



BrdU ELISA를 이용한 국소 림프절 시험법의 비방사선법 연구

이종권 · 박재현 · 박승희 · 김형수 · 정승태 · 엄준호 · 윤소미 · 장은정 · 최광식 · 오혜영

식품의약품안전청 국립독성연구원 특수독성부

A Non-radioisotopic Endpoint Using Bromodeoxyuridine ELISA Method for Murine Local Lymph Node Assay

Jong Kwon Lee, Jae Hyun Park, Seung Hee Park, Hyung Soo Kim, Seung Tae Chung, Juno H. Eom, So Mi Yun, Eun Jung Jang, Kwang Sik Choi and Hye Young Oh

Department of Specialized Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul, 122-704, Korea

Received April 25, 2003; Accepted May 21, 2003

ABSTRACT. Allergic contact dermatitis 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. However, there is a need to develop a non-radioisotopic endpoint for the LLNA, because of the radioisotopic method's requiring the use of special facilities. In this study, we investigated the development of a non-radioisotopic endpoint for LLNA using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Female Balb/c mice were treated by the topical application on the dorsum of both ears with four different strong sensitizers, 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), oxazolone (OXZ), toluene diisocyanate (TDI), and trimellitic anhydride (TMA), and a strong irritant, sodium lauryl sulfate (SLS), once daily for three consecutive days. The proliferation of cells in the auricular lymph node was analyzed by means of the labelling index (LI) of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation into cells. The weights of the lymph nodes in the mice treated with allergens, DNCB, OXZ, TDI and TMA were increased compared to the vehicle control. The stimulation index (SI) of mice treated with DNCB, OXZ, TDI, and TMA was over three-fold increase compared to the vehicle control. However, the SI of mice exposed to SLS was not significantly increased compared to the vehicle control, while the lymph node weight of SLS was significantly increased. These results suggest that the LLNA modified endpoint using ELISA based on BrdU incorporation could provide a useful method of screening for irritants and allergens.

Keywords: Local lymph node assay, BrdU, ELISA, 2,4-Dinitrochlorobenzene, Toluene diisocyanate, Sodium lauryl sulfate.

서 론

피부에 감작을 일으키는 알레르기성 접촉 피부염은 우리 일상생활에서 쓰는 화장품, 의약품 등 다양한 화학물질에 의해 유도될 수 있으며, 지연형 과민반응(delayed

type hypersensitivity)으로 나타난다(Kimber 등, 2001; Basketter 등, 2002). 화학물질에 대한 피부 감작성시험은 전통적으로 기니픽을 사용한 동물모델이 이용되어 왔는데(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 동물시험을 가급적 지양하려는 움직임과 동물실험의 대체(replacement), 실험규모 및 실험기간의 단축(reduction), 실험방

Correspondence to: Jong Kwon Lee, Department of Specialized Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul, 122-704, Korea
E-mail: jkleest@kfda.go.kr

법의 증진(refinement)이라는 소위 '3Rs' 운동이 전세계적으로 펼쳐지고 있다(EC, 1999). 이러한 흐름속에서 화학물질의 피부감작성 시험평가시 기니픽을 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; Lee 등, 2003). 이 중에서 LLNA 방법이 현재 GPMT 시험의 대체가능성이 있는 시험방법으로 평가되고 있다(Kimber와 Basketter, 1992; Kimber 등, 1994; Kimber 등, 1999; Basketter 등, 2000; Lee 등, 2002a).

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; Lee 등, 2002a). 그러나 이 시험 방법은 방사선 동위원소를 사용하기 때문에 취급이 용이하지 않고 특별한 시설이 필요하여 국내에서 사용하기에는 쉽지 않다. 또한 강한 자극성 물질을 도포하였을 때 알러젠과 유사한 반응이 나타난다는 보고도 있다(Sikorski 등, 1996; Basketter 등, 1998; Gerberick 등, 1999; Lee 등, 2002a). 이러한 단점을 보완하고자 최근에는 비방사선 시험방법을 이용한 LLNA 시험방법에 대한 연구가 진행되고 있는데, Lee 등(2002b)은 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)를 이용하여 림프절에서 면역조직화학기법(immunohistochemistry)을 이용하는 방법을 소개하였고, Gerberick 등(2002)은 flowcytometry를 이용하는 방법에 대해 보고한 바 있다. 그러나 아직 ELISA 방법을 이용한 방법에 대한 연구는 아직 확립되어 있지 않다.

따라서 본 연구는 접촉성 알러젠으로 대표적인 Dinitrobenzene(DNCB), oxazolone(OXZ), 호홉 알러젠인 toluene diisocyanate(TDI), trimellitic anhydride(TMA), 그리고 강한 자극성물질인 sodium lauryl sulfate(SLS)를 이용하여 Balb/c를 사용한 LLNA시험 평가를 BrdU를 이용한 ELISA 방법으로 실시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 암컷 Balb/c 마우스를 식품의약품안전청 국립독성연구원에서부터 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.

시험물질

접촉성 알러젠으로 DNCB(Sigma, USA), OXZ(Sigma, USA), 호홉 알러젠으로 TDI(Aldrich, USA), TMA(Sigma, USA)를, 그리고 강한 자극물질로 SLS (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다. 용매로는 예비실험을 통해서 DNCB, OXZ, TDI, TMA에 대해서는 acetone과 olive oil를 4 : 1로 섞은 AOO(4 : 1 acetone/olive oil)를 사용하였고, SLS는 30% ethanol을 사용하였으며, 기타 시약은 특급을 사용하였다.

실험 방법

시험물질의 투여: LLNA시험은 기존의 보고한 방법대로(Lee 등, 2002a) Kimber 등(1994)의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 시험물질을 각 농도별로 25 μl 씩 마우스 양쪽 귀 배측에 조금씩 분할도포 하여 시험물질이 정량적으로 흡수되도록 하였으며, 군당 4마리씩 1일 1회 3일 동안 연속해서 도포하여 감각시킨후 2일 후에 부검을 실시하였다.

림프절의 중량 측정 및 단일세포 분리: 예비실험을 얻은 결과를 통해 부검하기 하루전에 BrdU를 마우스당 2 mg, 또는 4 mg으로 복강 주사하였다. 부검후에 이개 림프절의 중량을 측정하고, 멸균된 스테인레스 망을 이용하여 림프절에서 단일세포를 분리하였다.

ELISA assay for BrdU incorporation: BrdU incorporation은 cell proliferation assay kit(Boehringer Mannheim, USA)를 사용하여 몇가지 조건으로 실시하였다. 림프절의 세포를 15 ml PBS에 suspension시킨 후 cell suspension을 96 well plate에 넣었다. Fix-Denat 용액을 가한 후 제거한 다음 anti-BrdU POD 용액을 가하고 세척한 다음 tetramethylbenzidine(TMB)이 함유된 기질을 가해서 발색시킨 후 ELISA reader(Molecular Device, USA)로 370 nm와 490 nm에서 흡광도(OD, optical density)를 측정한 후 다음과 같이 SI(stimulation index)를 계산하였다.

SI(stimulation index)

$$= \frac{\text{BrdU Labelling index (OD) of test chemical}}{\text{BrdU Labelling index (OD) of vehicle control}}$$

통계처리

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

결 과

체중 및 림프절 중량의 변화

강한 알러젠 물질인 DNCB군, OXZ군, TDI군, TMA군 및 강한 자극물질인 SLS투여군의 체중증감은 각각의 용매대조군에 비해 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다(Table 1).

접촉 알러젠인 DNCB군에서의 림프절 중량은 대조군인 AOO군에 비해 농도 의존적으로 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 림프절의 상대중량은 대조군, 0.25% DNCB, 0.5% DNCB, 1.0% DNCB에서 각각 0.45, 0.93, 1.31, 1.30 g/kg으로 나타나 대조군에 비해 농도별로 2.0, 3.1, 3.1배가 증가하였다. OXZ군의 경우 대조군, 0.25%, 0.5%,

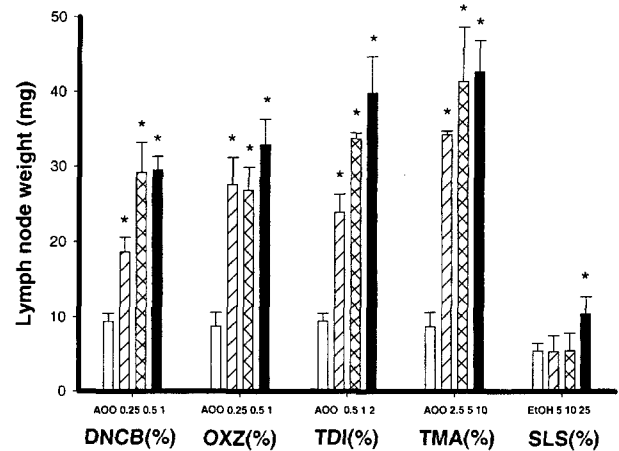


Fig. 1. The absolute weights of auricular lymph nodes in Balb/c mice treated with DNCB, OXZ, TDI, TMA and SLS on both ears for 3 consecutive days. Each value represents mean±SD of four animals. AOO and EtOH represent 4 : 1 acetone/olive oil and 30% ethanol, respectively. *Significantly different from vehicle control (p<0.05).

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

Group	Body weight (g)		Percent change of B.W.
	day 0	day 5 ^{a)}	
Naive	20.8±1.6	21.2±1.7	102.1±0.6
AAO	22.2±0.5	22.1±0.4	99.9±0.5
0.25% DNCB in AOO	21.1±0.4	20.8±1.2	98.5±3.6
0.5% DNCB in AOO	22.1±0.4	22.7±1.1	103.0±4.5
1.0% DNCB in AOO	21.1±1.7	22.0±1.9	104.2±1.0
AAO	22.1±0.8	21.8±1.1	98.5±1.4
0.25% OXZ in AOO	22.6±1.5	23.2±1.6	102.5±1.6
0.5% OXZ in AOO	22.0±0.8	22.2±0.9	100.8±0.7
1.0% OXZ in AOO	21.3±0.8	21.9±0.6	102.9±1.9
AAO	22.2±0.5	22.1±0.4	99.9±0.5
0.5% TDI in AOO	21.6±0.8	21.6±0.7	100.2±0.7
1.0% TDI in AOO	20.9±1.1	20.6±0.4	100.3±3.8
2.0% TDI in AOO	20.8±0.8	21.6±1.4	103.8±2.6
AAO	22.1±0.8	21.8±1.1	98.5±1.4
2.5% TMA in AOO	23.0±1.8	23.0±1.3	100.3±2.3
5% TMA in AOO	23.9±1.1	23.3±1.1	97.6±0.3
10% TMA in AOO	23.0±0.8	22.7±1.3	98.8±2.5
EtOH	22.7±1.0	22.1±1.0	97.5±0.5
5% SLS in EtOH	21.2±1.2	21.3±1.5	100.1±1.2
10% SLS in EtOH	20.1±2.5	19.8±2.8	99.3±2.7
25% SLS in EtOH	20.6±2.5	20.5±2.9	99.2±1.9

^{a)}Day 5 means the day at necropsy. Data represents mean±S.D. of four animals. B.W. represents mean body weight. Percent change of B.W. = (Final body weight/Initial body weight)×100. AOO and EtOH represent 4 : 1 acetone/olive oil and 30% ethanol, respectively.

1%에서 각각 0.40, 1.19, 1.20, 1.50 g/kg으로 나타나 대조군에 비해 농도별로 3.2, 3.1, 3.8배 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 0.45, 1.07, 1.49, 1.88 g/kg으로 관찰되어 대조군에 비해 농도별로 각각 2.5, 3.6, 4.2배가 증가하였다. TMA군의 경우 대조군, 2.5%, 5%, 10%에서 각각 0.40, 1.48, 1.77, 1.88 g/kg으로 나타나 대조군에 비해 농도별로 3.9, 4.8, 4.9배 증가하였다. 그러나 강한 자극물질인 SLS군에서는 저농도, 중농도에서 림프절의 유의성 있는 중량 변화는 관찰할 수 없었지만, 고농도에서는 유의성 있는 림프절 중량증가가 관찰되었다(Fig. 1). 림프절의 상대중량에서도 대조군, 5% SLS, 10% SLS, 20% SLS군에서 각각 0.28, 0.27, 0.25, 0.51로 관찰되어 대조군에 비해 각각 1.0, 0.9, 1.8배가 증가하였다.

ELISA를 이용한 림프절 증식 변화 측정

각 시험물질을 도포한 후 림프절에서 증식반응을 BrdU를 이용한 비방사선법 측정을 위하여 BrdU 투여용량을 2 mg/kg, 4mg/kg으로 하였을 때의 림프절에서 증식능의 변화를 측정하였다. BrdU 2 mg을 투여한 결과 이개림프절에서의 OD값이 대조군, 0.25% DNCB, 0.5% DNCB, 1.0% DNCB군에서 각각 0.21±0.04, 0.37±0.05, 0.62±0.13, 0.56±0.06으로 나타나 대조군에 비해 농도별로 SI가 1.8, 3.0, 2.7로 관찰되었다. BrdU 4 mg 투여한 경우는 대조군, 0.25% DNCB, 0.5% DNCB, 1.0% DNCB

Table 2. The results of local lymph nodes assay in Balb/c mice treated with allergens by ELISA based on different experiment conditions

Condition	Group	Concentration (%)	1 hr ^{b)}		2 hr ^{b)}	
			370 nm SI	405 nm SI	370 nm SI	405 nm SI
Blocking ^{a)}	AOO	-	-	-	-	-
	DNCB	0.25	3.6	3.1	2.7	2.3
		0.5	3.6	3.4	3.9	3.1
		1	4.3	4.0	3.8	3.2
	TDI	0.5	4.5	4.4	3.6	3.6
		1	4.8	4.2	3.2	2.7
		2	5.9	5.0	4.6	4.3
No blocking	AOO	-	-	-	-	-
	DNCB	0.25	2.4	2.3	1.9	2.1
		0.5	4.0	4.9	3.5	3.6
		1	4.0	4.0	2.2	2.7
	TDI	0.5	3.9	3.2	3.0	3.4
		1	5.8	4.6	3.9	4.2
		2	4.8	4.0	3.2	3.8

SI = mean ratio of values found in the chemical-treated mice (n = 4) to that in AOO-treated mice (n = 4).

AOO represents 4 : 1 v/v Acetone/Olive oil.

^{a)}Blocking means blocking with 0.5% BSA in 0.1% PBS-Tween solution during ELISA.

^{b)}1 hr and 2 hr mean Fixation-Denaturation time during ELISA.

군에서 각각 0.47 ± 0.12 , 0.75 ± 0.04 , 0.84 ± 0.14 , 0.96 ± 0.06 으로 나타나 대조군에 비해 농도별로 SI가 2.0, 2.8, 3.3으로 관찰되었다. 반면 TDI군에서는 2 mg BrdU 투여한 경우 대조군, 0.5% TDI, 1.0% TDI, 2.0% TDI군에서 각각 0.21 ± 0.04 , 0.68 ± 0.07 , 0.68 ± 0.08 , 0.62 ± 0.08 으로 나타나 대조군에 비해 농도별로 SI가 2.5, 3.6, 4.2로 관찰되었다. BrdU 4 mg 투여한 경우는 대조군, 0.5% TDI, 1.0% TDI, 2.0% TDI군에서 각각 0.47 ± 0.12 , 1.63 ± 0.14 , 1.25 ± 0.30 , 1.29 ± 0.20 으로 나타나 대조군에 비해 농도별로 SI가 2.4, 3.2, 3.9으로 관찰되었다. 이상의 결과 BrdU 2 mg 투여가 SI를 구하는데 더 적절함을 알 수 있어 이후 실험은 BrdU 2 mg/kg으로 설정하였다.

ELISA 방법의 민감도를 높이기 위하여 0.5% BSA (bovine serum albumin)가 첨가된 0.1% Tween-PBS 용액으로 blocking을 한 경우, Fixation-Denaturation time을 1시간과 2시간으로 한 경우, 흡광도 파장을 달리 한 경우의 결과를 Table 2에 나타내었다. DNCB와 TDI군 모두 blocking을 하지 않고, Fixation-Denaturation 시간을 1시간으로 하여 370 nm에서 흡광도를 측정할 때 SI 값이 가장 좋게 나타났다.

알러젠과 자극제에 의한 림프절의 증식반응 평가

접촉 알러젠인 DNCB, OXZ와 흡입 알러젠인 TDI, TMA, 그리고 강한 자극제인 SLS에 대하여 위에서 설정된 조건

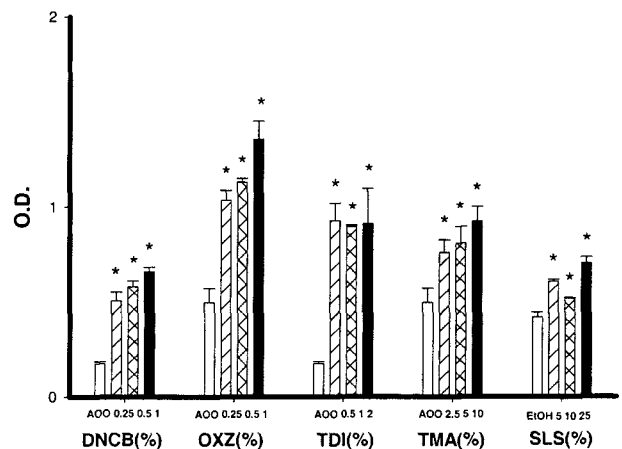


Fig. 2. The BrdU labeling index of auricular lymph nodes in Balb/c mice treated with DNCB, OXZ, TDI, TMA and SLS on both ears for 3 consecutive days. AOO and EtOH represent 4 : 1 acetone/olive oil and 30% ethanol, respectively. Each value represents mean \pm SD of four animals. *Significantly different from vehicle control ($p < 0.05$).

으로 실험하여 얻은 BrdU OD값의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 투여한 모든 군에서 OD값은 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다. 이에 대한 증식반응을 평가하는 SI값은 접촉 알러젠인 DNCB의 경우 0.25%, 0.5%, 1%에서 SI가 각각 3.6, 3.6, 4.3으로 관찰되었으며, OXZ의 경우 0.25%, 0.5%, 1%에서 SI가 각각 3.2, 3.3, 3.8으로 모든 접촉 알러젠에서 양성으로 관찰되었다. 흡입 알러젠인

TDI의 경우 0.5, 1, 2%에서 4.5, 4.8, 4.9로 관찰되었으며, TMA의 경우 2.5%, 5%, 10%에서 SI가 각각 3.3, 3.1, 3.9으로 모든 흡입 알러젠에서 양성으로 관찰되어 있다. 자극제인 SLS의 경우는 5%, 10%, 25%에서 SI가 각각 1.4, 1.2, 1.7로 음성으로 관찰되었다.

고 찰

본 연구는 기니픽을 이용한 피부감작성 시험을 대체하기 위한 실험방법인 LLNA 시험의 평가를 비방사선 법인 BrdU를 이용한 ELISA법으로 실시하였다. 시험물질로는 대표적인 접촉 알러젠인 DNCB, OXZ를 사용하였고, 흡입 알러젠으로는 TDI, TMA를 사용하였으며, 강한 자극제에서의 반응을 평가하기 위하여 SLS를 선정하여 시험한 결과, 접촉 알러젠인 DNCB, OXZ 그리고 흡입 알러젠인 TDI, TMA 모두 SI가 3 이상으로 관찰되어 양성으로 나타났고, 자극제인 SLS는 SI가 2 이하로 관찰되어 음성으로 나타났다.

화학물질에 의한 피부감작성 대체시험법으로는 LLNA 방법과 MEST가 소개되고 있는데, OECD 독성시험 가이드라인에 상정되어 있는 시험방법으로 LLNA 시험이다(Gad 등, 1986; Kimber 등, 2000; Lee 등, 2003). 이 LLNA 시험방법은 알러젠의 피부감작성을 이개 림프절의 증식반응을 이용하는 평가방법으로서 부검전 ^3H -thymidine을 미정맥에 투여하여 림프절에서 대조군에 비해 SI가 3 이상인 것을 알러젠으로 판정하는 시험법이다(Basketter 등, 1992; Loveless, 1996; Kimber 등, 1999, Lee 등, 2002a).

그러나 이 실험은 방사선 동위원소를 생체내에서 사용하기 때문에 방사선을 사용할 수 있는 제한적인 실험실에서만 이용될 수 있다. 따라서 좀 더 보편적인 방법으로 방사선 동위원소를 사용하지 않는 방법이 연구되고 있는데, BrdU를 이용하는 방법과 cytokine을 이용하는 방법, flow-cytometry를 이용하여 림프절 세포의 표면항원을 측정하는 방법 등이 시도되고 있다(Boussiquet-Leroux 등, 1995; Arts 등, 1997; Hariya 등, 1999; Takeyoshi 등, 2001; Gerberick 등, 2002; Suda 등, 2002; Lee 등, 2002b). BrdU는 thymidine analogue로서 세포의 증식을 측정하는 지표로 thymidine uptake의 대안으로 이용되고 있으며, 단클론 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 하여 BrdU Labelling index로 평가할 수 있다(Schutte 등, 1987, Lee 등, 2002b) BrdU 면역조직화학기법으로 연구는 Boussiquet-Leroux 등(1995)이 처음 시도하였는데, CD1 마우스에서 LLNA 방법을 변형시켜 short protocol로 실험한 결과 potassium dichromate에 대하여 강한 양성을 보였으나, ethyl 3-aminobenzoate와 4-chloro-

aniline에 대하여는 증식반응을 관찰할 수 없었다. Arts 등(1997)은 Brown-Norway 와 Wistar 랫드에서 TMA와 DNCB에 의해 림프절에서의 증식반응을 BrdU 면역조직화학염색으로 확인하였다. Lee 등(2002b)은 LLNA의 비방사선법으로서 이개 림프절에서의 알러젠의 증식정도를 BrdU 면역조직화학기법(immunohistochemistry)을 이용하여 평가하였는데, 방피질(paracortex) 보다는 피질(cortex) 과 수질(medulla) 부위에서 DNCB와 TDI에 의한 labeling index(LI)가 증가하므로 BrdU를 이용한 면역조직화학기법이 유용한 지표로 이용할 수 있음을 제시하였다. 본 연구는 알러젠 노출시 발생하는 림프절의 증식반응을 접근성이 용이한 ELISA 방법으로 평가하였는데, 접촉알러젠인 DNCB, OXZ, 흡입알러젠인 TDI, TMA에서 SI가 모두 3 이상 유도됨을 관찰하였다. 이 결과는 Takeyoshi 등 (2001)이 p-Benzoquinone, Citral, TMA를 BrdU ELISA 방법으로 시도하여 SI가 3 이상 관찰된 결과와 일치하였고, Suda 등(2002)이 DNCB에 의한 림프절의 증식반응을 flow-cytometry를 이용한 BrdU LI 평가와도 일치하였다. 그러나 강한 자극제인 SLS의 경우는 SI가 3 이하로 관찰되어 음성으로 나타났는데, 이는 강한 자극제에 양성으로 나타나는 기존의 LLNA의 결과와는 다르게 나타났다(Kimber 등, 1994; Loveless 등, 1996; Lee 등, 2002a).

이외 방사선을 이용하지 않는 방법으로 시도되고 있는 방법으로는 LLNA의 피부 감각 반응은 T 세포를 경유하기 때문에 생체에서의 cytokine 변화를 이용한 생체지표 연구가 시도되고 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 interleukin-2(IL-2)를 이용한 생체지표의 이용가능성에 대하여 보고하였다. 그들은 citral, eugenol, HCA, 2-mercaptobenzothiazole 등을 도포한 후 이개 림프절에서의 세포를 분리한 후 48시간, 72시간 배양하였을때 IL-2가 증가하므로 이를 이용하여 알러젠 유무를 알 수 있는 지표로 이용 가능하다고 하였다. 그 밖에 flowcytometry를 이용하여 림프절 세포의 표면항원을 측정하는 방법 등이 연구되고 있는데, 가능한 지표로 B220의 변화를 생체지표로 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다(Gerberick 등, 1999; Gerberick 등, 2002; Lee 등, 2002b).

본 연구는 화학물질에 의한 피부감작성 평가를 기존의 기니픽 모델을 대체하기 위한 방법으로 마우스를 이용한 LLNA 시험을 실시할 때 비방사선 시험법으로 BrdU를 이용한 ELISA 방법이 가능함을 보여주었다. 향후 좀더 많은 물질에 대하여 여러 실험실이 참여하는 validation 연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

- Arts, J.H.E., Droge, S.C.M., Spanhaak, S., Bloksma, N., Peninks, A.H. and Kuper, C.F. (1997): Local lymph node activation and IgE responses in Brown Norway and Wistar rats after dermal application of sensitizing and non-sensitizing chemicals. *Toxicology*, **117**, 229-237.
- 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. *Fd. 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., Evans, P., Fielder, R.J., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (2002): Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice. *Fd. Chem. Toxicol.*, **40**, 593-598.
- Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998): Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Fd. 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.
- Bossiquet-Leroux, C., Durand-Cabagna, G., Herlin, H. and Helder, D. (1995): Evaluation of lymphocyte proliferation by immunohistochemistry in the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, **15**, 465-475.
- 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.
- 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.
- Gerberick, G.F., Cruse, L.W., Ryan, C.A., Hulette, B.C., Chaney, J.G., Skinner, R.A., Dearman, R.J. and Kimber, I. (2002): Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicol. Sci.*, **67**, 420-428.
- 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., Stelling, 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.
- Lee, J.K., Hwang, I.C., Park, J.H., Kim, H.S., Chung, S.T., Eom, J.H. and Oh, H.Y. (2002a): Evaluation of local lymph node assay as an alternative method for skin sensitization potential in Balb/c mice. *J. Toxicol. Pub. Health*, **18**, 175-181.
- Lee, J.K., Park, J.H., Kim, H.S., Chung, S.T., Eom, J.H., Nam, K.T. and Oh, H.Y. (2003): Evaluation of cell proliferation in ear and lymph node using BrdU immunohistochemistry for mouse ear swelling test. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, in press.
- Lee, J.K., Park, J.H., Park, S.H., Kim, H.S. and Oh, H.Y. (2002b): A nonradioisotopic endpoint for measurement of lymph node cell proliferation in a murine allergic contact dermatitis model, using bromodexoyuridine immunohistochemistry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **48**, 53-61.
- 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.
- Sikorski, E.E., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Miller, C.M. and Ridder, G.M. (1996): Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. *Fund. Appl. Toxicol.*, **34**, 25-35.

- Suda, A., Yamashita, M., Tabei, M., Taguchi, K., Vohr, H., Tsusui N., Suzuki, R., Kikuchi, K., Sakaguchi, K., Mochizuki, K. and Nakamura, N. (2002): Local lymph node assay with non-radioisotopic alternative endpoints. *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 205-218.
- Takeyoshi, M., Yamaski, K., Yakabe, Y., Takatuski, M. and Kimber, I. (2001): Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol. Letters*, **119**, 203-208.
- 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.