong WK, Lee AY, Chun YJ, Jeong TC, Jeung EB, Lim KM, Bae SJ, Sohn SJ, Heo Y. (2016), Performance standards based validation study for Local Lymph Node Assay: 5-Bromo-2-Deoxyuridine-flow cytometry method. Regul. Toxicol. Pharmacol. 80:183-194.
- (5) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

- (7) 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) 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.
- (9) Kolle SN, Basketter DA, Casati S, Stokes WS, Strickland J, Ravenzwaay BV, Vohr HW, Landsiedel R 2013. Performance standards and alternative assays: Practical insights from skin sensitization. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 65: 278-285
- (10) Lee YS, Yi JS, Seo SJ, Kim JH, Jung MS, Seo IK, Ahn IY, Ko KY, Kim TS, Lim KM, Sohn SJ. (2017), Comparison of BALB/c and CBA/J mice for the local lymph node assay using bromodeoxyuridine with flow cytometry (LLNA: BrdU-FCM). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33:13-22.
- (11) Ha SJ, Ahn IY, Kim DE, Lee JK, Sohn SJ, Jung MS, Heo Y, Omori T, Bae SJ, Lim KM. (2017) Evaluation of radioisotopic and non-radioisotopic versions of local lymph node assays for subcategorization of skin sensitizers compliant to UN GHS rev 4. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 85:124-131.
- (12) Maeda, Y., Hirosaki, H., Yakata, N., Takeyoshi, M. (2016), Comparison of outcomes obtained in murine local lymph node assays using CBA/J or CBA/Ca mice. *J. Appl. Toxicol.* 36:1011-4.
- (13) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (14) 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]

- (15) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (16) 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.
- (17) 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>]
- (18) 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.
- (19) 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>].
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) 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.

- (24) 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.
- (25) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (26) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by Pfisteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (27) 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].
- (28) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (29) 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.
- (30) 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.
- (31) 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.

- (32) Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, et al. 2004. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50:274-288.
- (33) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.
- (34) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C
- (35) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Animals* 2002;36:243- 270
- (36) 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
- (37) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. *Trends in Neuroscience*. 2001;24:207-211
- (38) 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
- (39) 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.
- (40) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. <https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf> Published 2008. Accessed April 9, 2018.
- (41) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*. 2010;7:825-826

부속서 II-부록 1. 유세포분석기를 이용한 BrdU 양성의 림프절 단일세포 측정

이 방법은 KoCVAM이 주관한 검증연구에 사용된 LLNA: BrdU-FCM의 프로토콜에 기반을 둔다(1). 실험실에서 LLNA: BrdU-FCM을 수행할 때 이 프로토콜 사용을 권장한다.

측정 전 준비사항

1. 표지된 BrdU를 측정하기 전에 아래의 시료들이 준비되어야 한다.
 - 공시료군(n = 1): BrdU 용액 주사 및 물질 도포를 전혀 하지 않은 마우스의 림프절 단일세포
 - 무처리 시료군(n = 1): 물질 도포 없이 BrdU 용액만을 주사한 마우스의 림프절 단일세포
 - 부형제대조군 처리군(n ≥ 4): 부형제대조군을 도포하고 BrdU 용액을 주사한 마우스의 림프절 단일세포
 - 시험물질 처리군(n ≥ 4, 최소 3개의 농도): 시험물질로 도포하고 BrdU 용액을 주사한 마우스의 림프절 단일세포
 - 양성대조군 처리군(n ≥ 4): 양성대조군을 도포하고 BrdU 용액을 주사한 마우스의 림프절 단일세포

유세포분석기 결과 분석

2. 시험 전 또는 정해진 주기에 따라 적절한 장치(예: FACSCalibur™을 사용할 경우는 'BD FACSComp' 이용 또는 Cytomics FC500을 사용할 경우는 'Beckman coulter FlowCheck' 이용)를 사용하여 유세포분석기를 교정해야 한다.

Forward Scatter-Side Scatter(FSC-SSC) 그래프

- 1) X축(FSC)과 Y축(SSC) 모두 선형적 scale로 있어야 한다.
- 2) FSC-SSC 그래프에서 그 중심에 살아있는 림프절 단일세포들이 모여 있는 구역을 설정한다.
- 3) 적어도 10^4 개의 세포 수를 갖는 구역을 설정한다.

7-AAD-BrdU 그래프

- 1) X축(7-AAD, FL3)은 선형적 scale, Y축(BrdU, FL1)은 로그 scale로 설정한다(그림 1).

* 시험 시작 시점에서 비염색시료, BrdU 단독 염색시료, 7-AAD 단독 염색시료, BrdU-7-AAD 염색시료(Double-staining sample)를 사용하여 보정값을 설정한다. 이때 설정된 보정값은 추후에도 사용할 수 있다.

아래의 단계에 따라 Q2 구역설정 하기

- 1) 공시료를 이용하여 세포가 존재하지 않는 Q2 구역(오른쪽 위)을 설정한다(그림 1A).
- 2) 무처리 시료를 이용하여 BrdU 양성세포 %가 전체 세포의 약 1 %가 되는 Q2 구역을 설정한다(그림 1B).
- 3) Q2 구역의 백분율은 10,000개의 림프절 단일세포에서 FITC 표지된 항 BrdU-항체 양성림프절 단일세포의 비율을 나타낸다.

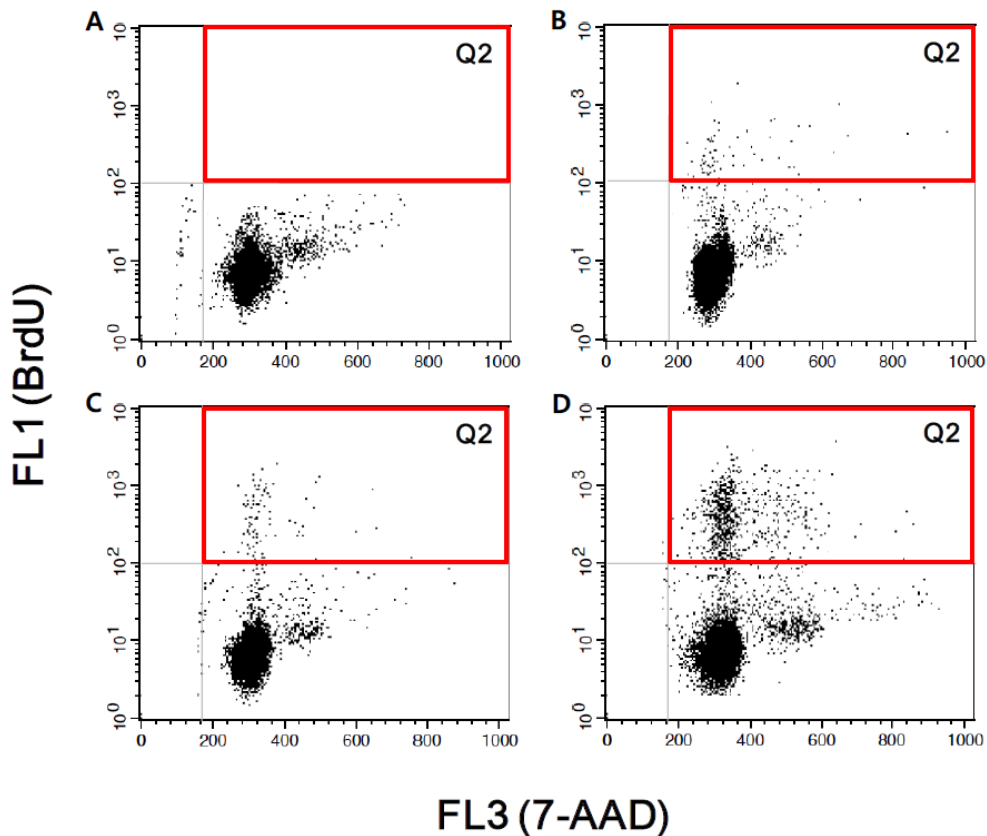


그림 1. BrdU 양성 세포(Q2)의 백분율을 산출하기 위한 유세포분석기의 설정

A: 공시료, B: 무처리군 시료, C: 부형제대조군 시료, D: 시험물질 또는 양성대조군 시료

BrdU 양성 세포(%)의 계수

3. 부형제대조군 처리군(그림 1C), 시험물질 처리군 및 양성대조군 처리군(그림 1D)에 대한 유세포분석을 수행한다. '4분위(Quadrant) 통계'를 통해 각 처리군에 대한 Q2 구역 백분율을 구한다.

SI 및 EC2.7 산출

4. 부형제대조군 처리군의 BrdU 양성인 림프절 단일세포의 수는 채취한 마우스 림프절 단일세포의 수와 10,000개의 림프절 단일세포(유세포분석기를 이용하여 산출)의 BrdU 양성값의 비율을 곱하여 산출한다. 시험물질 처리군의 BrdU 양성인 림프절 단일세포의 수는 앞서 설명된 방법과 동일하게 산출한다. 각각의 SI 값은 시험물질 처리군 내 개체 당 BrdU 양성의 림프절 단일세포의 수를 부형제대조군 처리군 내 BrdU 양성의 림프절 단일세포의 평균으로 나눈 값이다. 각 시험물질군의 평균 SI는 개별 SI를 바탕으로 산출된다.

$$\text{감작지수(SI)} = \frac{\text{시험물질군의 노출된 마우스 당 BrdU 양성 단일 림프절 세포 수}}{\text{부형제대조군의 BrdU 양성 평균 림프절 세포 수}}$$

5. 양성 결과의 경우, EC2.7 값, 즉, 감작지수 2.7을 나타내는 예측 농도(EC2.7)은 아래에서 제시된 방정식을 사용하여 선형 회귀 방법을 통해 산출한다.

$$Y \text{ (SI)} = aX(\text{농도}) + b \rightarrow \text{EC2.7} = (2.7-b)/a$$

* 파라미터 a(기울기)와 b(y-절편)는 선형최소자승법을 통해 도출될 수 있다.

그 밖에 다른 측정 방법들(선형 보간법 또는 외삽법)을 이용하여 EC2.7 값을 산출할 수 있다(32).

III

원문(OECD TG442B 서론)

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, (2024)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at <http://www.oecd.org/termsandconditions/>

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/testguidelines/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: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](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: [\[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf\]](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.

III

원문(OECD TG442B 부속서 II)

OECD/OCDE

442B

Appendix II: In Vivo Skin Sensitisation: The Local Lymph Node Assay: BrdU-FCM

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

1. The LLNA: BrdU-FCM has been validated and recommended, following an international independent scientific peer review, as useful for identifying skin sensitising and non-sensitising test chemicals, with certain limitations (1) (2) (3) (4). The validation study for the LLNA: BrdU-FCM was performed in compliance with the performance standards (PS) for assessment of proposed similar or modified LLNA test methods for skin sensitisation in Annex 1 of the OECD Guideline for the testing of chemicals, Skin sensitisation: Local lymph node assay (TG 429).

2. The LLNA: BrdU-FCM 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-FCM should be used in place of the radioactive LLNA (TG 429) or guinea pig tests (i.e. TG 406) (5), 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-FCM is appropriate for the test chemical (given the incompatibility of limited types of test chemicals with the LLNA: BrdU-FCM [see paragraph 3]) and to aid in dose selection.

3. The LLNA: BrdU-FCM 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-FCM has, however, the potential to reduce the animal use for this purpose when compared to the guinea pig tests (TG 406) (5). Moreover, the LLNA: BrdU-FCM offers a substantial refinement of the way in which animals are used for allergic contact sensitisation testing, since unlike TG 406, the LLNA: BrdU-FCM does not require that challenge-induced dermal hypersensitivity reactions be elicited. Furthermore, the LLNA: BrdU-FCM does not require the use of an adjuvant, as is the case for the guinea pig maximisation test (5). Thus, the LLNA: BrdU-FCM reduces animal distress. Despite the advantages of the LLNA: BrdU-FCM over TG 406 (5), 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] (6) (7), solubility of the test chemicals [such as practically insoluble or insoluble 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 (8)) may necessitate the use of guinea pig tests (i.e. TG 406 (5)). Other limitations that have been identified for the LLNA (7) have also been recommended to apply to the LLNA: BrdU-FCM (1). Other than such identified limitations, the LLNA: BrdU-FCM 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-FCM. According

© OECD, (2024)

OECD/OCDE

442B

to the validation study, the LLNA: BrdU-FCM correctly identified 20 among the 22 reference substances listed in the TG 429 PS on the basis of the LLNA results (1). One moderate skin sensitiser, 2-mercaptobenzothiazole, and one weak skin sensitiser, methyl methacrylate for which the other LLNA variants have limitation in prediction, were misclassified in the LLNA: BrdU-FCM (1) (2) (9). However, as the same dataset was used for setting the Stimulation Index (SI)-values and calculating the predictive properties of the test, the stated results may be an over-estimation of the real predictive properties.

4. Before use of the Test Guideline on a mixture for generating data for an intended regulatory purpose, it should be considered whether, and if so why, it may provide adequate results for that purpose. Such considerations are not needed, when there is a regulatory requirement for testing of the mixture.

5. Definitions are provided in the Annex 1 of the General Introduction.

PRINCIPLE OF THE TEST

6. The basic principle underlying the LLNA: BrdU-FCM 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 ≥ 2.7 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 FCM, which utilises an antibody specific for BrdU that is also labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC). The FCM quantifies the number of BrdU-positive viable cells using a flow cytometer, which is widely employed in analysing lymphocyte population.

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-FCM were conducted exclusively with the BALB/c strain, which is therefore considered the preferred strain (1) (2). The CBA/J strain can also be used in the LLNA: BrdU-FCM. CBA/J strain responses are highly correlated with and more sensitive than BALB/c strain responses (2) (10) (11) (12). However, different cut-off SI values may have to be adopted for each strain to maximize sensitivity after Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis. 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-FCM response do not exist.

Housing and feeding conditions

8. Mice should be group-housed (13) on solid-bottomed cages (34) with suitable substrate and nesting material (35) (36) (37) (38), 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

OECD/OCDE

442B

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 (39) (40), and kept in their cages for at least five days prior to the start of dosing to allow for acclimatisation to the laboratory conditions. Prior to the start of treatment all animals are examined to ensure that they have no observable skin lesions. During all examinations, the mice should be handled using non-aversive methods such as cupping or tunnel handling (41).

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 (33), 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-FCM. 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-FCM response at an exposure level expected to give an increase in the SI ≥ 2.7 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 > 27 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-FCM regularly (i.e. conduct the LLNA: BrdU-FCM 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-FCM 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-FCM (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.

OECD/OCDE

442B

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 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 (14).

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 (15). 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-FCM;
- 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 19. 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 (16) (17). 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 (6) but others may be used if sufficient scientific rationale is provided. In certain situations it may be necessary

OECD/OCDE

442B

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.

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 (14). 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-FCM. The purpose of the pre-screen test is to provide guidance for selecting the maximum dose level to use in the main LLNA: BrdU-FCM 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-FCM 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 (17). 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 (18) (19). The highest dose selected for the main LLNA: BrdU-FCM 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 (18) (19), a statistically significant increase in ear thickness in the treated mice compared to solvent/vehicle control mice has also been used to identify

© OECD, (2024)

OECD/OCDE

442B

irritants in the LLNA (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25). However, while statistically significant increases can occur when ear thickness is less than 25%, they have not been associated specifically with excessive irritation (22) (23) (24) (25) (26).

24. The following clinical observations may indicate systemic toxicity (27) when used as part of an integrated assessment and therefore may indicate the maximum dose level to use in the main LLNA: BrdU-FCM: 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 (28).

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 0.1 mL (2 mg/mouse) of BrdU (20 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 (14). 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 effects on SI values. The LNC are harvested with an appropriate volume of cold PBS (e.g. 2 mL) and, if

OECD/OCDE

442B

necessary, the LNC suspension can be diluted (e.g. 1/10 dilution). The number of LNC should be counted and then 1.5×10^6 LNC are needed for the next step.

Determination of cellular proliferation (measurement of BrdU-positive lymphocytes)

26. BrdU-positive lymphocytes are counted through the FCM using a commercially available kit (e.g. in the validation study the BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA, was used). Other anti-BrdU antibody kits may be used if they provide consistent results. Briefly, the LNC suspension (1.5×10^6) is washed once with PBS by centrifugation and then re-suspended. Cells are permeabilised with the buffer supplied with the kit and then treated with DNase. After washing, FITC-conjugated anti-BrdU antibody is added and after another wash, 7-aminoactinomycin D (7-AAD) solution is added. The number of BrdU-positive cells within the viable 7-AAD-expressing cell population (104 cells) is counted with a flow cytometer.

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 (28).

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 for the LLNA: BrdU-FCM is derived by dividing the number of BrdU-positive LNCs/mouse of test chemical group or the PC group by the mean number of BrdU-positive LNCs in the solvent/VC group. The average SI for the VCs is then one.

The number of BrdU-positive LNCs is defined as (See Appendix II-Annex 1 paragraph 7):
 Number of BrdU-positive LNCs = % of BrdU-positive cells (% of Q2¹) \times number of LNCs

30. The decision process regards a result as positive when $SI \geq 2.7$ (1) (2) (10). However, the strength of the dose-response relationship, the statistical significance and the consistency of the solvent/vehicle and PC responses may also be used when determining whether a borderline result is declared positive (6) (29) (30).

31. If it is necessary to clarify the results obtained, consideration should also be given to various properties of the test chemical, including whether it has a structural relationship to known skin sensitisers,

¹ The gated percentage data (Q2 region %) from 'Quadrant Statistics' in the flow cytometer analysis.

OECD/OCDE

442B

whether it causes excessive skin irritation in the mouse, and the nature of the dose-response observed. These and other considerations are discussed in detail elsewhere (31).

32. 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

33. Data should be summarised in tabular form showing the number of BrdU-positive LNCs for the individual animal, the group mean number of BrdU-positive LNCs/animal, or, 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

34. 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);

Solvent/vehicle:

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

OECD/OCDE

442B

justification for choice of vehicle;

Test animals:

source of BALB/c mice or 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 FCM 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 number of BrdU-positive LNCs, and SI values of individual mouse for each treatment group;
mean and associated error term (e.g. SD, SEM) for number of BrdU-positive LNCs/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 sensitiser.

Literature

- (1) OECD (2018), Local Lymph Node Assay: 5-bromo-2-deoxyuridine-flow cytometry method (LLNA: BrdU-FCM) Validation Study Report, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 283, [ENV/JM/MONO\(2018\)16](#), OECD, Paris.
- (2) OECD (2018), Summary of the Peer Review of the Validation Study for LLNA: BrdU-FCM Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No.284, [ENV/JM/MONO\(2018\)17](#), OECD, Paris.
- (3) Yang H, Na J, Jang WH, Jung MS, Jeon JY, Heo Y, Yeo KW, Jo JH, Lim KM, Bae SJ. (2015), Appraisal of within- and between-laboratory reproducibility of non-radioisotopic local lymph node assay using flow cytometry, LLNA: BrdU-FCM: Comparison of OECD TG429 performance standard and statistical evaluation. Toxicology Letters 234: 172-179.
- (4) Ahn IY, Kim TS, Jung ES, Yi JS, Jang WH, Jung KM, Park MY, Jung MS, Jeon EY, Yeo KY, Jo JH, Park JE, Kim CY, Park YC, Seong WK, Lee AY, Chun YJ, Jeong TC, Jeung EB, Lim KM, Bae SJ, Sohn SJ, Heo Y. (2016), Performance standards based validation study for Local Lymph Node Assay: 5-Bromo-2-Deoxyuridine-flow cytometry method. Regul. Toxicol. Pharmacol. 80:183-194.
- (5) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) 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) 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.

OECD/OCDE

442B

- (9) Kolle SN, Basketter DA, Casati S, Stokes WS, Strickland J, Ravenzwaay BV, Vohr HW, Landsiedel R 2013. Performance standards and alternative assays: Practical insights from skin sensitization. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 65: 278-285
- (10) Lee YS, Yi JS, Seo SJ, Kim JH, Jung MS, Seo IK, Ahn IY, Ko KY, Kim TS, Lim KM, Sohn SJ. (2017), Comparison of BALB/c and CBA/J mice for the local lymph node assay using bromodeoxyuridine with flow cytometry (LLNA: BrdU-FCM). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33:13-22.
- (11) Ha SJ, Ahn IY, Kim DE, Lee JK, Sohn SJ, Jung MS, Heo Y, Omori T, Bae SJ, Lim KM. (2017) Evaluation of radioisotopic and non-radioisotopic versions of local lymph node assays for subcategorization of skin sensitizers compliant to UN GHS rev 4. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 85:124-131.
- (12) Maeda, Y., Hirosaki, H., Yakata, N., Takeyoshi, M. (2016), Comparison of outcomes obtained in murine local lymph node assays using CBA/J or CBA/Ca mice. *J. Appl. Toxicol.* 36:1011-4.
- (13) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (14) 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]
- (15) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (16) 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.
- (17) 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>]
- (18) 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.
- (19) 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>].
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) 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.

OECD/OCDE

442B

- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (26) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitization by *Pfiesteria* extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (27) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm).
- (28) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, [ENV/JM/MONO\(2000\)7](http://www.oecd.org/env/testguidelines), OECD, Paris. Available at: [\[http://www.oecd.org/env/testguidelines\]](http://www.oecd.org/env/testguidelines)
- (29) 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.
- (30) 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.
- (31) 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.
- (32) Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, et al. 2004. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50:274-288.
- (33) ISO 10993-12:2012 Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials.
- (34) National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, D.C
- (35) Olsson A, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Animals* 2002;36:243- 270
- (36) 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
- (37) Würbel H. Ideal homes?: housing effects on rodent brain and behavior. *Trends in Neuroscience*. 2001;24:207-211

OECD/OCDE**442B**

- (38) 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
- (39) Dahlborn K, Bugnon P, Nevalainen T, Raspa M, Verboost 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.
- (40) Norecopa. Toe Clipping: Evaluation and Alternatives. <https://norecopa.no/media/6470/norecopa-toeclip.pdf> Published 2008. Accessed April 9, 2018.
- (41) Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature Methods*. 2010;7:825–826

OECD/OCDE

442B

APPENDIX II - ANNEX I: MEASUREMENT OF BrdU-POSITIVE LNCs WITH FLOW CYTOMETRY

This method is based on the LLNA: BrdU-FCM protocol, which was used for the KoCVAM-coordinated validation study (1). It is recommended that this protocol is used when implementing and using the LLNA: BrdU-FCM in the laboratory.

Preparation prior to measurement

1. To measure incorporated BrdU, the following samples should be prepared prior to the measurement.

Blank sample (n=1): LNCs from the mouse not injected with BrdU.

Non-treatment sample (n=1): LNCs from the mouse not treated with any substances, but received a BrdU injection.

Vehicle control-treatment sample (n≥4): LNCs from the mouse treated with the vehicle control and received a BrdU injection.

Test chemical-treatment sample (n≥4, a minimum of three concentrations): LNCs from the mouse treated with test chemicals and received a BrdU injection.

Positive control-treatment sample (n≥4): LNCs from the mouse treated with the positive control and received a BrdU injection.

Analysis of flow cytometric results

A flow cytometer should be calibrated using appropriate tools (e.g. 'BD FACSCComp' for FACSCalibur™ or 'Beckman coulter FlowCheck' for Cytomics FC500) prior to testing or regularly.

Forward scatter-side scatter (FSC-SSC) graph

- 1) Both the X axis (FSC) and Y axis (SSC) should be on a linear scale.
- 2) Set up a zone (gate) with a flock of viable lymph nodes at its centre in the FSC-SSC graph.
- 3) Outline the gate such that it has at least 10,000 cells.

7-AAD-BrdU graph

- 1) The X axis (7-AAD, FL3) should be on a linear scale, whereas the Y (BrdU, FL1) axis should be a log scale (Figure 1).

* Compensation should be set using unstained, only BrdU-stained, only 7-AAD stained samples, and double stained with both anti-BrdU and 7-AAD at the time of beginning this assay. The compensation can be saved for future use.

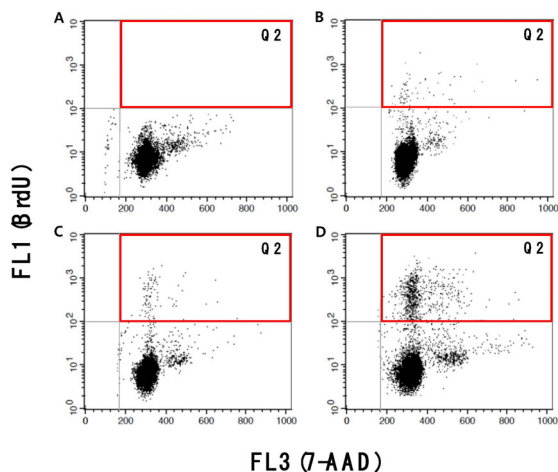
Set up Q2 following the steps below

- 1) Using the blank sample, set up Q2 (upper right) where no cells are present (Figure 1A).
- 2) Using the non-treatment sample, set up Q2 so that % BrdU-positive cells are about 1% of all cells (Figure 1B).
- 3) The Q2 region percentage indicates the proportion of FITC conjugated anti-BrdU-Antibody positive live lymphocyte in 10,000 LNCs.

OECD/OCDE

442B

- Figure 1. Flow cytometry configuration for the calculation of % of BrdU-positive cells (% of Q2)



Note: A, blank sample; B, non-treatment sample; C, vehicle control-treatment sample; D, test chemical or positive control-treatment sample

Count of % BrdU-positive cells

Perform flow cytometric operation for the vehicle control-treatment samples (Figure 1C), the test chemical-treatment samples and the positive control-treatment samples (Figure 1D). Obtain the gated percentage data (Q2 region %) from 'Quadrant Statistics' for each sample.

Calculation of the SI and the EC2.7

The number of BrdU-positive LNCs in the LNs of the vehicle control-treatment group is obtained by multiplying the number of LNCs in the LNs by the ratio of cells expressing BrdU in 10,000 LNCs (obtained by flow cytometry). The number of BrdU-positive LNCs in the LNs of the test chemical-treatment group is obtained by the method described above. Individual SIs are calculated by dividing the number of BrdU-positive LNCs/mouse in the test chemical-treatment group by the mean number of BrdU-positive LNCs in the vehicle control-treatment group. The mean SI of each test chemical group is calculated based on individual SIs.

$$\text{Stimulation Index (SI)} = \frac{\text{Number of BrdU-positive LNCs/mouse exposed to a test chemical}}{\text{Mean number of BrdU-positive LNCs in the vehicle control group}}$$

For the positive results, the EC2.7 value, i.e. an estimated concentration showing 2.7 of SI, could be calculated by linear regression method using the following equation.

$$Y(\text{SI}) = aX(\text{concentration}) + b \rightarrow \text{EC2.7} = (2.7 - b)/a$$

* Parameters a (slope) and b (y-intercept) can be derived using linear least squares method.

Other estimation methods (e.g. linear interpolation or extrapolation formulas) could be utilized to calculate EC2.7 value (32)

**“화장품 등 피부감작성 동물대체시험법
(유세포분석을 이용한 국소림프절시험법, LLNA: BrdU-FCM)
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

식품의약품안전평가원, 비임상자원연구과 및 한국동물대체시험법검증센터

문 의 처 Tel : 043-719-5502, 5506

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187,

주 소 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