

Balb/c 마우스에서 Local Lymph Node Assay(LLNA)를 이용한 피부 감작성 시험 대체시험법 연구

이중권* · 황인창 · 박재현 · 김형수 · 정승태 · 엄준호 · 오혜영
식품의약품안전청 국립독성연구원 면역독성과

Evaluation of Local Lymph Node Assay as an Alternative Method for Skin Sensitization Potential in Balb/c Mice

Jong Kwon Lee*, In Chang Hwang, Jae Hyun Park, Hyung Soo Kim,
Seung Tae Jung, Juno H. Eom and Hye Young Oh

Division of Immunotoxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and
Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul, 122-704, Korea

(Received April 22, 2002)

(Accepted May 28, 2002)

ABSTRACT : Allergic contact dermatitis (skin sensitization) may be caused by a wide variety of chemicals. A murine local lymph node assay (LLNA) has been developed as an alternative to guinea pig models for assessing the contact sensitization potential of chemical. This study was carried out to evaluate the skin sensitization potential for chemicals in Balb/c mice by LLNA. Contact allergen, dinitrochlorobenzene (DNCB), respiratory allergen, toluene diisocyanate (TDI) and a weak allergen, α -hexylcinnamaldehyde (HCA) were used as positive chemicals and irritant, sodium lauryl sulfate(SLS) also used as a reference chemical in this study. The weights of lymph node in the mice treated with DNCB, TDI, and HCA were increased compared to vehicle control. There was a significant increase in lymph node weight of mice treated with high concentration of SLS compared to vehicle control. The stimulation index (SI) of lymph node cell in the mice treated with DNCB, TDI, and HCA revealed over three-fold increase compared to vehicle control by ^3H -thymidine uptake. All allergens correctly identified in this LLNA study using Balb/c mice. These results suggest that LLNA using Balb/c mice could be a useful method for screening the allergenic potential of chemicals. The expression of IL-2 mRNA was slightly increased in draining auricular lymph node cell of the mice treated with TDI and HCA by RT-PCR. However, the IL-2 levels in DNCB and SLS of treated animals were not significantly changed.

Key Words : LLNA, ^3H -thymidine, SI, IL-2, DNCB, TDI, HCA, SLS

I. 서 론

피부에 감작을 일으키는 알레르기성 접촉 피부염은 우리 일상생활에서 쓰는 화장품, 의약품등 다양한 화학물질에 의해 유도될 수 있다. 화학물질이 피부 감작성을 일으킬 수 있는지에 대한 시험은 기니픽을 사용한 동물모델이 이용되어 왔다(Botham 등, 1991). 그 중에서도 면역보조제를 이용하는 GPMT(The Guinea Pig Maximization Test) 시험과 면역보조제를 사용하지 않는 Buehler 시험이 가장 보편적으로 사용되고 있다(Buehler, 1965; Magnusson과

Kligman, 1969). 최근 화장품 업계를 중심으로 신원료의 안전성평가지험에 동물실험 사용을 금지시키려는 움직임과 동물실험의 대체(replacement), 실험규모 및 실험기간의 단축(reduction), 실험방법의 증진(refinement)이라는 소위 '3Rs' 운동이 전세계적으로 펼쳐지고 있다(EC, 1999). 이러한 흐름을 타고 화학물질의 피부감작성 시험평가지니픽을 사용한 시험은 되도록 지양되고, 동물수를 줄이려는 대체시험법의 요구가 높아지면서 마우스를 이용한 local lymph node assay 방법(LLNA)과 mouse ear swelling test(MEST) 시험방법이 최근 소개되고 있다(Gad 등, 1986; Basketter와 Sholes, 1992; Basketter 등, 1996; Kimber 등, 2001). 이 중에서 LLNA 방법이 현재 GPMT

*To whom correspondence should be addressed

시험의 대체가능성이 있는 시험방법으로 평가되고 있다 (Kimber와 Basketter, 1992; Kimber 등, 1994; Kimber 등, 1999; Basketter 등, 2000).

LLNA는 화학물질을 CBA/J 마우스 귀에 도포하고 이개 림프절(auricular lymph node)에서의 증식반응을 ^3H -thymidine uptake으로 평가하는 방법으로 1986년 Kimber 등에 의해 소개된 이래, 여러 시험자에 의해 이 방법이 연구되고 있다(Basketter와 Scholes, 1992; Kimber 등, 1995; Loveless 등, 1996; Kimber 등, 1999). 지금까지의 표준적인 LLNA 시험은 CBA/J 마우스를 사용하여 왔으나, Woolhiser 등(2000)이 CBA/J 마우스와 비교하였을 때, DBA2, B6C3F1 등의 마우스도 이용 가능하다고 보고하였다. LLNA 방법은 GPMT 시험에 비해 경제적이고 시간이 짧게 소요되는 장점을 갖고 있으나, 강한 자극성 물질을 도포하였을 때 알러젠과 유사한 반응이 나타난다는 보고도 있다(Basketter 등, 1998; Gerberick 등, 1999). 이러한 단점을 보완하고자 최근의 연구자들은 좀더 유용한 생체지표를 찾는 노력을 기울이고 있으며, 그 방법중의 하나가 면역장에서 분비하는 cytokine의 변화를 이용한 방법으로 시도하고 있다(Dearman과 Kimber, 1999; Manetz 등, 2001). Haryia 등(1999)은 citral, eugenol, HCA, MBT(2-mercaptobenzothiazole) 등을 도포한 후 이개 림프절에서의 세포를 분리한 후 48시간, 72시간 배양하였을 때 interleukin-2(IL-2)가 증가하므로 이를 사용하여 알러젠 유무를 알 수 있는 지표로 이용 가능하다고 하였다.

따라서 본 연구는 접촉성 알러젠으로 대표적인 DNCB, 호흡 알러젠인 TDI(toluenediisocyanate), 약한 알러젠인 HCA(α -hexylcinamaldehyde), 그리고 강한 자극성물질인 SLS(sodium lauryl sulfate)를 이용하여 Balb/c를 사용한 LLNA 시험 평가를 실시하고자 하였으며, IL-2의 mRNA 양을 측정하여 알러젠과 자극제를 구분할 수 있는지 파악하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 암컷 Balb/c 마우스를 식품의약품안전청 국립독성연구원으로부터 공급받아 1주일간 순화기간을 둔 후 6-8주령의 건강한 동물을 선택하여 사용하였다. 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$, 12시간 명암주기의 사육조건을 유지시켰으며, 동물은 케이지당 4마리를 수용하였다. 동물은 AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) 기준에 맞게 관리하였다.

2. 시험물질

접촉성 알러젠으로 DNCB(Sigma Chemical Co., USA)을, 호흡 알러젠으로 TDI(Aldrich, USA)를, 약한 알러젠으로 HCA(Aldrich, USA)를, 그리고 강한 자극물질로 SLS(Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다. 용매로는 예비실험을 통해서 DNCB, TDI 및 HCA에 대해서는 acetone과 olive oil를 4:1로 섞은 AOO(4:1 acetone/olive oil)를 사용하였고, SLS는 30% ethanol을 사용하였다. 방사선 표지물질로는 [^3H]-methylthymidine($^3\text{HTdR}$: 2Ci/mmol, Amersham, USA)를 사용하였으며, 기타 시약은 등급을 사용하였다.

3. 실험 방법

1) 시험물질의 투여

LLNA시험은 Kimber 등(1994)의 방법으로 다음과 같이 실시하였다. 시험물질을 각 농도별로 25 μCi 마우스 양쪽 귀 배측에 조금씩 분할도포 하여 시험물질이 정량적으로 흡수되도록 하였으며, 군당 4마리씩 1일 1회 3일 동안 연속해서 도포하여 감작시켰다. 최종 도포 2일후에 부검하여 림프절의 중량을 측정하고 림프절을 분리하여 사용하였다.

2) ^3H -thymidine uptake assay

부검일에 ^3H -thymidine(80 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) 250 μl 를 마우스 미정맥에 투여하고 마우스를 이산화탄소로 안락사 시킨 후 부검하여 이개 림프절의 세포를 분리하여 실험에 사용하였다. 군당 좌·우의 림프절을 모아 멸균된 스테인레스 메쉬를 이용해 세포를 분리하여 5% trichloroacetic acid에 넣어 냉장보관 하였다. 12시간 후에 scintillation cocktail 용액을 섞어 β -scintillation counter(MicroBeta TriLux, PerkinElmer, Finland)를 사용하여 예비실험을 거쳐 calibration한 후 DPM(disintegrations per minute)을 측정하였다.

3) RNA 추출 및 cDNA 합성

분리된 림프절 세포로부터 RNA는 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, USA)를 사용하여 분리하였다. 분리된 RNA를 1% agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하여 28S rRNA와 18S rRNA 띠를 확인하고 RNA시료는 -70°C 극저온 냉장고에서 보관하여 사용하였다.

cDNA를 합성하기 위하여 5 mM MgCl_2 와 PCR buffer를 잘 혼합하여 90°C 에서 10분간 처리한 후, 10 mM dNTP, oligo dT primer, RNA inhibitor, reverse transcriptase (Takara, Japan) 및 RNase free water를 가하고 RNA 1 μg 해당량의 시료와 함께 30°C 에서 5분간, 42°C 에서 60분간

역전사 반응을 시키고, 95°C에서 5분간 가열하여 반응을 종결 후 4°C에 보관하여 사용하였다.

4) RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

IL-2 mRNA level을 측정하기 위하여 다음과 같이 역전사 반응에서 제조된 cDNA를 모형(template)으로 하여 증폭반응에 사용하였다. 사용된 primer는 다음과 같다. IL-2 : 5' TGC TCC TTG TCA ACA GCG, 3' TCA TCA TCG AAT TGG CAC TC (391 bp), GAPDH : 5' TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA G, 3' TCT TAC TCC TTG GAG GCC ATG T (560 bp). 5'-primer에 0.2 μmol/ml, 3'-primer에 0.2 μmol/ml를 넣어 잘 혼합하고, 85°C에서 5분간 처리 PCR mix preparation을 만들어 사용하였다. Taq DNA polymerase, cDNA를 넣고 Thermal cycler(GeneAmp PCR system 2400, Perkin-Elmer, USA)에서 증폭하였다. 증폭과정은 94°C 부근에서 5분간, 이후 94°C 부근에서 30초간 처리하여 수소 결합을 해리하고(denaturation), 58°C 부근에서 45초간 처리하여 primer을 결합시키고(annealing), 72°C 부근에서 2분간 DNA을 합성하는 과정을 적절히 하여 유전자 증폭하였다. 증폭이 끝난 후 72°C에서 10분간 final incubation 한 후 반응을 종결하였다. PCR 반응 산물을 2% agarose gel에서 5 μl PCR 산물과 loading dye(1 μl)를 섞은 후 loading하여 120 V에서 25분간 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색해서 transilluminator 위에서 관찰하고 사진 촬영하여 분석하였다.

Table 1. The change of body weight in mice treated with DNCB, TDI, HCA and SLS

Group	Body Weight (g)		Percent change of B.W.
	day 0	day 5 ^{a)}	
AOO	17.1±1.0	17.3±1.1	101.0±1.2
0.25% DNCB in AOO	17.7±0.6	18.4±0.7	101.3±1.4
0.5% DNCB in AOO	17.6±0.3	17.9±0.4	104.1±1.7
1.0% DNCB in AOO	18.2±0.5	18.3±0.3	101.7±2.0
AOO	22.2±0.7	22.9±0.9	102.9±2.2
0.5% TDI in AOO	21.9±1.0	22.5±1.6	103.0±3.0
1.0% TDI in AOO	21.4±1.6	22.5±1.8	105.2±1.5
2.0% TDI in AOO	22.1±2.0	22.7±1.8	102.6±2.8
AOO	22.2±0.7	22.9±0.9	102.9±2.2
10% HCA in AOO	22.7±0.9	23.4±1.1	103.1±1.8
20% HCA in AOO	21.2±0.7	22.0±0.5	103.8±2.0
30% HCA in AOO	21.6±1.0	22.6±0.8	104.5±4.6
EtOH	16.8±0.8	17.5±0.5	101.3±1.4
5% SLS in EtOH	17.2±1.4	17.8±1.3	104.1±1.7
10% SLS in EtOH	17.3±1.08	17.9±0.6	101.7±2.0
25% SLS in EtOH	16.7±0.9	17.3±0.4	101.0±1.2

^{a)}Day 5 means the day at necropsy. Data represents mean±S.D. of four animals. BW represents mean body weight. AOO and EtOH represents 4 : 1 acetone/olive oil and 30% ethanol, respectively.

4. 통계처리

본 실험에 대한 자료의 분석은 통계처리 프로그램인 Sigma stat(Version 2.03, USA)를 사용하여 유의수준 α = 0.05 이하로 하고 분산분석(analysis of variance)을 실시한 후에 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였다(Gad와 Weil, 1994).

III. 결 과

1. 체중 및 장기중량의 변화

강한 알러젠 물질인 DNCB군과 TDI군, 약한 알러젠인 HCA군 및 강한 자극물질인 SLS투여군의 체중증감은 각각의 용매대조군에 비해 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Table 1).

접촉 알러젠인 DNCB군에서의 림프절 중량은 대조군인

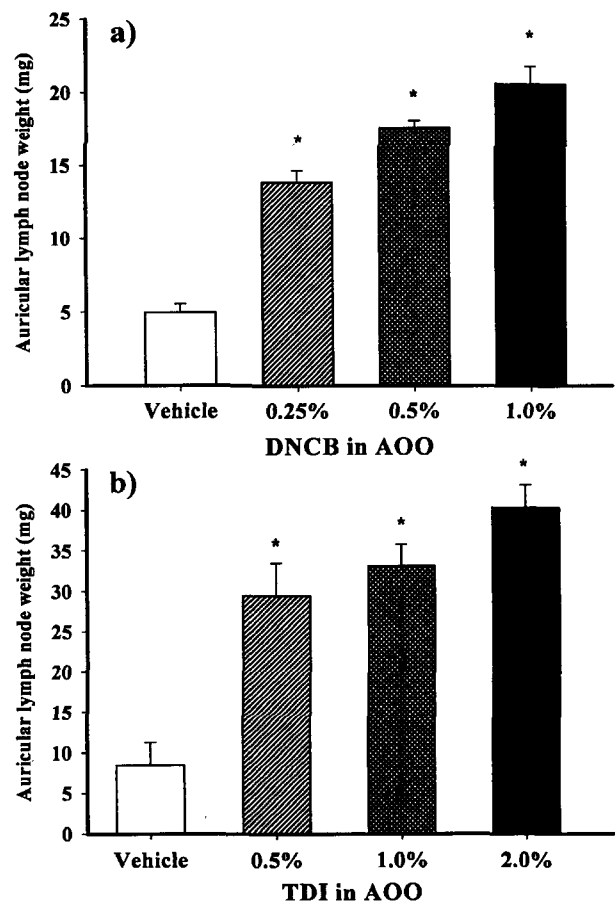


Fig. 1. The mean weights of auricular lymph nodes in Balb/c mice treated by DNCB (a) and TDI (b) on both ears for 3 consecutive days. Each value represents mean±SD of four animals. * Significantly different from vehicle control (p < 0.05).

AOO군에 비해 농도 의존적으로 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 림프절의 상대중량은 대조군, 0.25% DNCB, 0.5% DNCB, 1.0% DNCB에서 각각 0.29, 0.75, 0.99, 1.12 g/kg으로 나타나 대조군에 비해 농도별로 2.6, 3.4, 3.9배가 증가하였다. 또한 흡입알러젠인 TDI군에서도 대조군에 비해 림프절의 중량의 유의성 있는 변화가 있었으며, 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 1). 림프절의 상대중량은 대조군, 0.5% TDI, 1.0% TDI, 2.0% TDI에서 각각 0.37, 1.31, 1.60, 1.79 g/kg으로 관찰되어 대조군에 비해 농도별로 각각 3.6, 4.4, 4.9배가 증가하였다. 약한 알러젠인 HCA에서 림프절의 중량이 대조군에 비해 증가됨이 관찰되었다(Fig. 2). 림프절의 상대중량은 대조군, 10% HCA, 20% HCA, 30% HCA에서 각각 0.37, 0.61, 0.77, 0.77 g/kg으로 관찰되어 대조군에 비해 1.7, 2.1, 2.1배가 증가되었다. 그러나 강한 자극물질인 SLS군에서는 저농도, 중농도에서 림프절의 유의성 있는 중량 변화는 관찰할 수 없었지만, 고농도에서는 유의성 있는 림프절 중량증가가

관찰되었다(Fig. 2). 림프절의 상대중량에서도 대조군, 5% SLS, 10% SLS, 20% SLS군에서 각각 0.25, 0.32, 0.31, 0.44 g/kg으로 관찰되어 대조군에 비해 각각 1.3, 1.2, 1.7배가 증가하였다.

2. ³H-thymidine uptake에 의한 림프절에서의 증식능 변화

각 시험물질 투여군에서 림프절의 증식이 유도되어 산출된 DPM 값을 용제를 투여한 대조군의 DPM 값으로 나누어서 SI(stimulation index)를 구하였으며, 화학물질의 감작성(접촉 알레르기 유발성)은 Kimber 등(1998)의 보고에 따라 SI가 3 이상인 것을 양성으로 평가하였다. DNCB의 대조군인 AOO 투여군에서 림프절의 평균 DPM 값이 101.6±40.2으로 측정되었으며, 0.25% DNCB 투여군의 DPM 값은 2,065.3±574.6으로 나타나 약 20배가 증가한 것으로 관찰되었으며, 0.5%, 1.0%에서 각각 24.6, 27.5으로 나타나, 용량 의존적으로 SI가 증가한 것으로 관찰되었다(Table 2).

또한 흡입 알러젠인 TDI 군에서도 AOO 투여군에서 림프절의 평균 DPM 값이 61.5±16.8로 측정되었으며, 0.5% TDI 투여군의 DPM 값은 1,169.4±745.9로 나타나 약 19

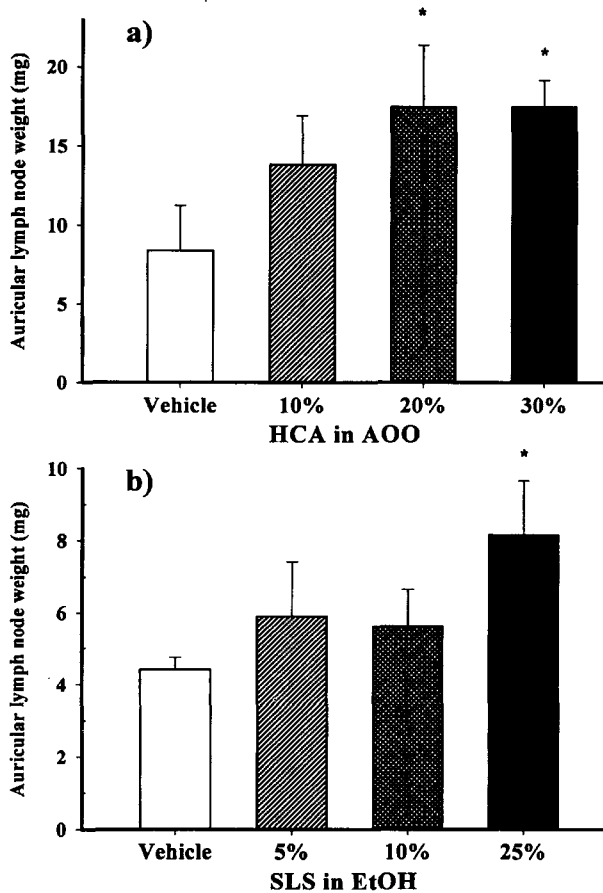


Fig. 2. The mean weights of auricular lymph nodes in Balb/c mice treated by HCA (a) and SLS (b) on both ears for 3 consecutive days. Each value represents mean±SD of four animals. * Significantly different from vehicle control (p < 0.05).

Table 2. Local lymph node assay (LLNA) response and stimulation indices following incorporation of [³H]-methyl thymidine in draining auricular lymph nodes exposed to DNCB

Group	DPM	SI
AOO	101.6±40.2	
0.25% DNCB	2,065.3±574.6*	20.3
0.5% DNCB	2,504.1±312.9*	24.6
1.0% DNCB	2,797.7±562.5*	27.5
AOO	61.5±16.8	
0.5% TDI	1,169.4±745.9*	19.0
1.0% TDI	2,296.9±885.5*	37.3
2.0% TDI	2,601.5±1066.6*	42.3
AOO	61.5±16.8	
10% HCA	233.1±46.1	3.8
20% HCA	571.3±137.0*	9.3
30% HCA	1,216.3±294.8*	19.8
EtOH	64.1±13.0	
5% SLS	51.8±36.1	0.8
10% SLS	106.8±15.1	1.7
25% SLS	421.4±226.6*	6.6

Data are expressed as group means±standard deviation, n = 4 mice/group.

DPM represents disintegrations per minute/2 nodes.

Stimulation indices were determined by dividing the mean DPM response towards DNCB, TDI, HCA, and SLS by the mean DPM response following AOO application.

AOO and EtOH represents 4 : 1 v/v Acetone/Olive oil, and 30% EtOH respectively.

* : significantly different from vehicle control (p < 0.05).

배가 증가한 것으로 관찰되었으며, 1.0%, 2.0%에서 각각 29.7, 42.3으로 나타나, 용량 의존적으로 SI가 증가한 것으로 관찰되었다(Table 2). 약한 감작성 물질인 HCA에서는 대조군에 비해 용량 의존적으로 DPM 값의 상승이 관찰되었으며, 10% HCA의 농도에서도 SI값이 3.8로 나타나 양성으로 관찰되었으며, 20, 30%의 농도에서 각각 9.3, 19.8로 나타나 용량 의존적으로 증가됨을 관찰할 수 있었다(Table 2).

강한 자극성 물질인 SLS는 5%나 10%에서 용제 대조군인 에탄올 투여군과 비교해서 DPM 값이 용량 의존적으로 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 다만, 25% SLS 투여군에서는 대조군에 비교하여 SI가 6.6으로 산출되고 통계적으로도 유의성 있게 증가함을 나타내었다.

이상의 결과 알러젠 물질인 DNCB, TDI, HCA 처치군에서 SI 값이 감작성 유발물질의 기준인 3 이상을 나타내어 모두 감작성을 유발하는 양성반응이 나왔다. 그러나, 고농도의 SLS군에서는 위양성 반응이 나타남을 관찰하였다.

3. IL-2 mRNA expression

IL-2 mRNA의 양은 DNCB 투여군에서는 큰 변화는 없었으나, TDI 투여군에서는 약간의 증가하였으며, 20%

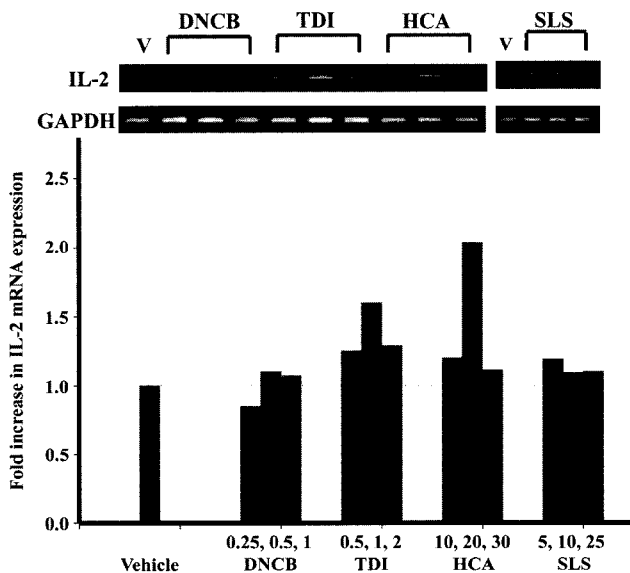


Fig. 3. Semiquantitative analysis of IL-2 mRNA expression in lymph nodes of mice (n = 4) treated with allergen DNCB (0.25, 0.5, and 1%), TDI (0.5, 1, and 2%), HCA (10, 20, and 30%) and irritant SLS (5, 10, and 25%). Signal strength was assessed by densitometric scanning of the digital pictures following RT-PCR and each cytokine data was standardized to their respective GAPDH controls. Dotted line represents zero change in cytokine expression, compared to vehicle (AOO and 30% EtOH) control. V means vehicle.

HCA 투여군에서 증가하였다(Fig. 3). 자극제인 SLS 투여군에서는 대조군인 에탄올 처치군에 비해 큰 변화가 없었다.

IV. 고 찰

본 연구는 화학물질에 의한 피부감작성 평가를 기존의 기니픽 모델을 대체하기 위한 방법으로 Balb/c 마우스의 림프절 증식반응을 평가를 시도하였다. 시험물질로는 대표적인 접촉알러젠인 DNCB, 흡입알러젠인 TDI를 사용하였으며, 미약한 알러젠에서도 피부감작성 유발을 파악할 수 있도록 HCA를 선정하였고, 강한 자극제에서의 반응을 평가하기 위하여 SLS에 대한 평가도 실시하였다. 본 연구결과 Balb/c 마우스에서 강한 알러젠인 DNCB, TDI의 전 농도에서 증식지수인 SI가 3 이상으로 관찰되어 모두 양성으로 관찰되었으며, 약한 알러젠인 HCA에서도 저농도, 중농도와 고농도 모두 양성으로 나타났다.

현재까지의 Kimber 등(2001)과 Basketter 등(2000)에 의한 LLNA방법은 CBA/J나 CBA/Ca 마우스를 이용하여 림프절에서의 증식반응을 ^3H -thymidine uptake assay로 측정하여 SI가 3 이상인 것을 양성으로 판정하는 것으로 되어있으며, 미국 ICCVAM(Interagency Coordinating on the Validation of Alternative Methods)에서 마우스 종은 CBA/J나 CBA/Ca를 이용하라고 권고하고 있다(Dean 등, 2001). 그러나 Woolhiser 등(2000)은 5%, 25%, 50% HCA, 1% TDI에 대하여 DBA/2, CBA, Balb/c, C57BL/6, B6C3F1, SJL 마우스에서의 반응을 비교하였을 때 CBA 마우스가 다른 마우스 보다 반응이 뛰어나지 않았으며, SJL, DBA/2, Balb/c 마우스도 반응이 좋았다고 보고하였다. 본 실험은 접촉알러젠, 흡입알러젠, 약한 알러젠 등에 대하여 Balb/c 마우스에서의 반응을 평가한 바, 알러젠에 대하여 림프절 증식반응이 현저하였으며, 이는 Kimber 등(1994)과 Loveless 등(1996)의 CBA 마우스에서의 연구결과와 일치하므로, 비록 본 실험에서 CBA 마우스와 직접비교하지 못했지만 Balb/c 마우스 이용이 가능함을 보여주었다. 한편 강한 자극제인 SLS는 저, 중농도에서는 음성으로 관찰되었지만, 고농도에서는 SI가 3 이상으로 나타나 강한 자극물에 대해서는 LLNA시험시 ^3H -thymidine uptake 방법으로는 위양성 반응이 나타남을 알 수 있었다(Table 2). 이 결과는 SLS를 투여하였을 때 양성으로 나타난 Basketter 등(1996)과 Kimber 등(1995)의 보고와 일치하였다. 따라서 이러한 결과들은 방사선을 이용한 LLNA 시험은 피부감작성 유발물질을 평가하는 좋은 방법이라는 하나, 강한 자극물에 대한 도포시에도 양성으로 판정된다는 점이 있음을 확인시켜 주었다.

화학물질에 대한 피부감작성 즉, 알레르기성 접촉 피부

염은 과민반응(hypersensitivity) 중 제4형인 지연형 과민 반응으로 T 세포 매개성 면역반응으로 알려지고 있으며, 이를 검색하는 방법으로, 면역보조제를 사용하는 GPMT 방법과 면역보조제를 사용하지 않는 Buehler test가 가장 일반적인 동물실험모델로 소개되고 있다(Magnusson와 Kligman, 1969; Basketter 등, 1996). 이러한 기니픽 모델 대체시험법으로 MEST 시험과 LLNA 시험이 연구되고 있으며(Basketter 등, 2000; Kimber 등, 2001), 이러한 피부 감각 반응은 T 세포를 경유하기 때문에 생체에서의 cytokine 변화를 이용한 생체지표가 최근 연구되고 있다(Dearman 등, 1996; Dearman 등, 1999; Vandebriel 등, 2000; Manetz 등, 2001). Haryia 등(1999)은 LLNA 시험에서 강한 자극물에 대하여 위양성 반응이 나타나는 것을 IL-2를 이용한 생체지표의 이용가능성에 대하여 보고하였다. 그들은 citral, eugenol, HCA, MBT(2-mercaptobenzothiazole) 등을 도포한 후 이개 림프절에서의 세포를 분리한 후 48시간, 72시간 배양하였을때 interleukin-2(IL-2)가 증가하므로 이를 이용하여 알러젠 유무를 알 수 있는 지표로 이용 가능하다고 하였다. 그러나, 본 실험에서는 호흡 알러젠인 TDI나 약한 알러젠인 HCA에서 대조군보다 IL-2 mRNA 양이 약간 증가하는 것으로 관찰되었으나, 강한 알러젠인 DNCB와 SLS에서 별 변화가 없어 IL-2 mRNA양의 측정이 알러젠과 자극물을 구별할 수 없었다. 본 연구는 화학물질에 의한 피부감작성 평가를 기존의 기니픽 모델을 대체하기 위한 방법으로 Balb/c 마우스를 이용한 LLNA 시험이 가능함을 보여주었다. 앞으로 이에 대한 validation 연구가 필요하며, 자극물질과 알러젠을 정확히 구별할 수 있는 생체지표 탐구 및 비방사선법을 이용한 LLNA 시험법 연구 등이 추가적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Basketter, D.A. and Scholes, E.W. (1992): Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 65-69.
- Basketter, D.A., Blaikie, L., Dearman, R.J., Kimber, I., Ryan, C.A., Gerberick, G.F., Harvey, P., Evans, P., White, I.R. and Rycroft, R.J.G. (2000): Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis*, **42**, 344-348.
- Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998): Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 327-333.
- 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 sensitization tests. *Food Chem. Toxicol.*, **34**, 985-997.
- Botham, P.A., Basketter, D.A., Maurer, T., Mueller, D., Potokar, M. and Bontinck, W. (1991): Skin sensitization- a critical review of predictive test methods in animals and man. *Food Chem. Toxicol.*, **29**, 275-286.
- Buehler, E.V. (1965): Delayed contact hypersensitivity in guinea pig. *Arch. Dermatol.*, **91**, 171-177.
- Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G. and Stokes W.S. (2001): ICCVAM Evaluation of the murine local lymph node assay. II. Conclusions and Recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, **34**, 258-273.
- Dearman, R.J. and Kimber, I. (1999): Cytokine fingerprinting: Characterization of chemical allergens. *Methods*, **19**, 56-63.
- Dearman, R.J., Smith, S., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1996): Classification of chemical allergens according to cytokine secretion profiles of murine lymph node cells. *J. Applied Toxicol.*, **17**, 53-62.
- EC (European Communities) (1999): Council Directive 76/778/EEC in *CosmetLex Vol. 1. Cosmetics legislation*, pp. 1-68.
- Gad, S.C. and Weil, G.S. (1994): Statistics for toxicologists in *Principles and Methods of Toxicology* (Hayes, A.W ed.). Raven, New York, pp. 221-274.
- Gad, S.C., Dunn, B.J., Dobbs, D.W., Christopher, R. and Walsh, R.D. (1986): Development and validation of an alternative dermal sensitization test: The mouse ear swelling test (MEST). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84**, 93-114.
- Gerberick, G.F., Cruse, L.W. and Ryan, C.A. (1999): Local lymph node assay: Differentiating allergic and irritant responses using flowcytometry. *Methods*, **19**, 48-55.
- Haryia, T., Hatao, M. and Ichikawa, H. (1999): Development of a non-radioactive endpoint in a modified local lymph node assay. *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 87-93.
- Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992): The murine local lymph node a commentary an collaborative studies and new directions. *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 165-169.
- Kimber, I., Basketter, D.A., Bethold, K., Butler, M., Garrigue, J.L., Lea, L., Newsome, C., Roggeband, R., Steiling, W., Stropp, G., Waterman, S. and Wiemann, C. (2001): Skin sensitization testing in potency and risk assessment. *Toxicol. Sci.*, **59**, 198-208.
- Kimber, I., Dearman, R.J., Schole, E.W. and Basketter, D.A. (1994): The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, **93**, 13-31.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Baskette, D.A., Edward, W.S. and Robert, V.H. (1995): An international evaluation of the murine

- local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology*, **103**, 63-73.
- Kimber, I., Pichowski, J.S., Basketter, D.A. and Dearman, R.J. (1999): Immune responses to contact allergens novel approaches to hazard evaluation. *Toxicol. Lett.*, **106**, 237-246.
- Loveless, S.E., Gregory, S.L., Gerberick, G.F. and Ryan, C.A. (1996): Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology*, **108**, 141-151.
- Magnusson, B. and Kligman, A.M. (1969): The identification of contact allergen by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.*, **52**, 268-276.
- Manetz, T.S., Pettit, D.A. and Meade, B.J. (2001): The determination of draining lymph node cell cytokine mRNA levels in BALB/c mice following dermal sodium lauryl sulfate, dinitrofluorobenzene and toluene diisocyanate exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **171**, 174-183.
- Vandebriel, R.H., De Jong, W.H., Spiekstra, S.W., Mariskam, V.D., Angelique, F. and Gassen, J. (2000): Assessment of preferential T-Helper 1 or T-Helper 2 induction by low molecular weight compounds using the local lymph node assay in conjunction with RT-PCR and ELISA for Interferon- γ and Interleukin-4. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **162**, 77-85.
- Woolhiser, M.R., Munson, A.E. and Meade, B.J. (2000): Comparison of mouse strains using the local lymph node assay. *Toxicology*, **146**, 221-227.