KOSHA GUIDE

KOSHA GUIDE

KOSHA GUIDE

KOSHA GUIDE

KOSHA GUIDE 기술지원규정

화학물질의 피부감작성 평가를 위한 국소림프절시험 기술지원규정 E-T-3-2025

한국산업안전보건공단

기술지원규정은 산업안전보건기준에 관한 규칙 등 산업안전보건법령의 요구사항을 이행하는데 참고하거나 사업장 안전·보건 수준향상에 필요한 기술적 권고 규정임

기술지원규정의 개요

○ 작성자 : 안전보건공단 임경택

○ 개정자
- 안전보건공단 조은상
- 안전보건공단 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터

○ 제·개정경과
- 2017년 9월 산업독성분야 기준제정위원회 심의(제정)
- 2024년 11월 보건위생분야 전문위원회 심의(개정)
- 2025년 1월 표준제정위원회 본위원회 심의(개정)

○ 관련규격 및 자료

- OECD Test guideline TG 429 Skin sensitization: Local lymph node assay
- 국립환경과학원 고시 제2024-35호(화학물질의 시험방법에 관한 규정)

○ 관련 법규·규칙·고시 등

- 산업안전보건법 제105조(유해인자의 유해성·위험성평가 및 관리)에 해당하는 법규범 등
- 산업안전보건법 시행규칙 제142조(유해성·위험성 평가대상 선정기준 및 평가방법 등)
- 고용노동부예규 제203호(화학물질의 유해성·위협성 평가에 관한 규정)
- 고용노동부 고시 제2023-9호(화학물질의 분류·표지 및 물질안전보건자료에 관한 기준)

○ 기술지원규정의 적용 및 문의

- 이 기술지원규정에 대한 의견 또는 문의는 산업안전포털 홈페이지(portal.kosha.or.kr)의 기술지원규정(KOSHA GUIDE) 소관 분야별 문의처 안내를 참고하시기 바랍니다.
- 동 규정 내에서 인용된 관련규격 및 자료, 법규 등에 관하여 최근 개정본이 있을 경우에는 해당 개정본의 내용을 참고하시기 바랍니다.

공표일자 : 2025년 3월 26일
제 정 자 : 한국산업안전보건공단 이사장

목 차

1. 목 적 ····· 1

2. 적용범위 ····· 1

3. 용어의 정의 ····· 1

4. 국소림프절 시험(LLNA) ····· 2

4.1 시험 개요 ····· 2

4.2 시험 방법 ····· 3

4.3 시험 결과 및 보고 ····· 7

5. 국소림프절시험(LLNA:BrdU-ELISA, FCM) ····· 9

5.1 시험 개요 ····· 9

5.2 시험 방법 ····· 10

5.3 시험 결과 및 보고 ····· 12

6. 국소림프절시험(LLNA:DA) ····· 15

6.1 시험 개요 ····· 15

6.2 시험 방법 ····· 15

6.3 시험 결과 및 보고 ····· 18

화학물질의 피부감작성 평가를 위한 국소림프절시험 기술지원규정

1. 목 적

이 규정은 산업안전보건법 및 고용노동부예규 등에 의거 화학물질 취급에 따른 건강장해에 관한 정보를 제공하기 위한 동물시험법으로 피부감작성에 대한 시험을 통해 화학물질 또는 혼합물의 특성을 평가하는 것을 목적으로 한다.

2. 적용범위

이 규정은 산업안전보건법 및 고용노동부예규 등과 관련하여 화학물질의 피부과민성 에 관한 자료 제공을 위한 피부감작성 동물시험법에 적용한다.

3. 용어의 정의

(1) 이 규정에서 사용하는 용어의 정의는 다음과 같다

(가) “신뢰성(Reliability)”이란 동일한 실험절차를 사용하여 시험하였을 때 실험실 내 또는 실험실 간 시험결과의 일치성 정도를 말하며, 시험실내와 실험실간 재현성을 및 실험실내 반복성으로 평가한다.

(나) “실험실간 재현성(Inter-laboratory reproducibility, Between-laboratory reproducibility)”이란 서로 다른 실험실에서 동일한 시험절차와 시험물질로 시험을 수행하였을 때 양적 또는 질적으로 유사한 결과를 생산할 수 있는지 측정하는 것으로서 시험법이 시험실간 전수될 수 있는지 여부를 나타내는 것을 말한다.

(다) “실험실내 재현성(Intra-laboratory reproducibility, Within-laboratory reproducibility)”이란 동일한 실험실에서 자격을 갖춘 사람이 다른 시점에서 동일한 실험절차로 같은 결과를 생산할 수 있는 정도를 말한다.

(라) “이상치(Outlier)”란 집단에서 무작위로 채취한 샘플이 다른 수치와 상당히 다른 값을 보이는 것을 말한다.

(마) “피부 감작성(Skin sensitization)”이란 면역학적 과정으로 감수성 있는 사람이 화학적 항원에 국소적으로 노출되었을 때 나타나는 것을 말하며, 화학적 항원은 접촉성 감작성(contact sensitization)을 발병시킬 수 있는 피부 면역반응을 촉발한다.

(바) “감작성지수(Stimulation Index, SI)”란 시험물질의 피부 감작 가능성을 평가하기 위해 산출된 값으로서, 용매 대조군에 대한 시험물질 처리군의 상대적 림프구 증식 정도의 비율을 말한다.

(사) “시험물질(Test substance)”이란 단일물질 또는 여러 성분의 복합체(예: 완제품, 처방)로서 이 규정에 따라 시험된 모든 물질을 말한다.

(아) “보조제(Adjuvant)”란 일종의 조직이나 cell의 debris들 같은 것으로, 면역증강을 위해 같이 넣어주는 물질로, 면역 활성을 증가시켜 항체 만드는 활성을 활발하게 만들어주는 역할을 한다.

(2) 그 밖에 이 규정에서 사용하는 용어의 정의는 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 산업안전보건법, 같은 법 시행령, 같은 법 시행규칙 및 고용노동부 고시에서 정하는 바에 의한다.

4. 국소림프절시험(LLNA)

4.1 시험 개요

4.1.1 개요

(1) 국소림프절시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)은 마우스를 이용한 피부감작성 시험법으로, 기니픽을 이용한 GPMT(Guinea pig maximization test)와 Buehler시험법을 대체할 수 있는 시험법이다.

(2) 본 시험법은 과학기술의 발전과 동물복지 측면에 장점이 있으며, 동물에서의 화학물질의 잠재적 피부감작성을 평가하기 위함이다.

4.1.2 초기 고려사항

(1) LLNA는 피부감작물질을 확인하는 대체시험법이다. 본 시험법은 기니픽(Guinea pig)을

이용한 방법을 완전하게 대체하는 것은 아니지만 동등한 가치를 지니고 있으며, LLNA 시험결과 양성 혹은 음성으로 판정되었을 때 더 이상 추가 확인 작업을 하지 않아도 된다.

(2) LLNA는 in vivo 방법이지만 접촉성 감작능을 평가하는데 필요한 동물 수를 감소시킬 수 있도록 개선된 시험법이다. LLNA는 감작 유도단계에서 시험물질에 의해 활성화되는 면역 반응을 근거로 한다. 기니픽을 이용한 피부감작성 시험법과는 달리 LLNA는 보조제(Adjuvant)에 의해 유도되는 피부과민반응을 일으키는 과정이 요구되지 않으며, 보조제를 사용하지 않아 동물의 고통을 줄일 수 있다.

(3) 본 시험법은 방사성동위원소를 사용하므로 방사성동위원소의 사용, 저장, 운반, 폐기 및 기타 취급상의 기준을 준수하여야 한다.

4.1.3 시험법의 원리

(1) LLNA는 감작물질이 도포부위에서 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도한다는 원리에 근거한 시험법이다. 이러한 증식은 도포물질의 농도 및 알레르기 유발능에 비례하며, 감작능을 객관적이고 정량적으로 측정할 수 있도록 해준다.

(2) LLNA는 시험군의 증식정도와 용매대조군의 증식정도를 감작성지수(SI)로 비교 평가한다. SI는 용매대조군 대비 시험군에 있어서 림프구 증식 비율로 결정하고, 시험물질의 피부감작물질 가능성에 대한 판정은 SI가 적어도 3 이상이어야 한다.

(3) 본 시험법은 세포의 증식을 측정하기 위해 방사성동위원소를 이용한다. 하지만 증식도를 평가하기 위하여 충분한 자료와 시험법에 대한 적절한 과학적 근거가 있다면 다른 방법도 적용될 수 있다.

4.2 시험 방법

4.2.1 실험동물

(1) 일반적으로 CBA/Ca 또는 CBA/J 종 마우스로 임신 경험이 없는 암컷을 사용한다.

(2) 8~12 주령의 마우스를 사용하며, 동물의 체중은 평균체중으로부터 20%를 넘지 않도록 한다. LLNA 결과로 종 또는 성의 차이가 없다는 충분한 자료가 있으면 기타 다른 마우스 종이나 수컷을 사용할 수 있다.

(3) 실험동물은 집단으로 사육을 한다. 실험동물실의 온도는 22±3℃, 상대습도는 최소 30% 이상이어야 하며, 사육실 청소 시를 제외하고 70%를 넘지 않아야 하고 50~60%를 목표로 유지되어야 한다. 인공조명을 사용하며 조명시간은 12시간 주기로 명암을 조절한다. 식이는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음수와 함께 제한 없이 공급한다.

(4) 동물은 무작위로 선별하고, 개별적으로 식별할 수 있게 한다(단 귀에 표시해서는 안 됨). 실험환경에서 투여시작 전 적어도 5일간 순화기간을 둔다. 시험물질 처치 시작 전에 동물 피부에 병변이 없는지 검사한다.

4.2.2 신뢰도 검사

(1) 양성대조군은 본 시험이 적절히 수행되었고 시험을 성공적으로 수행한다는 실험실의 숙련도를 보여주기 위해 사용한다. 용매대조군을 음성대조군으로 하며 상황에 따라 무처치 대조군을 포함할 수 있다.

(2) 양성대조물질로는 헥실신나믹알데히드(Hexyl cinnamic aldehyde, †CAS No. 101-86-0)와 머캅토벤조치아졸(Mercaptobenzothiazole, †CAS No. 149-30-4)이 권장된다. 양성대조물질의 농도는 명확한 양성반응을 나타내지만 과도한 반응을 유발하지 않는 농도로 선택한다.

(3) 양성대조군은 음성대조군보다 감작성지수가 3 이상 증가할 것으로 예상되는 농도에서 양성반응을 나타내야 한다. 그러나 위의 기준에 합당한 물질로 타당한 근거가 있으면 다른 물질을 양성대조물질로 사용할 수 있다. 양성대조물질의 투여량은 과도한 피부자극이나 전신독성을 유발하지 않아야 하고, 반응유도는 재현성이 있어야 하며 감작성지수 20을 넘지 않도록 한다.

(4) 일반적으로 매 시험마다 양성대조군을 둔다. 그러나 시험기관에서 6개월 이상 지속적으로 시험하여 일정하게 만족스런 결과가 도출된 양성대조물질에 대한 축적된 자료가 있다면 매 시험마다 양성대조군을 포함하지 않아도 된다. 단, 이러한 양성대조군에 대한 시험을 생략하는 기간이 6개월을 넘어서는 안 된다.

(5) 일반적으로 일정한 반응을 나타내는 용매(예: Acetone/Olive oil 등)를 양성대조 물질의 용매로 사용하지만 이외 다른 용매를 사용하는 경우는 이 용매가 양성대조물질의 반응에 영향을 주는지 사전 검사하여야 한다.

4.2.3 동물수와 투여농도

(1) 투여농도는 최소한 세 가지 농도로 하며, 군당 최소 네 마리의 동물을 사용한다. 용매만을 투여한 음성대조군과 적절한 양성대조군이 포함되어야 한다. 동물 개체별 자료를 얻고자 하는 경우, 군당 최소 5마리의 동물을 사용한다.

(2) 농도는 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 등의 농도에서 순차적으로 선택한다. 3개의 연속된 농도를 선택할 때 급성독성시험과 피부자극성시험 자료를 고려하고, 최고농도는 전신독성 및 과도한 국소 피부자극을 피할 수 있는 최대농도로 한다. 동물에 시험물질을 처치하지 않는 것을 제외하고, 대조군 시험동물은 처리군 시험동물과 동일한 방법으로 실험한다.

(3) 시험물질을 도포하기에 가장 적절한 용액 또는 현탁액을 만들기 위해 시험 농도와 용해도를 최대로 할 수 있는 용매를 선택한다. 용매는 아세톤/올리브오일(Acetone/Olive oil, 4:1 v/v) (AOO), N,N-디메틸포름아마이드(N,N-Dimethylformamide, DMF), 메틸에틸케톤(Methyl ethyl ketone, MEK), 프로필렌글리콜(propylene glycol, PG), 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulphoxide, DMSO) 등이 순차적으로 권장되며, 과학적인 충분한 근거가 있으면 다른 용매도 사용할 수 있다.

(4) 경우에 따라서는 인체에 적용 시 사용되는 용매가 필요하거나 시험물질이 특정 용매에 함유되어 판매되고 있는 경우에는 그 용매를 추가 대조군으로 사용한다. 피부를 잘 적시고 즉시 마르지 않도록 친수성 성분이 용매에 잘 혼합될 수 있게 특별히 주의를 기울이고 완전한 수용성 용매는 피한다.

4.2.4 예비 시험

(1) 전신독성 및 과도한 국소피부자극성을 나타내지 않는 본 시험의 최고농도를 결정하기 위해 수행한다. 본 시험과 같은 조건으로 시험물질을 도포하며, 최고농도는 시험물질이 액체일 경우 100%, 고체나 현탁액의 경우 조제 가능한 최대농도여야 한다.

(2) 실험동물은 투여군 당 한 마리 또는 두 마리를 사용하고 모든 마우스에 대해 시험물질 노출에 따른 임상 증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전과 시험 종료 전날 측정한다.

(3) 각 마우스 양쪽 귀에서 홍반 발생 여부를 관찰하여 홍반점수를 바탕으로 점수를 매긴다. 두께 측정기를 통해 1일, 3일, 6일 차에 귀의 두께를 측정한다. 홍반점수가 3 이상이거나 귀의 두께가 25% 이상으로 측정되는 경우 과도한 국소피부자극으로 볼 수 있다.

(4) 본 시험의 최고농도는 예비 시험에서 전신독성과 과도한 국소피부자극성이 보이지 않는 최고농도로 설정한다.

<표 1> 홍반점수표

관찰 결과	점수
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 거의 식별할 정도)	1
뚜렷한 홍반	2
중간정도부터 심한 홍반	3
심한 홍반과 가피 형성	4

4.2.5 본 시험

(1) 시험 1일차 : 각 동물의 개체를 식별하고, 체중을 기록한다. 적절하게 희석된 시험물질, 용매(음성대조물질), 양성대조물질을 각각 양쪽 귀의 뒷면에 25 ㎕씩 1회 도포한다

(2) 시험 2일차 및 3일차 : 첫날 시험을 반복한다.

(3) 시험 4일차 및 5일차에는 도포하지 않는다.

(4) 시험 6일차 : 동물의 체중을 기록하고, 20 μCi(7.4×10^5 Bq) ^{3}H-methyl thymidine이 함유된 멸균인산생리식염수(phosphate-buffered saline(PBS) 250 ㎕를 시험군과 용매 대조군의 마우스 꼬리정맥에 주사한다. 또는 2 μCi(7.4×10^4 Bq) ^{125}I-iododeoxyuridine과 10^{-5}M fluorodeoxyuridine이 함유된 PBS 250 ㎕를 마우스의 꼬리정맥에 주사한다. 5시간 후 마우스를 희생시켜 양쪽 귀의 림프절을 군별 또는 개체별로 채취하여 합한다. 림프절 식별 및 해부에 관한 자세한 사항과 도표는 ICCVAM Immunotoxicology Working Group LLNA Protocol에서 찾아 볼 수 있다.

(5) 세포 현탁액의 준비 : 림프절에서 단일세포군을 얻기 위해 세포를 물리적으로 유리시킨다(예: 간극 크기가 200 ㎛인 스테인리스 망). 림프절 세포를 PBS로 2회 세척하고 5% Trichloroacetic acid(TCA)를 가하여 4℃에서 18시간 동안 방치하여 침전시킨다. 세포침전물에 TCA 1 ㎖를 가하여 부유시킨 다음 ^{3}H-계수(Counting)를 위해 섬광(Scintillation) 용액 1 ㎖가 포함된 섬광 바이알로 옮기거나 ^{125}-계수가 가능한 감마계수관(Gamma counting tube)으로 옮긴다.

(6) 세포 증식능 확인(통합 방사능 측정) : ^{3}H-methylthymidine의 결합은 β-섬광계수법으로 측정하고, ^{125}I-iododeoxyuridine의 결합은 ^{125}I-계수로 측정하여 DPM(Disintegration per minute)으로 나타낸다. 방사성동위원소 결합 정도를 DPM/군 또는 DPM/개체로 나타낸다.

(7) 동물의 관찰 : 임상관찰은 적용부위에서의 국소자극, 전신독성 등 독성증상을 하루에 한번 주의 깊게 관찰하여 개체별로 기록하며, 각 동물에 대한 기록은 유지하여야 한다. 체중은 시험 첫째 날과 부검 일에 각각 측정하여 기록한다.

4.3 시험 결과 및 보고

4.3.1 결과의 표시

(1) 결과는 감작성지수로 나타낸다. 군별로 합한 경우 감작성지수는 시험군의 DPM을 용매대조군 DPM으로 나눈 값이다. 개체별로 합한 경우 감작성지수는 시험군 또는 양성대조군 평균 DPM을 용매대조군의 평균 DPM으로 나누어 계산한다. 감작성지수의 값이 3 이상이면 양성으로 판단하고, 용매대조군의 평균 감작성지수는 1이다.

(2) 개체별로 감작성지수를 계산한 경우 자료의 통계분석이 가능하다. 적절한 통계분석법의 선택을 위해 분산의 편재 가능성, 자료의 변환, 비모수통계분석이 필요한지 검토해야 한다. 자료를 올바르게 해석하기 위해서는 시험군과 용매대조군의 모든 개체별 자료를 평가하여 신뢰구간을 고려한 최적의 용량-반응 곡선을 구한다.

(3) 전체자료를 검토하였을 때 비정상적으로 크게 벗어난 자료가 있으면 평균대신 중앙값을 사용하는 등 대체할 수 있는 분석방법을 고려하거나 그 자료를 삭제할 필요성도 생각해 보아야 한다.

(4) 용량-반응 정도와 적절한 경우 통계적인 유의성을 고려하여 감작성지수가 3이상이면 양성으로 판정한다. 판정 결과를 명확히 하려면 기존에 알려진 감작물질과의 구조적 유사성이 있는 지, 심한 피부자극을 유발하는지, 용량-반응 관계의 특성 등 다양한 시험물질의 성상에 대한 검토도 병행되어야 한다.

(5) 각 단계에서 관찰된 동물의 피부 반응 결과는 표로 정리한다.

4.3.2 시험결과의 보고

자료는 평균 및 개개의 DPM 값과 각각의 농도에 대한 감작성지수 값을 표로 작성하며, 시험

보고서에는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

(1) 시험물질

(가) 일반정보(CAS 번호, 시험물질 입수처, 순도, 불순물 함유여부, lot 번호 등)

(나) 물리적 성상, 물리화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도)

(다) 혼합물인 경우 조성과 구성성분의 비율

(라) 용매 (순도, 농도, 사용된 부피, 용매선택 이유)

(2) 실험동물

(가) 사용된 마우스의 종

(나) 동물의 미생물 모니터링 자료

(다) 동물 수, 주령, 성별

(라) 동물 입수처, 사육 조건, 사료 등

(3) 시험조건

(가) 시험물질의 준비와 도포에 대한 상세정보

(나) 농도 선택사유(용량 결정시험이 수행 되었다면 그 결과 포함)

(다) 용매, 시험물질의 도포농도, 도포물질의 총량

(라) 식이 및 음수에 대한 상세정보 (사료의 형태, 제조회사, 음수원)

(4) 신뢰성 점검

(가) 시험물질, 농도, 용매 정보를 포함한 최근 신뢰성 점검 자료

(나) 시험기관에서 축적된 양성대조군과 음성대조군 자료

(5) 결과

(가) 시험 시작 및 종료 시 동물의 체중

(나) 군별일 경우 평균(또는 중앙값) DPM에 대한 표, 개체별일 경우 DPM에 대한 표, 군별 및 개체별 접근방법 DPM값 범위, 대조군을 포함하는 각 군의 감작성지수 값

(다) 통계분석 자료

(라) 시험기간 중 각 동물의 도포부위 피부자극을 포함한 독성증상 및 발현 시기

(6) 토의

(가) 시험결과, 용량-반응분석, 통계분석에 대한 토의

(나) 시험물질의 피부감작성 여부에 대한 결론

5. 국소림프절시험(LLNA:BrdU-ELISA, FCM)

5.1 시험 개요

5.1.1 개요

이 시험은 마우스를 이용한 피부감작성시험법인 국소림프절시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)에서 림프구 중의 BrdU 함량을 방사선동위원소를 사용하지 않고 ELISA 또는 FCM(Flow cytometry method) 기법을 통해 정량하여 림프구 증식을 측정함으로써 피부감작성을 판별하기 위한 방법이다.

5.1.2 시험법의 원리

(1) 시험물질이 도포부위에서 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도한다는 원리에 근거한 시험법으로, 림프구 증식은 BrdU가 세포의 DNA에 얼마나 유입되었는지에 따라 평가된다.

(2) 과산화효소(peroxidase)가 부착된 BrdU 특이항체를 이용해 ELISA 기법으로 정량 후

BrdU 표지값으로 나타낼 수 있다.

(3) 또는 플루오레세인 이소티오네이트(Fluorescein isothiocyanate, FITC)로 표지된 BrdU 특이항체 및 FCM 기법을 통해 BrdU-LNC(Lymph node cell)로 나타낼 수 있다.

5.2 시험 방법

5.2.1 실험동물

(1) 일반적으로 CBA/J 계통의 마우스로 임신 경험이 없거나 비임신 상태의 8~12 주령의 암컷을 사용한다.

(2) 동물의 체중은 평균체중으로부터 20%를 넘지 않도록 한다. 정당한 사유가 있다면 기타 다른 마우스 종이나 수컷을 사용할 수 있다.

(3) 실험동물은 집단으로 사육을 한다. 실험동물실의 온도는 22 ± 3 ℃, 상대습도는 30 ~70 %로 유지하고 가능한 50 ~ 60 %로 유지되어야 한다. 인공조명을 사용하며 조명시간은 12시간 주기로 명암을 조절한다. 식이는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음수와 함께 제한 없이 공급한다.

(4) 동물은 무작위로 선별하고, 개별적으로 식별할 수 있게 한다(단 귀에 표시해서는 안 됨). 실험환경에서 투여시작 전 적어도 5일간 순화기간을 둔다. 시험물질 처치 시작 전에 동물 피부에 병변이 없는지 검사한다.

5.2.2 신뢰도 검사

(1) 시험을 수행하는 시험기관의 신뢰도 확인을 위해 양성대조물질과 음성대조물질을 사용해 반응을 확인해야 한다.

(2) 양성대조물질로는 25 % 헥실신나믹알데히드와 25 % 유제놀(Eugenol, CAS No. 97-53-0)이며, 용매로 아세톤/올리브오일(4:1 v/v)을 사용하는 것을 권장한다.

(3) 양성대조물질의 투여량은 과도한 피부자극이나 전신독성을 유발하지 않아야 하며 반응유도는 재현성이 있어야 한다. ELISA 방법의 경우 양성대조군은 음성대조군보다 감작성지수가 1.6 이상 나타나야 하며 감작성지수 14를 넘지 않도록 한다. FCM 방법의 경우 양성대조군은 음성대조군보다 감작성지수가 2.7 이상 나타나야 하며 감작성지수가 27을 넘지 않도록 한다.

5.2.3 동물수와 투여농도

(1) 투여농도는 최소한 세 가지 농도로 하며, 군당 최소 네 마리의 동물을 사용한다. 용매만을 투여한 음성대조군과 적절한 양성대조군이 포함되어야 한다.

(2) 농도는 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 등의 농도에서 순차적으로 선택한다. 투여농도를 선택시 급성독성시험과 피부자극성시험 자료를 고려해, 최고농도는 전신독성 및 과도한 국소 피부자극을 피할 수 있는 최대농도로 한다.

(3) 시험물질을 도포하기에 가장 적절한 용액 또는 현탁액을 만들기 위해 시험 농도와 용해도를 최대로 할 수 있는 용매를 선택한다. 용매는 아세톤/올리브오일(4:1 v/v), N,N-디메틸포름아마이드, 메틸에틸케톤, 프로필렌글리콜, 디메틸설폭사이드 등이 권장된다.

5.2.4 예비 시험

(1) 전신독성 및 과도한 국소피부자극성을 나타내지 않는 본 시험의 최고농도를 결정하기 위해 수행한다. 본 시험과 같은 조건으로 시험물질을 도포하며, 최고농도는 시험물질이 액체일 경우 100%, 고체나 현탁액의 경우 조제 가능한 최대농도여야 한다.

(2) 실험동물은 투여군 당 한 마리 또는 두 마리를 사용하고 모든 마우스에 대해 시험물질 노출에 따른 임상 증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전과 시험 종료 전날 측정한다.

(3) 각 마우스 양쪽 귀에서 홍반 발생 여부를 관찰하여 <표 1>의 홍반점수표를 바탕으로 점수를 매긴다. 두께 측정기를 통해 1일, 3일, 6일 차에 귀의 두께를 측정한다. 홍반 점수가 3 이상이거나 귀의 두께가 25% 이상으로 측정되는 경우 과도한 국소피부자극으로 볼 수 있다.

(4) 본 시험의 최고농도는 예비 시험에서 전신독성과 과도한 국소피부자극성이 보이지 않는 최고농도로 설정한다.

5.2.5 본 시험

(1) 시험 1일차 : 각 동물의 개체를 식별하고, 체중을 기록한다. 적절하게 희석된 시험물질, 용매(음성대조물질), 양성대조물질을 각각 양쪽 귀의 뒷면에 25 ㎕씩 1회 도포한다

(2) 시험 2일차 및 3일차 : 첫날 시험을 반복한다.

(3) 시험 4일차에는 도포하지 않는다.

(4) 시험 5일차 : BrdU(10 mg/mL)용액 0.5 mL (ELISA 방법) 또는 0.1 mL (FCM 방법)를 복강에 투여한다.

(5) 시험 6일차 : 동물의 체중을 기록하고, BrdU 주입 24시간 후 마우스를 희생시켜 양쪽 귀의 림프절을 채취하고 각각을 PBS에 처리한다.

(6) 세포 현탁액의 준비 : 각 동물의 좌우 귀로부터 얻은 림프절에서 세포를 유리시켜 부유액을 만든다(예: 간극 크기가 200 ㎛인 스테인리스 망 사용). ELISA 방법의 경우 음성대조군 세포현탁액의 흡광도 값이 0.1 ~ 0.2 이내가 되도록 부유액의 현탁액의 총량을 조절하고, FCM 방법의 경우 1.5 x 10^6 개의 세포가 필요하다.

(7) 세포 증식능 확인(ELISA 방법으로 림프구의 BrdU 함량 측정) : 상용화된 ELISA 키트를 사용하여 BrdU를 측정한다. 세포 현탁액 100 uL를 마이크로플레이트의 3개 웰에 각각 넣고 세포의 고정 및 변성 후 BrdU 항체를 각 웰에 첨가해 반응시킨다. 이후 세척하여 BrdU 항체를 제거 후 기질용액을 각 웰에 첨가해 발색시키고 370 nm에서 흡광도를 측정한다(reference 파장 : 492 nm).

(8) 세포 증식능 확인(FCM 방법으로 BrdU 양성 림프구 측정) : 상용화된 키트와 FCM을 사용해 BrdU-양성 림프구를 계수할 수 있다. LNC 부유액을 PBS로 1회 세척 후 재현탁시킨다. 키트와 함께 제공된 완충액으로 세포를 투과시키고 DNase를 처리한다. 세척 후 FITC가 표지된 anti-BrdU 항체를 첨가하고 세척후 7-아미노액티오마이신 D (7-AAD) 용액을 첨가한다. 생존 가능한 7-AAD 발현 세포 집단 내의 BrdU 양성 세포의 수를 유세포 분석기로 계수한다.

(9) 동물의 관찰 : 임상관찰은 적용부위에서의 국소자극, 전신독성 등 독성증상을 하루에 한번 주의 깊게 관찰하여 개체별로 기록한다.

5.3 시험 결과 및 보고

5.3.1 결과의 표시

(1) ELISA 법

(가) ELISA 법의 경우 결과는 감작성지수로 나타낸다. 감작성지수는 투여군 또는 양성대조군의 평균 BrdU 표지 값을 용매대조군의 평균 BrdU 표지값으로 나눈 값으로 용매대조군의 평균 감작성지수 값은 1이다. BrdU 표지값은 아래 식으로 계산한다.

※ BrdU labelling index = $(ABS_{em} - ABS\ blank_{em}) - (ABS_{ref} - ABS\ blank_{em})$

(나) 감작성지수 값이 1.6 이상일 때 해당 시험물질은 양성으로 판정한다. 그러나 경계값(감작성지수 값이 1.6 ~1.9)인 경우 용량-반응 관계, 전신독성 또는 심각한 자극성, 통계적 유의성 등의 추가적 정보를 고려해 판단한다.

(2) FCM 법

(가) FCM 법의 경우 결과는 감작성 지수로 나타낸다. 감작성지수는 투여군 또는 양성대조군의 마우스당 BrdU-양성 LNC를 용매/용매대조군의 평균 BrdU-양성 LNC 수로 나눈 값으로 용매대조군의 평균 감작성지수 값은 1이다. BrdU-양성 LNC의 수는 아래와 같이 계산한다.

※ BrdU-양성 LNC 수 = BrdU-양성 세포 %(Q2 %*) x LNC의 수

* Q2 % : 유세포 분석기 분석에서 사분면 통계의 게이트 백분율 자료를 말함

(나) 감작성지수 값이 2.7 이상일 때 해당 시험물질은 양성으로 판정한다. 그러나 경계값인 경우 용량-반응 관계, 전신독성 또는 심각한 자극성, 통계적 유의성 등의 추가적 정보를 고려해 판단한다.

(3) 각 단계에서 관찰된 동물의 피부 반응 결과는 표로 정리한다.

5.3.2 시험결과 및 보고

시험보고서에는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

(1) 시험물질

(가) 일반정보(CAS 번호, 시험물질 입수처, 순도, 불순물 함유여부, 로트 번호 등)

(나) 물리적 성상, 물리화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도)

(다) 다조성물질, UVCBs 및 혼합물인 경우 : 성분의 화학적 동일성, 정량적 발생 및 관련된 물리화학적 특성에 대한 최대 정보

(라) 대조군 (CAS 번호, 출처, 순도, 불순물 정보, 로트 번호, 물리화학적 특성 등

(마) 용매 (순도, 농도, 사용된 부피, 용매선택 이유)

(2) 실험동물

(가) 사용된 마우스의 종(출처)

(나) 동물 수, 주령, 성별

(다) 동물 입수처, 사육 조건, 사료 등

(3) 시험조건

(가) 투여농도 선택사유 및 근거

(나) 시험물질 조제 및 투여 세부사항, 실제 투여량 환산 정보

(다) 식이 및 음수에 대한 상세정보 (사료의 형태, 제조회사, 음수원)

(라) 독성 평가 방법 및 양성/음성 판정 기준

(마) ELISA 또는 FCM 키트 정보(출처, 로트 번호, 제조사 품질보증 자료)

(4) 신뢰성 점검

(가) 시험물질, 농도, 용매 정보를 포함한 최근 신뢰성 점검 자료

(나) 시험기관에서 축적된 양성대조군과 음성대조군 자료

(5) 결과

(가) 시험 시작 및 종료 시 동물의 체중, 평균 체중 및 편차

(나) 각 동물에 대해 투여 부위 피부자극성을 포함한 독성 정보(발현 시점 및 경과)

(다) 동물 개체별 BrdU 표지지수 및 각 투여군에 대한 감작성지수 값(표) 또는 동물

개체별 BrdU-양성 LNC 수 및 각 투여군에 대한 감작성지수 값(표)

(라) 각 군의 BrdU 표지지수 또는 각 군의 BrdU-양성 LNC/마우스 평균 및 편차값과 개체처리방식 결과에서 이상치 분석 결과

(마) 용량-반응관계

(바) 통계학적 분석 방법

(6) 토의

(가) 시험결과, 용량-반응분석, 통계분석에 대한 토의

(나) 시험물질의 피부감작성 여부에 대한 결론

6. 국소림프절시험(LLNA:DA)

6.1 시험 개요

6.1.1 개요

이 시험은 마우스를 이용한 피부감작성시험법인 국소림프절시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)에서 방사선동위원소를 사용하지 않고 ATP (adenosine triphosphate) 함량 분석을 통해 림프구 증식을 측정함으로써 피부감작성을 판별하기 위한 방법이다.

6.1.2 시험법의 원리

(1) 시험물질이 도포부위에서 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도한다는 원리에 근거한 시험법으로, 림프구 증식은 ATP 함량으로 평가된다.

(2) ATP 함량은 루시퍼라제 활성을 이용한 생물발광방법으로 측정한다.

6.2 시험 방법

6.2.1 실험동물

(1) 일반적으로 CBA/J 계통의 마우스로 임신 경험이 없거나 비임신 상태의 8~12 주령의 암컷을 사용한다.

(2) 동물의 체중은 평균체중으로부터 20%를 넘지 않도록 한다. 정당한 사유가 있다면 기타 다른 마우스 종이나 수컷을 사용할 수 있다.

(3) 실험동물은 집단으로 사육을 한다. 실험동물실의 온도는 22 ± 3 ℃, 상대습도는 30 ~70 %로 유지하고 가능한 50 ~ 60 %로 유지되어야 한다. 인공조명을 사용하며 조명시간은 12시간 주기로 명암을 조절한다. 식이는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음수와 함께 제한 없이 공급한다.

(4) 동물은 무작위로 선별하고, 개별적으로 식별할 수 있게 한다(단 귀에 표시해서는 안 됨). 실험환경에서 투여시작 전 적어도 5일간 순화기간을 둔다. 시험물질 처치 시작 전에 동물 피부에 병변이 없는지 검사한다.

6.2.2 신뢰도 검사

(1) 시험을 수행하는 시험기관의 신뢰도 확인을 위해 양성대조물질과 음성대조물질을 사용해 반응을 확인해야 한다.

(2) 양성대조물질로는 25 % 헥실신나믹알데히드와 25 % 유제놀이며, 용매로 아세톤/올리브오일(4:1 v/v)을 사용하는 것을 권장한다.

(3) 양성대조물질의 투여량은 과도한 피부자극이나 전신독성을 유발하지 않아야 하며 반응유도는 재현성이 있어야 한다. 양성대조군은 음성대조군보다 감작성지수가 1.8 이상 나타나야 하며 감작성지수 10을 넘지 않도록 한다.

6.2.3 동물수와 투여농도

(1) 투여농도는 최소한 세 가지 농도로 하며, 군당 최소 네 마리의 동물을 사용한다. 용매만을 투여한 음성대조군과 적절한 양성대조군이 포함되어야 한다.

(2) 농도는 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5% 등의 농도에서 순차적으로 선택한다. 투여농도를 선택시 급성독성시험과 피부자극성시험 자료를 고려해, 최고농도는 전신독성 및 과도한 국소 피부자극을 피할 수 있는 최대농도로 한다.

(3) 시험물질을 도포하기에 가장 적절한 용액 또는 현탁액을 만들기 위해 시험 농도와

용해도를 최대로 할 수 있는 용매를 선택한다. 용매는 아세톤/올리브오일(4:1 v/v), N,N-디메틸포름아마이드, 메틸에틸케톤, 프로필렌글리콜, 디메틸설폭사이드 등이 권장된다.

6.2.4 예비 시험

(1) 전신독성 및 과도한 국소피부자극성을 나타내지 않는 본 시험의 최고농도를 결정하기 위해 수행한다. 본 시험과 같은 조건으로 시험물질을 도포하며, 최고농도는 시험물질이 액체일 경우 100%, 고체나 현탁액의 경우 조제 가능한 최대농도여야 한다.

(2) 실험동물은 투여군 당 한 마리 또는 두 마리를 사용하고 모든 마우스에 대해 시험물질 노출에 따른 임상 증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전과 시험 종료 전날 측정한다.

(3) 각 마우스 양쪽 귀에서 홍반 발생 여부를 관찰하여 <표 1>의 홍반점수표를 바탕으로 점수를 매긴다. 두께 측정기를 통해 1일, 3일, 6일 차에 귀의 두께를 측정한다. 홍반 점수가 3 이상이거나 귀의 두께가 25% 이상으로 측정되는 경우 과도한 국소피부자극으로 볼 수 있다.

(4) 본 시험의 최고농도는 예비 시험에서 전신독성과 과도한 국소피부자극성이 보이지 않는 최고농도로 설정한다.

6.2.5 본 시험

(1) 시험 1일차 : 각 동물의 개체를 식별하고, 체중을 기록한다. 붓을 이용해 1% 소디움라우릴설페이트(Sodium lauryl sulfate, SLS)용액을 마우스 귀의 뒷면에 고르게 도포한다. 이후 적절한 시험농도로 희석한 시험물질 25 ㎕를 귀의 뒷면에 도포한다. 용매대조군(음성대조물질) 및 양성대조군도 시험물질과 같은 방식으로 도포한다.

(2) 시험 2 ~ 3일차 및 7일차 : 첫날 시험을 반복한다.

(3) 시험 4 ~ 6일차에는 도포하지 않는다.

(4) 시험 8일차 : 동물의 체중 및 임상관찰결과를 기록하고, 7일차에 시험물질을 처리한 후 약 24 ~ 30 시간 후 후 마우스를 희생시켜 양쪽 귀의 림프절을 채취하고 각각을 인산완충생리식염수에 처리한다.

(5) 세포 현탁액의 준비 : 두 개의 유리슬라이드 사이에 한쪽 림프절을 끼운 후 림프절이 부서질 정도의 압력을 가한다. 조직이 분쇄되어 양쪽 슬라이드에 퍼진 것을 확인 후 각 슬라이드에 붙은 조직세포를 최대 1 mL의 PBS로 세척하여 현탁시킨다. 페트리디시에 세포세척액을 모아 20 uL을 먼저 취하고 다시 PBS 1.98 mL을 섞어 총 2 mL의 시료를 만든다. 다른쪽 림프절에서도 동일한 방식의 세포 현탁액을 만들어 한 개체로부터 2개의 시료를 준비한다.

(6) 세포 증식능 확인(림프구의 ATP 함량 측정) : 림프절의 ATP 함량은 루시페린/루시퍼라제 활성 원리에 따라 제작된 ATP 측정키트를 사용하여 측정하고 단위는 상대발광단위(Relative luminescence units, RLU)를 사용한다. 각 동물의 안락사 이후 ATP 측정 시간에 걸리는 시간은 일정해야 하며 ATP 측정은 사망 후 약 30분 이내에 실시하도록 한다. ATP 측정은 한 개체에서 생산된 2개의 시료에 대해 각각 실시하여 평균값을 결정한다.

(7) 동물의 관찰 : 임상관찰은 적용부위에서의 국소자극, 전신독성 등 독성증상을 하루에 한번 주의 깊게 관찰하여 개체별로 기록한다.

6.3 시험 결과 및 보고

6.3.1 결과의 표시

(1) 결과는 감작성지수로 나타낸다. 감작성지수는 투여군 또는 양성대조군의 평균 RLU 값을 용매대조군의 평균 RLU 값으로 나눈 값으로 용매대조군의 평균 감작성지수 값은 1이다.

(2) 감작성지수 값이 1.8 이상일 때 해당 시험물질은 양성으로 판정한다. 그러나 경계값(감작성지수 값이 1.8 ~ 2.5)인 경우 용량-반응 관계, 전신독성 또는 심각한 자극성, 통계적 유의성 등의 추가적 정보를 고려해 판단한다.

(3) 각 단계에서 관찰된 동물의 피부 반응 결과는 표로 정리한다.

6.3.2 시험결과 및 보고

시험보고서에는 다음과 같은 정보를 포함하여야 한다.

(1) 시험물질

(가) 일반정보(CAS 번호, 시험물질 입수처, 순도, 불순물 함유여부, 로트 번호 등)

(나) 물리적 성상, 물리화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도)

(다) 다조성물질, UVCBs 및 혼합물인 경우 : 성분의 화학적 동일성, 정량적 발생 및 관련된 물리화학적 특성에 대한 최대 정보

(라) 대조군 (CAS 번호, 출처, 순도, 불순물 정보, 로트 번호, 물리화학적 특성 등

(마) 용매 (순도, 농도, 사용된 부피, 용매선택 이유)

(2) 실험동물

(가) 사용된 마우스의 종(출처)

(나) 동물 수, 주령, 성별

(다) 동물 입수처, 사육 조건, 사료 등

(3) 시험조건

(가) 투여농도 선택사유 및 근거

(나) 시험물질 조제 및 투여 세부사항, 실제 투여량 환산 정보

(다) 식이 및 음수에 대한 상세정보 (사료의 형태, 제조회사, 음수원)

(라) 독성 평가 방법 및 양성/음성 판정 기준

(마) ATP 키트 정보(출처, 로트 번호, 제조사 품질보증 자료)

(4) 신뢰성 점검

(가) 시험물질, 농도, 용매 정보를 포함한 최근 신뢰성 점검 자료

(나) 시험기관에서 축적된 양성대조군과 음성대조군 자료

(5) 결과

(가) 시험 시작 및 종료 시 동물의 체중, 평균 체중 및 편차

(나) 각 동물에 대해 투여 부위 피부자극성을 포함한 독성 정보(발현 시점 및 경과)

(다) 각 동물에 대한 부검시간과 ATP 측정시간

(라) 동물 개체별 RLU 값 및 각 투여군에 대한 감작성지수 값(표)

(마) 각 군의 RLU 값에 대한 평균 및 편차값과 개체처리방식 결과에서 이상치 분석 결과

(바) 용량-반응관계

(사) 통계학적 분석 방법

(6) 토의

(가) 시험결과, 용량-반응분석, 통계분석에 대한 토의

(나) 시험물질의 피부감작성 여부에 대한 결론

기술지원규정 개정 이력

□ 개정일 : 2025. 2. 3.

○ 개정자 : 안전보건공단 산업안전보건연구원 흡입독성연구센터

○ 개정사유 : 법령 개정에 따른 현행화 및 시험법 내용 추가

- 산업안전보건법 전부개정에 따른 내용 반영
- 건강유해성 분류(피부과민성)를 위한 피부감작성 시험법인 국소림프절 시험 내용 일부 수정 및 변형 시험법에 대한 사항 추가

○ 주요 개정내용

- “4.2 시험 방법“ 항목에서 예비 시험 및 홍반점수표 내용 추가
- ”5. 국소림프절시험(LLNA:BrdU-ELISA, FCM)” 변형 시험법 내용 추가
- ”6. 국소림프절시험(LLNA:DA)” 변형 시험법 내용 추가

□ 재공표 : 2025. 3. 26.

○ 기술지원규정 영문 명칭 복원(KSH-GUIDANCE→KOSHA GUIDE)으로 재공표

KOSHA GUIDE
기술지원규정

·규정번호 : E-T-3-2025
·심　　의 : 산업안전보건표준제정위원회
·공 표 일 : 2025. 3. 26.