



농약의 피부감작성 평가를 위한 Reduced Local Lymph Node Assay(rLLNA) 적용 연구

조유미¹ · 이하은² · 신지영¹ · 홍소혜¹ · 양시영¹ · 유아선³ · 오진아⁴ · 정미혜⁵ · 박수진^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과,

²농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 잔류화학평가과,

³농촌진흥청 국립축산과학원 가축질병방역과, ⁴농촌진흥청 연구정책과,

⁵농촌진흥청 국립식량과학원 생산기술개발과

Application of the Reduced Local Lymph Node Assay(rLLNA) for Skin Sensitization of Pesticides

Youmi Jo¹, HaEun Lee², Ji-Young Shin¹, So-Hye Hong¹, Si Young Yang¹, Are-Sun You³,
Jina Oh⁴, Mihye Jeong⁵, and Soojin Park^{1*}

¹Toxicity and Risk Assessment Division, Department of Agro-Food Safety & Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Republic of Korea

²Residual Agrochemical Assessment Division, Department of Agro-Food Safety & Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Republic of Korea

³Division of Animal Disease & Health, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju, Republic of Korea

⁴Research Policy Planning Division, Rural Development Administration, Jeonju, Republic of Korea

⁵Crop Production Technology Research Division, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Miryang, Republic of Korea

(Received on February 22, 2025. Revised on March 17, 2025. Accepted on March 17, 2025)

Abstract Since agrochemicals may cause allergic contact dermatitis (ACD) upon dermal exposure, pesticides are assessed and registered on the basis of skin sensitization testing. Traditional guinea pig-based methods have been criticized for the use of many animals and the distress caused to them. Non-animal tests have been developed but have limited applications for pesticide formulations. The local lymph node assay (LLNA), which uses fewer animals and is associated with reduced pain than guinea pig-based methods, is widely used to test sensitization to pesticides. Our study evaluated rLLNA that uses only the highest-dose animal group. Using 10 pesticides, the sensitivity, specificity and accuracy using either rLLNA: bromodeoxyuridine-enzyme-linked immunosorbent assay (BrdU-ELISA) or rLLNA modified by Daicel based on ATP content (rLLNA: DA) were calculated and compared to that of traditional guinea pig-based methods. In comparison to the data obtained from conventional guinea pig-based methods, rLLNA: BrdU-ELISA showed 100% (4/4) sensitivity 83% (5/6) specificity and 90% (9/10) accuracy and rLLNA DA showed 100% sensitivity, specificity and accuracy. Data from 206 pesticides show that rLLNA: BrdU-ELISA has 90.9% (40/44) sensitivity 100% (162/162) specificity and 98.1% (202/206) accuracy when compared to LLNA: BrdU-ELISA. Four cases classified as sensitizers by LLNA: BrdU-ELISA were assessed as non-sensitizers in rLLNA variations because their positive responses occurred only at low or medium doses. Our study suggests that rLLNA is highly specific in identifying non-sensitizers. Due to the limitations in the sensitivity of rLLNA, it is necessary to establish guidelines that include the integration of non-animal testing and prerequisites for utilizing rLLNA.

Key words Pesticides, reduced local lymph node assay (rLLNA), skin sensitization

*Corresponding author
E-mail: jiny0451@korea.kr

서론

농약은 농산물의 품질과 농업 생산성을 향상시키는데 유용하지만 과도하거나 지속적인 노출 시 인체에 급성, 만성 중독을 유발할 수 있다(Aktar et al., 2009; Cooper and Dobson, 2007; Kim et al., 2017). 따라서 농약의 안전한 사용을 위해서는 인체에 미치는 영향을 독성자료를 통해 사전에 검토하고 평가해야 한다(EPA, 2024; EU, 2013a; EU, 2013b; RDA, 2023). 특히 피부감작성시험은 제조 및 살포과정 등에서 농약이 직간접적으로 피부에 노출되었을 때, 알레르기 반응 유발 가능성이 있는지를 평가하기 위한 필수적인 항목이다(Daniel et al., 2018; Strickland et al., 2019).

초기의 피부감작성평가는 기니피그를 이용한 시험법(OECD TG 406)이 활용되었으나(OECD, 2022) 상대적으로 많은 실험동물이 사용됨에 따라 동물 복지 및 윤리 문제가 제기되었으며 이에 대한 대안으로 동물실험을 최소화하는 시험법과 비동물 시험법이 개발되고 있다(Jang et al., 2014; Strickland et al., 2022).

피부감작성을 평가하기 위한 비동물 시험법으로 Direct Peptide Reactivity Assay(DPRA), KeratinoSens™, h-CLAT 등이 개발되었으며, 이러한 비동물 시험법의 조합을 기반으로 피부감작성을 예측하는 정의된 접근법(Defined Approaches, OECD TG 497)이 개발되었다(OECD, 2023; Strickland et al., 2022). 하지만 이러한 비동물 시험법은 농약 원제의 감작성 평가에 활용될 순 있으나(RDA, 2023; Strickland et al., 2019), 농약 품목과 같은 복합 혼합물에 대한 검증 부족으로 농약 감작성평가를 위한 적용이 제한적이다(Settivari et al., 2015; Strickland et al., 2022).

현재 국내 농약 품목의 등록을 위한 피부감작성 평가는 대부분 국소림프절시험(Local Lymph Node Assay, LLNA) BrdU-ELISA법이 사용되고 있다. LLNA(BrdU-ELISA 또는 FCM, DA 포함)는 마우스의 귀 뒷면에 시험물질을 도포한 후, 이개 림프절에서의 림프구 증식 정도를 측정하여 감작성을 평가하는 시험법이다. LLNA(BrdU-ELISA 또는 FCM, DA 포함)는 기니피그를 이용한 시험보다 사용되는 동물수가 적고 동물에게 가해지는 고통이 상대적으로 적은 방법인데, 이를 더 간소화한 Reduced Local Lymph Node Assay(rLLNA, OECD 429)이 국외에서 활용되고 있다(OECD, 2010; EPA, 2011). 기존 LLNA법은 저, 중, 고농도의 시험물질을 군당 4마리의 마우스에 처리하여 림프의 증식을 보는 시험으로 시험군으로 12마리의 동물이 사용되나, rLLNA법은 고농도의 물질만 처리하여 시험군으로 4마리의 동물을 사용하여 3R 원칙을 준수함으로써 시험에 필요한 동물 수를 기존의 LLNA에 비해 40% 이상 줄일 수 있는 방법이다(Anderson et al., 2011; OECD, 2010).

본 연구에서는 LLNA법 중 국내에서 주로 활용되고 있는

BrdU-ELISA법 및 DA법을 이용하여 기존 LLNA법과 rLLNA법(BrdU-ELISA, DA)의 감작성 예측력을 비교함으로써 국내 농약 독성평가에서 rLLNA BrdU-ELISA, DA법의 활용 가능성을 평가하였다. 이를 통해 농약 등록과정에서 동물 희생을 줄이는 동시에 규제 요건을 충족할 수 있는지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 시험물질

동물실험은 국립농업과학원 동물실험윤리위원회 승인 후(승인번호:NAS201803) 수행하였다. 실험동물로 마우스(CBA/J, 암컷 8~10주령)는 한림실험동물연구소(화성, 경기)에서 구입하여 온도 22±3°C, 습도 55±10%, 12시간 명암 조건에서 일주일간 적응시킨 후 사용하였다. 음수와 사료는 자유로이 공급하였다.

기니피그를 이용한 피부감작성시험과 기존 LLNA BrdU-ELISA법, rLLNA BrdU-ELISA법 및 DA법의 피부감작성 예측력을 비교하기 위해 등록농약 보스칼리드·피라클로스트로빈 액상수화제, 페림존·발리다마이신에이 액상수화제, 아미셀브롬·클로로탈로닐 액상수화제, 이프코나졸 종자처리액상수화제, 펜트라자마이드·프레틸라클로르 유제, 디페노코나졸·디티아논 입상수화제 및 네레이스톡신계 농약 원제인 카답하이드로클로라이드, 티오사이클람 하이드로젠 옥살레이트와 품목인 카답하이드로클로라이드 수용제, 티오사이클람 하이드로젠 옥살레이트 수화제를 이용하여 시험을 수행하였다. 용해도에 따라 용매를 아세톤(Sigma, USA):올리브오일(Sigma, USA) (4:1, v/v), Propylene glycol(Sigma, USA)을 사용하였고, 양성대조군은 25% 유제놀(Sigma, USA)을 사용하였다.

LLNA BrdU-ELISA 및 rLLNA BrdU-ELISA 본시험

LLNA BrdU-ELISA시험은 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록기준」의 인축독성 시험기준과 방법 중 피부감작성 시험 및 OECD 가이드라인(OECD, 2018) 시험법에 준하여 시험하였다.

본 시험을 수행하기에 앞서 전신독성 및 피부자극성을 유발하지 않는 본시험 투여 농도 설정을 위해 예비시험을 수행하였다. 군당 마우스 CBA/J 암컷 1마리를 사용하여 양쪽 귀에 시험물질 25 µL를 3일간 1회씩 도포하고, 도포 당일, 3일차 및 6일차에 귀 두께를 측정하였다. 도포 당일 및 예비시험 종료일(6일차)에 체중을 측정하였다.

예비시험에서 확인된 농도를 이용하여 고농도, 중간농도, 저농도 처리군을 설정하고 피부감작성 본시험을 수행하였다. 투여 1일, 2일, 3일차에 군당 4마리의 마우스 양측 귀 배측에 각각 시험물질 또는 양성대조물질, 용매 25 µL씩 도포하였다. 투여 5일차에 각 동물에 표지물질인 BrdU(10 mg/mL, Roche,

Switzerland)을 0.5 mL(5 mg/animal) 복강투여 하였다. 투여 6일차에 마우스를 CO₂로 안락사하고 이개림프절을 채취하여 인산완충용액(Phosphate-buffered saline, PBS)(Sigma, USA)에 넣었다.

이개림프절을 cell strainer(#70 nylon mesh)(Coming, USA)와 일회용 막자(Thomas scientific, USA)와 PBS를 이용하여 15 mL의 단일세포로 만들었다. Cell proliferation ELISA, BrdU colorimetric kit (Roche, Switzerland)를 이용하여 흡광도 370, 492 nm에서 세포증식을 측정하고 평균감작지수(mean stimulation index, SI)를 산출하였다.

$$SI = \frac{\text{시험군의 평균 BrdU표지지수}}{\text{음성대조군의 평균 BrdU표지지수}}$$

$$BrdU\text{표지지수} = \frac{OD_{370} - OD_{370blank}}{OD_{492} - OD_{492blank}}$$

rLLNA BrdU:ELISA 시험은 기존 LLNA BrdU:ELISA와 동일한 방법으로 수행하되, 시험물질을 고농도로만 도포하였다. 평균 감작지수가 1.6 이상일 때 감작성 물질로 판정하였다.

rLLNA DA법 본시험

rLLNA DA시험은 농촌진흥청 고시 「농약 및 원제의 등록 기준」의 인축독성 시험기준과 방법 중 피부감작성시험 및 OECD 가이드라인(OECD, 2010) 시험법에 준하여 시험하되, 시험물질 처리군은 고농도 시험군만 설정하였다.

시험물질 농도는 LLNA BrdU-ELISA법 예비시험에서 도출된 정보를 이용하였다. 투여 1일차에 시험동물의 체중 및 귀두께를 측정하였다. 투여 1일, 2일, 3일, 7일차에 군당 4마리의 마우스 양측 귀 배측에 1% SLS를 4-5회 도포하고, 1시간

후에 시험물질 또는 대조물질을 25 µL씩 처리하였다. 투여 8일차에 체중 측정 후 안락사하여 귀두께 측정 및 이개림프절을 적출하여 PBS(Sigma, USA)에 넣었다. 적출한 이개림프절은 슬라이드글라스로 으깨 1 mL의 PBS, cell scraper(SPL, Korea)로 단일림프세포 현탁액을 제조하였다. 이후 균질화된 세포액 20 µL을 PBS 1.98 mL에 혼합하여 시료를 준비하고 luciferase를 이용한 ATP 측정 kit(CellTiter-Glo® 2.0 Assay; Promega, USA)와 luminometer(Varioskan LUX, Thermo scientific, USA)를 이용하여 ATP 양을 측정하였다.

평균 감작지수(SI)는 용매대조군 RLU(relative luminone-scence units) 대비 시험물질의 RLU로 산출하고, 평균 자극지수가 1.8 이상일 때 감작성으로 판정하였다.

기존 감작성 시험법과 rLLNA의 감작성 예측 비교

국내 농약 등록 신청 시 제출한 기니픽을 이용한 감작성 시험과 기존 LLNA BrdU:ELISA 시험, rLLNA BrdU:ELISA 시험 결과 비교하여 rLLNA BrdU:ELISA법의 예측정도를 평가하고자 하였다. 민감도, 특이도, 정확도를 산출하였다.

국내 농약 등록 신청 시 제출한 기니픽을 이용한 감작성 시험과 rLLNA DA 시험 결과, rLLNA BrdU:ELISA법 결과를 비교하였다. 예측정도를 평가하고자 민감도, 특이도, 정확도를 산출하였다.

등록 농약 제품의 피부감작성 시험 후향적 분석

rLLNA의 예측력에 대한 신뢰도 확보를 위해 등록신청 시 제출된 농약의 피부감작성시험 성적을 이용하여 후향적 분석(retrospective analysis)을 수행하였다. 농약 등록 신청 시 제출한 LLNA BrdU:ELISA 시험법 결과와 최고 농도의 SI

Table 1. Comparison of pesticide skin sensitization results using Guinea Pig based Test, LLNA BrdU-ELISA, and rLLNA BrdU-ELISA (n=10)

Test articles	Guinea pig based ^{a)}	LLNA BrdU-ELISA ^{b)}			rLLNA BrdU-ELISA ^{c)}		
		Concentrations	SI ^{d)}	Classification	Concentrations	SI	Classification
Boscalid.Pyraclostrobin SC (13.6+8%)	+ ^{e)} (50%)	100, 50, 25	1.8, 1.8, 1.1	+	100	1.8	+
Ferimzone.Validamycin A SC (30+5%)	- ^{f)} (0%)	100, 50, 25	1.0, 0.7, 0.7	-	100	0.9	-
Amisulbrom.Chlorothalonil SC (6+35%)	- (15%)	25, 12.5, 6.25	2.5, 2.2, 1.5	+	25	2.3	+
Iponazole FS (8%)	+ (70%)	100, 50, 25	1.9, 1.9, 1.5	+	100	2.1	+
Fentrazamide.Pretilachlor EC (1.5+12%)	+ (84%)	12.5, 6.25, 3.13	2.1, 2.1, 1.2	+	12.5	2.2	+
Difenoconazole.Dithianon WG (4+30%)	+ (35%)	3.13, 1.56, 0.78	1.9, 1.9, 1.7	+	3.13	2.3	+
Cartap hydrochloride (≥95%)	-	50, 25, 12.5	0.9, 1.0, 0.8	-	50	1.1	-
Cartap hydrochloride SP (50%)	-	25, 12.5, 6.25	0.8, 0.8, 0.6	-	25	0.9	-
Thiocyclam hydrogen oxalate (≥95%)	-	25, 12.5, 6.25	1.5, 1.3, 1.2	-	25	1.4	-
Thiocyclam hydrogen oxalate WP (25%)	-	25, 12.5, 6.25	1.2, 1.0, 1.1	-	25	1.3	-

^{a)}Buehler test

^{b)}LLNA BrdU-ELISA, Local Lymph Node Assay BrdU-ELISA

^{c)}rLLNA BrdU-ELISA, Reduced Local Lymph Node Assay BrdU-ELISA

^{d)}SI, Stimulation index

^{e)}+, positive skin sensitizer

^{f)}-, negative skin sensitizer

수치만 활용하는 rLLNA BrdU:ELISA 결과 예측치를 비교하였다.

결과 및 고찰

rLLNA BrdU:ELISA법을 이용한 감작성 시험 결과

등록 신청 시 제출된 기니피그 시험에서 아미셀브롬·클로로탈로닐 액상수화제는 비감작성이었으나 마우스 이용한 LLNA BrdU-ELISA 시험 및 rLLNA BrdU-ELISA 시험에서는 감작성으로 분류되었다(Table 1). 아미셀브롬·클로로탈로닐 액상수화제는 피부자극성 농약으로 Anderson et al.(2011)는 감작성물질과 자극성물질은 모두 림프구를 유도할 수 있는데, 감작성 물질은 항원-특이적인 림프구(antigen-specific lymphocyte)를 증식시키는 반면 자극성물질은 비특이적인 반응으로, 실험에 사용하는 림프구 측정인자 (예 ³H, BrdU 등)가 이를 구별할 수 없다고 보고하였다. 또한 LLNA에서 측정하는 림프구 활성화/증식은 감작에 의해서만 발생하는 것이 아니라 다양한 생화학적 기작에 의해 유도될 수 있어 LLNA 시, 기니피그 시험 대비 위양성 결과가 발생할 수 있다고 알려져 있다(Anderson et al., 2011; Kreiling et al., 2008).

또한 화학물질의 분류 및 표시사항에 따르면(NICS, 2025) ① 피부 과민성(구분 1), 피부 과민성(구분 1B)인 성분의 함량이 1.0% 이상인 혼합물 ② 피부 과민성(구분 1A) 성분의 함량이 0.1%인 혼합물에 해당되면 해당 혼합물 자체에 대한 자료는 없어도 위의 근거를 통해 그 물질을 피부감작성(과민성)물질로 분류한다. 아미셀브롬·클로로탈로닐 액상수화제의 경우 피부감작성 구분 1인 물질의 함량이 36%이상으로 화학물질의 분류 및 표시사항에 따라 피부감작성 물질로 분류될

수 있는 물질이었다.

또한 기니피그를 이용한 Buehler시험 결과에서 아미셀브롬·클로로탈로닐 액상수화제의 감작용이 15%이었는데, 개정된 농약관리법 인축독성 시험성적서 검토기준에 따르면 양성으로 판정되었으나 개정(2023)됨에 따라 음성으로 평가되었다.

이를 종합적으로 고려했을 때, 아미셀브롬·클로로탈로닐 액상수화제는 약한 감작성을 가지고 세포내에서 복합적인 반응으로 인해 LLNA시험에서 양성 반응이 나온 것으로 사료되었다.

LLNA BrdU-ELISA법과 rLLNA BrdU-ELISA법을 비교한 결과, 감작성 분류 결과가 일치하여 rLLNA BrdU-ELISA법 활용 가능성을 확인할 수 있었다(Table 2).

rLLNA DA법을 이용한 감작성 시험 결과

아미셀브롬·클로로탈로닐 액상수화제는 rLLNA BrdU-ELISA법에서 감작성으로 분류되었으나, 기니피그를 이용한 시

Table 2. Sensitization predictive ability of rLLNA BrdU-ELISA

	rLLNA BrdU-ELISA	
	vs Guinea pig based ^{a)}	vs LLNA BrdU-ELISA
Sensitivity % ^{b)}	100 (4/4)	100
Specificity % ^{c)}	83 (5/6)	100
Accuracy % ^{d)}	90 (9/10)	100

^{a)}Buehler test

^{b)}Sensitivity(%)=[True Positive/(True Positive+False Negative)]*100,

^{c)}Specificity(%)=[True Negative/(True Negative + False Positive)]*100

^{d)}Accuracy(%)=[(True Positive+True Negative) /Tested Materials]*100

Table 3. Comparison of pesticide skin sensitization results using Guinea Pig Test, rLLNA BrdU-ELISA, and rLLNA DA (n=10)

Test articles	Guinea pig based ^{a)}	Concentrations	rLLNA BrdU:ELISA ^{b)}		rLLNA DA ^{c)}	
			SI ^{d)}	Classification	SI	Classification
Boscalid.Pyraclostrobin SC (13.6+8%)	+ ^{e)} (50%)	100	1.8	+	1.8	+
Ferimzone.Validamycin A SC (30+5%)	- ^{f)} (0%)	100	0.9	-	1.3	-
Amisulbrom.Chlorothalonil SC (6+35%)	- (15%)	25	2.3	+	1.2	-
Iponazole FS (8%)	+ (70%)	100	2.1	+	1.9	+
Fentrazamide.Pretilachlor EC (1.5+12%)	+ (84%)	12.5	2.2	+	2.4	+
Difenoconazole.Dithianon WG (4+30%)	+ (35%)	3.13	2.3	+	1.9	+
Cartap hydrochloride (≥95%)	-	50	1.1	-	1.5	-
Cartap hydrochloride SP (50%)	-	25	0.9	-	1.7	-
Thiocyclam hydrogen oxalate (≥95%)	-	25	1.4	-	1.5	-
Thiocyclam hydrogen oxalate WP (25%)	-	25	1.3	-	1.2	-

^{a)}Buehler test

^{b)}rLLNA BrdU-ELISA, Reduced Local Lymph Node Assay BrdU-ELISA

^{c)}rLLNA DA, Reduced Local Lymph Node Assay DA

^{d)}SI, Stimulation index

^{e)}+, positive skin sensitizer

^{f)}-, negative skin sensitizer

Table 4. Sensitization predictive ability of rLLNA DA

	rLLNA DA	
	vs Guinea pig based ^{a)}	vs rLLNA BrdU-ELISA
Sensitivity % ^{b)}	100	80 (4/5)
Specificity % ^{c)}	100	100 (5/5)
Accuracy % ^{d)}	100	90 (9/10)

^{a)}Buehler test

^{b)}Sensitivity(%)=[True Positive/(True Positive+False Negative)]*100

^{c)}Specificity(%)=[True Negative/(True Negative+False Positive)]*100

^{d)}Accuracy(%)=[(True Positive+True Negative)/Tested Materials]*100

험 및 rLLNA DA법에서 비감작성으로 분류되었다(Table 3). 즉 기니픽 시험과 rLLNA DA시험 결과가 일치하였다(Table 4).

등록 농약 제품의 피부감작성 시험 후향적 분석 결과

분석 결과, 비감작성 농약은 rLLNA BrdU:ELISA법을 활용 시 모두 비감작성으로 예측 가능하여 100%의 특이도를 보였고, 민감도 90.9%, 정확도 98.1%를 보였다(Table 5, 6). 이는 OECD 가이드라인 429와 미국 EPA에서 인정하고 있는 방사능동위원소를 사용한 rLLNA법 예측력과 유사하였다. ICCVAM(2009) 보고서에 따르면 rLLNA법은 일반 LLNA

Table 5. Classification of agricultural products based on the LLNA BrdU-ELISA and the rLLNA BrdU-ELISA by retrospective analysis (n=206)

No	Plant Protection Products	Stimulation Index (SI) according to test article concentrations			Prediction of skin sensitization	
		Low	Middle	High	multidose LLNA BrdU-ELISA	rLLNA BrdU-ELISA
1	Valifenalate SC	1.175	1.119	1.3	-	-
2	Amisulbrom.Valifenalate SC	1.3	1.119	1.175	-	-
3	Penthiopyrad.Trifloxystrobin SC	1.575	1.644	1.727	+	+
4	Fludioxonil. Hexaconazol SC	1.108	1.133	1.276	-	-
5	Fluxapyroxad FW	0.652	0.903	1.366	-	-
6	Pyribencarb.Triflumizole SC	1.508	1.74	1.742	+	+
7	Abamectin.Emamectin benzoate ME	1.163	1.089	1.587	-	-
8	Boscalid WG	1.203	1.379	1.538	-	-
9	Polyoxin B WP	2.023	2.286	2.777	+	+
10	Fludioxonil SC	0.715	0.689	0.828	-	-
11	Indoxacarb SC	0.928	1.153	1.109	-	-
12	Fosthiazate GR	0.634	0.814	0.601	-	-
13	Lufenuron WG	1.25	1.32	0.806	-	-
14	Bentazone.Pyriminobacmethyl GR	0.9	1.1	0.9	-	-
15	Benfuresate. MCPA.Pyriminobacmethyl GR	0.911	0.701	0.778	-	-
16	Bromobutide.Fentrazamide.Pyrazosulfuron ethyl GR	1.382	1.786	2.034	+	+
17	Pyrimisulfan.Tefuryltrione DT	0.8	0.8	0.7	-	-
18	Bensulfuron methyl. Benzobicyclon. Fentrazamide GR	1.545	1.396	1.123	-	-
19	Bromobutide.Pyrimisulfan SC	0.9	1.4	1.4	-	-
20	Benzobicyclon.Fentrazamide.Imazosulfuron GR	1.282	1.751	1.967	+	+
21	Benthiavalcicarb isopropyl. Chlorothalonil SC	3.5	4.2	3.8	+	+
22	Amisulbrom FG	0.939	0.763	1.019	-	-
23	Azoxystrobin.Tebuconazole WG	0.693	0.988	0.914	-	-
24	Oxytetracycline WG	0.789	0.803	0.837	-	-
25	Ferimzone.Pencycuron SC	1.2	1.1	1	-	-
26	Prochloraz manganese GR	0.941	1.274	1.238	-	-
27	Pyrachlostrobin.Fluazinam SC	2.783	2.876	3.555	+	+
28	Pyribencarb.Tebuconazole SC	0.6	1	0.8	-	-
29	Benfuracarb.Etofenprox GR	1.4	1.2	1.3	-	-
30	Cyantraniliprole SE	1.8	1.9	2.6	+	+
31	Abamectin.Acetamidiprid WG	1	0.9	1	-	-
32	Abamectin.Flometoquin SC	1.6	1.8	1.3	+	-
33	Acetamidiprid.Pymetrozine WG	1.1	1.3	1.2	-	-
34	Zeta cypermethrin DP	1	1.2	1.1	-	-
35	Amisulbrom.Dinotefuran WG	1.098	1.003	0.954	-	-
36	Tiadinil.Chlorantraniliprole.Triflumezopyrim GR	1.22	1.465	1.113	-	-
37	Bentazone sodium. MCPA. Triafamone GR	0.942	1.157	1.63	+	+
38	Metalaxyl-M GR	1.1	1	1.3	-	-
39	Ferimzone.Validamycin A SC	1.8	1.7	1.3	+	-

Table 5. Continued

No	Plant Protection Products	Stimulation Index (SI) according to test article concentrations			Prediction of skin sensitization	
		Low	Middle	High	multidoseLLNA BrdU-ELISA	rLLNA BrdU-ELISA
40	Pyrachlostrobin EC	1	1	1.1	-	-
41	Bifenthrin DP	1.184	1.349	1.102	-	-
42	Chlorfenapyr SC	0.651	0.647	0.834	-	-
43	Fluquinconazole.Fluxapyroxad SC	1.172	1.277	1.485	-	-
44	Hymexazole.Penthiopyrad DC	1.217	1.655	1.928	+	+
45	Calcium polysulfide DP	1	1.3	1.1	-	-
46	Abamectin.Sulfoxaflor DC	1.1	1.1	0.9	-	-
47	Abamectin.Emamectin benzoate WP	1	1.3	0.9	-	-
48	Fluxametamide EW	1.2	1.5	1.7	+	+
49	ethylformate GA	0.995	0.654	0.703	-	-
50	Glufosinate ammonium. Mecoprop-P SL	0.843	0.801	1.201	-	-
51	Benzobicyclon.Oxadiazon SE	0.681	0.75	1.023	-	-
52	Benzobicyclon.Florpyrauxifen benzyl.Penoxsulam SC	1.33	1.219	1.121	-	-
53	Azoxystrobin SC	0.935	1.31	1.231	-	-
54	Azoxystrobin.Difenoconazole SC	0.948	0.884	1.04	-	-
55	Tebuconazole SC	1.156	1.041	1.005	-	-
56	Fludioxonil SC	0.881	0.889	1.312	-	-
57	Indoxacarb SC	0.913	1.132	1.793	+	+
58	Chlorfenapyr SC	1.343	1.434	1.015	-	-
59	Chlorfenapyr SC	1.243	1.248	1.423	-	-
60	Pymetrozine WP	0.724	0.605	0.558	-	-
61	Glufosinate ammonium.MCPA SL	0.87	0.724	0.763	-	-
62	Azoxystrobin.Chlorothalonil SC	4.4	4.4	4.5	+	+
63	Oxytetracycline.Validamycin A WP	1.1	0.9	0.9	-	-
64	Fludioxonil.Isofetamid SC	1.202	1.42	1.217	-	-
65	Fludioxonil.Penthiopyrad SC	1.116	1.365	1.628	+	+
66	Pyribencarb FS	0.911	0.688	1.069	-	-
67	Spirodiclofen SC	1.404	1.569	1.706	+	+
68	Abamectin.Methidathion WP	0.9	1.1	0.8	-	-
69	Tebuconazole.Dimethoate GR	0.818	1.44	1.796	+	+
70	Tiadinil.Chlorantraniliprole.Triflumezopyrim GR	1.22	1.465	1.113	-	-
71	Benzobicyclon.Florpyrauxifen benzyl.Penoxsulam SC	1.33	1.219	1.121	-	-
72	Fenoxasulfone.Pyrimisulfan GG	2.059	2.941	5.405	+	+
73	Thifluzamide SC	1.5	2.1	1.6	+	+
74	Dimethomorph.Picarbutrazox SC	1.2	0.9	0.8	-	-
75	Chlorothalonil.Tebuconazole SC	4.15	4.254	4.751	+	+
76	Deltamethrin.Lamda cyclothrin WP	0.848	1.076	1.302	-	-
77	Lamda cyclothrin DP	0.614	0.66	0.661	-	-
78	Abamectin.Spinetoram SC	1	1.1	1.1	-	-
79	Orysastrobin.Prochloraz manganese.Fipronil GR	0.978	1.05	1.044	-	-
80	Fenoxasulfone.Pyrimisulfan SC	0.935	0.682	0.834	-	-
81	Metazosulfuron.Tefuryltrione SC	0.974	1.127	0.564	-	-
82	Benzobicyclon.Flucetosulfuron.Imazosulfuron DT	1	1.1	1	-	-
83	Azimsulfuron.Oxaziclomefone.Tefuryltrione DT	0.918	0.951	1.139	-	-
84	Pyrachonil.Tefuryltrione DT	0.627	0.752	0.972	-	-
85	Gibberellic acid.Gibberellin A4+7-6 BA SP	1.119	1.13	1.128	-	-
86	Pyrachlostrobin WG	2.845	2.868	2.303	+	+
87	Propineb.Pyrachlostrobin WG	0.937	1.073	1.198	-	-
88	Abamectin GR	1.2	1.3	1.2	-	-
89	Abamectin.Spirodiclofen SC	0.661	0.532	0.618	-	-
90	Carbendazim. Trifloxystrobin WG	1.5	1.7	1.8	+	+
91	Carbosulfan.Tefluthrin GR	1.2	1.3	1.3	-	-
92	Pyflubumide SC	1.2	1	1	-	-
93	Isotianil.Penflufen.Fipronil GR	0.648	0.492	0.511	-	-

Table 5. Continued

No	Plant Protection Products	Stimulation Index (SI) according to test article concentrations			Prediction of skin sensitization	
		Low	Middle	High	multidoseLLNA BrdU-ELISA	rLLNA BrdU-ELISA
94	Flazasulfuron.MCPA WG	0.9	1.6	1.2	+	-
95	Fentrazamide.Pyrimisulfan DT	1.1	1.2	1.1	-	-
96	Bromobutide.Oxaziclomefone.Pyrazosulfuron ethyl GR	1.1	1.1	1	-	-
97	Fenoxasulfone.Pyrimisulfan SC	0.935	0.682	0.834	-	-
98	Validamycin A SC	0.892	1.041	0.862	-	-
99	Benthiavalcarb isopropyl WG	1.1	1.1	1	-	-
100	Fluquinconazole.Prochloraz manganese PA	0.844	0.794	0.717	-	-
101	Acetamiprid.Lufenuron WG	0.884	0.683	0.758	-	-
102	Acetamiprid.Emamectin benzoate WG	0.869	0.922	1.196	-	-
103	Cadusafos.Terbufos GR	1.092	1.512	1.187	-	-
104	Mecoprop-P.Metamifop ME	1	1.1	1.5	-	-
105	Flazasulfuron.Imazaquin WG	1.1	1	1	-	-
106	Dazomet GR	1.271	1.069	0.982	-	-
107	Fludioxonil SC	0.819	0.82	0.913	-	-
108	Metam sodium SL	1.817	2.045	2.427	+	+
109	Bifenthrin GR	0.988	1.131	1.085	-	-
110	Fosthiazate SL	0.643	0.644	0.696	-	-
111	Azoxystrobin.Tetraconazole SE	1.753	2.318	2.467	+	+
112	Dinotefuran.Etofenprox FG	1.274	1.11	1.201	-	-
113	Dimethoate GR	0.747	1.483	1.913	+	+
114	Cyflumetofen DC	2	2.8	3.2	+	+
115	Hexaconazol.Tefluthrin GR	0.9	1.3	1.2	-	-
116	Fosthiazate GR	0.655	0.568	0.967	-	-
117	Mandestrobin SC	1	0.9	0.9	-	-
118	Azoxystrobin.Tebuconazole SC	0.261	0.401	0.424	-	-
119	Oxathiapiprolin SC	1.1	1.1	1.4	-	-
120	Dichlorvos.Lamda cyclothrin DC	0.9	1.2	1.4	-	-
121	Bifenthrin.Imidacloprid GR	1.213	1.089	1.077	-	-
122	Cyflumetofen.Fenpyroximate SC	1.3	1.6	1.2	+	-
123	Orysastrobin.Probenazole.Fipronil GR	1.914	2.057	2.068	+	+
124	Tebuconazole.Terbufos GR	1.4	1.2	0.9	-	-
125	Thifluzamide.Tiadinil.Fipronil GR	0.668	0.744	0.897	-	-
126	Metazosulfuron.Tefuryltrione DT	0.849	0.936	0.876	-	-
127	Bensulfuron methyl. MCPA. Mefenacet SC	0.517	0.692	1.017	-	-
128	Bensulfuron methyl. Benzobicyclon. Fentrazamide UG	1	1.1	1.2	-	-
129	Bensulfuron methyl. Bromobutide. Penoxsulam SC	0.9	1	0.9	-	-
130	Benzobicyclon.Imazosulfuron.Penoxsulam DT	1	1.4	1.5	-	-
131	Benfuresate.Bromobutide.Penoxsulam GR	1.376	1.278	1.134	-	-
132	Azimsulfuron.Benzobicyclon.Oxaziclomefone UG	1.2	1.4	1.4	-	-
133	Oxadiagyl.Oxadiazon EC	0.767	0.623	0.54	-	-
134	Oxaziclomefone.Tefuryltrione SC	0.992	1.157	1.357	-	-
135	Imazosulfuron.Mefenacet.Tefuryltrione SC	0.9	0.9	1.2	-	-
136	Penoxsulam.Tefuryltrione DT	1.328	1.156	1.175	-	-
137	Fentrazamide.Tefuryltrione SC	1	1.1	1.2	-	-
138	Flazasulfuron.MCPA WG	1.259	0.989	1.276	-	-
139	Fludioxonil WG	0.321	0.609	0.379	-	-
140	Pyrachlostrobin WG	2.28	2.497	2.842	+	+
141	Tiadinil.Fipronil GR	0.901	0.731	1.538	-	-
142	Metalaxyl.Tebuconazole GR	1.103	1.05	1.132	-	-
143	Oxolinic acid.Oxytetracycline WP	0.618	0.457	0.916	-	-
144	Kresoxim methyl.Triflumizole SC	0.508	0.532	0.706	-	-
145	Fluazinam.Propineb WP	1.356	1.143	0.91	-	-
146	Pyrachlostrobin.Tebuconazole SC	1.263	1.328	1.247	-	-
147	Diflubenzuron.Sulfoxaflor WG	0.986	0.962	0.922	-	-

Table 5. Continued

No	Plant Protection Products	Stimulation Index (SI) according to test article concentrations			Prediction of skin sensitization	
		Low	Middle	High	multidoseLLNA BrdU-ELISA	rLLNA BrdU-ELISA
148	Buprofezin.Pyrifluquinazon SC	2.7	2.8	2.3	+	+
149	Bifenthrin.Phoxim GR	0.576	0.969	0.833	-	-
150	Abamectin.Chlorfenapyr SC	1	1.2	1.2	-	-
151	Emamectin benzoate. Fonicamid WG	1	1	1	-	-
152	Chlorantraniliprole WT	1.225	1.232	1.371	-	-
153	Flufenoxuron.Sulfoxaflor SC	0.731	0.917	0.629	-	-
154	Oryastrobin,Tricyclazole.Fipronil GR	1	0.9	0.9	-	-
155	Oryastrobin.Fipronil GR	1.1	1.183	1.473	-	-
156	Sulfur.Buprofezin SC	3.4	4.5	6.3	+	+
157	Benzobicyclon.Pyrimisulfan SC	1.1	0.9	1.1	-	-
158	Kresoxim methyl WG	1.1	1.1	1.1	-	-
159	Dinotefuran WG	0.515	0.553	0.519	-	-
160	Acetamiprid SL	1.1	0.9	0.9	-	-
161	Etridiazole.Thifluzamide EC	0.119	0.988	0.938	-	-
162	Chlorothalonil.thiram WP	0.587	0.591	0.686	-	-
163	Fluxapyroxad GR	1.2	1.2	1.4	-	-
164	Hexaconazol.Tebuflouquin SC	1.3	1.5	1.5	-	-
165	Acetamiprid AL	1	1	1.1	-	-
166	Chromafenozide.Etofenprox EC	2.6	2.8	2.8	+	+
167	Glufosinate ammonium. MCPA SL	0.445	0.812	0.814	-	-
168	Bifenox.Glyphosate isopropylammonium ME	1.018	1.461	1.574	-	-
169	Fluazinam SC	3.5	3.5	3.6	+	+
170	Chlorfenapyr SC	0.651	0.647	0.834	-	-
171	Tricyclazole.Fipronil GR	1	0.9	0.9	-	-
172	Glyphosate isopropylammonium. Mecoprop SL	0.9	1.1	1.4	-	-
173	Oxaziclomefone.Tefuryltrione SC	1.1	1.1	1	-	-
174	Azoxystrobin.Propiconazole SE	0.3	0.9	1.9	+	+
175	Tricyclazole.Validamycin A SC	0.2	0.4	1.8	+	+
176	Azoxystrobin.Difenoconazole WG	1.1	1.1	1.5	-	-
177	Famoxadone DP	1	1.1	1	-	-
178	Ferimzone.Kasugamycin SC	1.1	1.1	1	-	-
179	Fludioxonil.Prochloraz SC	1.227	1.137	1.171	-	-
180	Hexaconazol.Tebuconazole EC	1	1.1	1.2	-	-
181	Bistrifluron.Emamectin benzoate WG	1	1	1.1	-	-
182	Acetamiprid.Buprofezin SC	1.281	1.127	1.315	-	-
183	Acetamiprid.Tebufozide WP	1.5	2	2.5	+	+
184	Fluazinam.Acetamiprid GR	1.4	1	0.9	-	-
185	Metalaxyl.Imidacloprid GR	1.1	1.2	1.2	-	-
186	Tebuconazole.Buprofezin WP	1.1	1.2	1.2	-	-
187	Tiadinil.Benfuracarb.Chlorantraniliprole GR	1	1	1	-	-
188	Metazosulfuron.Oxaziclomefone SC	1.1	1.5	1.5	-	-
189	Benzobicyclon.Carfentrazone ethyl.Penoxsulam ZC	1.1	1.2	1.1	-	-
190	Benfuresate.Carfentrazone ethyl, Penoxsulam GR	1.4	2.1	2.9	+	+
191	Benfuresate.Pyrimisulfan GR	1	2.3	3	+	+
192	Azimsulfuron.Benzobicyclon.Oxaziclomefone GR	0.3	0.3	0.6	-	-
193	Azimsulfuron.Benzobicyclon.Fentrazamide UG	1	1.1	1.4	-	-
194	Fentrazamide.Metazosulfuron DT	1.2	1.4	1.2	-	-
195	Pencycuron GR	1.5	1.4	1.4	-	-
196	Dinotefuran.Methoxyfenozide WG	0.9	1.2	1.3	-	-
197	Dinotefuran.Spinetoram WG	0.555	0.955	0.761	-	-
198	Abamectin.Sulfoxaflor SC	0.9	0.9	0.9	-	-
199	Acetamiprid.Lufenuron SC	0.9	2	2.6	+	+
200	Acetamiprid.Buprofezin SC	0.8	2.3	2.8	+	+
201	Glufosinate ammonium. MCPA SL	1.3	2.2	2.5	+	+

Table 5. Continued

No	Plant Protection Products	Stimulation Index (SI) according to test article concentrations			Prediction of skin sensitization	
		Low	Middle	High	multidoseLLNA BrdU-ELISA	rLLNA BrdU-ELISA
202	Bromobutide.Propyrisulfuron.Thiobencarb GR	1.124	1.298	1.038	-	-
203	Tefuryltrione.Triafamone GR	0.867	0.849	0.783	-	-
204	Azoxystrobin.Fludioxonil SC	1.053	1.027	1.414	-	-
205	Bentazone sodium. Glufosinate ammonium SL	1.1	1.2	1.5	-	-
206	Gibberellin A4+7 PA	1.36	1.959	3.839	+	+

Table 6. Retrospective Evaluation of the rLLNA BrdU-ELISA's Predictive Capacity for Skin Sensitization (n=206)

rLLNA BrdU-ELISA	
vs LLNA BrdU-ELISA	
Sensitivity % ^{a)}	90.9% (40/44)
Specificity % ^{b)}	100% (162/162)
Accuracy % ^{c)}	98.1% (202/206)

^{a)}Sensitivity(%)=[True Positive/(True Positive+False Negative)]*100
^{b)}Specificity(%)=[True Negative/(True Negative+False Positive)]*100
^{c)}Accuracy(%)=[(True Positive+True Negative)/Tested Materials]*100

과 비교 시 정확도 98.7%(465/471), 민감도 98.1%(312/318), 특이도 100% (153/153)을 보였다.

본 분석결과에서 아바멕틴·플로메토킨 액상수화제, 페리존·발리다마이신에이 액상수화제, 플라자설퓨론·엠시피에이 입상수화제, 사이플루메토펜·펜피록시메이트 액상수화제의 경우 기존 LLNA BrdU-ELISA법에서 감작성 양성 물질로 확인되었으나 rLLNA법에서 음성 물질로 확인되어 최종 민감도는 90.9%이었다. 이 물질들은 최고 농도에서 양성이 나타난 것이 아니라 중간 또는 최저 농도에서 양성 반응을 보인 농약이었다. 일반적으로 농약은 희석이 증가할수록 피부흡수율이 증가하는 경향이 있다고 알려져 있는데(EFSA, 2017), 본 4품목에서도 흡수율이 증가함에 따라 자극성이나 감작성 물질이 세포와 반응하여 고농도에서보다 낮은 농도에서 감작성 영향이 나타났을 거라 사료되었다.

rLLNA BrdU-ELISA에서 음성으로 예측된 4품목의 성분을 분석하면 아바멕틴·플로메토킨 액상수화제, 플라자설퓨론·엠시피에이 입상수화제, 사이플루메토펜·펜피록시메이트 액상수화제의 경우 피부감작성물질(구분1)의 투입비율이 약 9~17%이었다. 또한 페리존·발리다마이신에이 액상수화제는 피부감작성물질 구분1A가 0.2% 함유되어 화학물질의 분류 및 표시사항에 따르면(NICS, 2025) 모두 피부감작성 물질로 분류되는 농약들이었다.

국의 연구결과에 따르면 방시능 동위원소를 이용한 rLLNA 시험은 위음성률 1.9~3.3%를 보였다(Ezendam et al., 2013; ICCVAM, 2009). 이들 연구에서는 양성으로 예상되는 물질이 rLLNA시험에서 음성으로 확인될 시, 이를 확인하기 위해

물질의 물리화학적 특성, 구조적 특징, 독성유전체학적 정보 등 다양한 데이터를 활용해야 한다고 보고하고 있다. 또한 OECD 가이드라인 429에서는 rLLNA법은 피부감작성 음성을 예측하는데 활용될 수 있으며, 사용할 시에는 이에 대한 근거를 제시하도록 하고 있는데(OECD, 2010), 농약 품목의 피부감작성 성분 함량 정보가 그 근거로 활용될 수 있다고 사료되었다.

결론적으로 rLLNA법은 동물 사용을 줄이면서도 높은 특이도로 비감작성 물질을 평가할 수 있는 유용한 방법으로, 특히 국내 농약 품목 감작성 평가는 감작성 유무만을 판단하고 강도(potency)를 평가하지 않으므로(RDA, 2023) rLLNA (BrdU-ELISA 등)의 활용이 가능하리라 판단된다. 그러나 일부 물질에 대해서는 민감도의 한계가 있을 수 있으므로, 이를 보완할 수 있는 물질에 대한 물리화학적 및 독성학적 이해, 또는 최종 피부감작성 음성임을 확인 할 수 있는 비시험법과의 병행 등이 필요하다고 사료된다. 또한 농약 품목 등록을 위한 rLLNA법 활용을 위해서는 시험 가능성에 대한 사전 요건, 평가결과의 경계지점(border line) 해석, 위음성율에 대한 보완방법 등에 대한 명확한 지침이 마련되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ011784)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Author Information and Contributions

Youmi jo, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0009-0008-6733-7181>, Writing-original draft and conducting the experiments.

HaEun Lee, Residual Agrochemical Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-9840-7164>, Data analysis and Drafting the introduction part.

Ji-Young Shin, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0003-3177-161X>, Visualization.

So-Hye Hong, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-9958-5552>, Data analysis and Review.

Si Young Yang, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0009-0000-7308-969X>, Data analysis and Review.

Are-Sun You, Division of Animal Disease & Health, National Institute of Animal Science, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0001-7258-2626>, Literature review and investigation

Jina Oh, Research Policy Planning Division, Rural Development Administration, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-1166-4377>, Literature review and investigation

Mihye Jeong, Crop Production Technology Research Division, National Institute of Crop Science, Principal Researcher, <https://orcid.org/0009-0007-8724-1059>, Conceptualization and study design

Soojin Park, Toxicity and Risk Assessment Division, National Institute of Agricultural Sciences, Senior Researcher, <https://orcid.org/0000-0002-2522-3185>, Editing and proofreading, Project administration.*

이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

Literature Cited

- Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A, 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2(1):1-12.
- Anderson SE, Siegel PD, Meade BJ, 2011. The LLNA: a brief review of recent advances and limitations. *J. Allergy*, 2011: 424203.
- Cooper J, Dobson H, 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop. Protection.* 26(9):1337-1348.
- Daniel AB, Strickland J, Allen D, Casati S, Zuang V, et al., 2018. International regulatory requirements for skin sensitization testing. *Regul Toxicol Pharmacol.* 95:52-65.
- EFSA, 2017. Guidance on dermal absorption. <http://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7010093> (Accessed Feb.18.2025)
- EPA, 2011. Expansion of the traditional local lymph node assay for the assessment of dermal sensitization potential of end use pesticide products and adoption of a reduced protocol for the traditional LLNA(limit dose). <http://epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/use-local-lymph-node-assay-and-reduced-dose> (Accessed Feb.17.2025).
- EPA, 2024. Series 870-Health effects test guidelines. <http://epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-870-health-effects-test-guidelines> (Accessed Feb.17.2025).
- EU, 2013a. Commission regulation(EU) No 283/2013 Setting out the data requirements for active substances, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2013/284/oj/eng> (Accessed Feb.17.2025).
- EU, 2013b. Commission regulation(EU) No 284/2013 Setting out the data requirements for plant protection products, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2013/283/oj/eng> (Accessed Feb.17.2025).
- Ezendam J, Muller A, Hakkert BC, Lovern HV, 2013. Evaluation of the performance of the reduced local lymph node assay for skin sensitization testing. *Regul Toxicol Pharmacol.* 66(1): 66-71
- ICCVAM, 2009. Test method evaluation report The reduced murine local lymph node assay: an alternative test method using fewer animals to assess the allergic contact dermatitis potential of chemical and products. http://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/docs/immunotox_docs/llna-ld/tmer.pdf (Accessed Feb.17.2025).
- Jang Y, Kim JE, Jeong SH, Cho MH, 2014. Towards a strategic approaches in alternative tests for pesticide safety. *Toxicol Res.* 30:159-168.
- Kreiling R, Hollnagel HM, Hareng L, Eigler D, Lee MS, Griem P, Dreessen B, Kleber M, Albrecht A, Garcia C, Wendel A, 2008. Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem Toxicol.* 46(6):1896-904.
- Kim KH, Kabir E, Jahan SA, 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575: 525-535
- NICS, 2025. Regulation on Classification, Labelling, and Packaging of Chemicals. Osong, Korean. (In Korean)
- OECD, 2022. OECD TG 406 Skin sensitisation guinea pig maximisation test and buehler test. http://oecd.org/en/publications/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en.html (Accessed Feb.17.2025).
- OECD, 2010. OECD TG 429 Skin sensitisation: Local lymph node assay. http://oecd.org/en/publications/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en.html (Accessed Feb.17.2025).

OECD, 2010. OECD TG 442A Local lymph node assay: DA http://oecd.org/en/publications/test-no-442a-skin-sensitisation_9789264090972-en.html (Accessed Feb.17.2025)

OECD, 2018. OECD TG 442B Local lymph node assay: BrdU-ELISA or-FCM http://oecd.org/en/publications/test-no-442b-skin-sensitisation_9789264090996-en.html (Accessed Feb.17.2025).

OECD, 2023. OECD TG 497 Defined approaches for skin sensitisation. http://oecd.org/en/publications/guideline-no-497-defined-approaches-on-skin-sensitisation_b92879a4-en.html (Accessed Feb.17.2025).

RDA, 2023. Pesticide Control Act. Jeon-Ju. Korea. (In Korean)

Settivari RS, Gehen SC, Amado RA, Visconti NR, Boverhof DR, et al., 2015. Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. *Regul Toxicol Pharmacol.* 72(2):350-360.

Strickland J, Daniel AB, Allen D, Aguila C, Ahir S, et al., 2019. Skin sensitization testing needs and data uses by U.S. regulatory and research agencies. *Arch. Toxicol.* 93:273-291.

Strickland J, Truax J, Corvaro M, Settivari R, Henriquez J, et al., 2022. Application of defined approaches for skin sensitization to agrochemical products. *Front Toxicol.* DOI: 10.3389/ftox.2022.852856

● ●

농약의 피부감작성 평가를 위한 Reduced Local Lymph Node Assay(rLLNA) 적용 연구

조유미¹ · 이하은² · 신지영¹ · 홍소혜¹ · 양시영¹ · 유아선³ · 오진아⁴ · 정미혜⁵ · 박수진^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 독성위해평가과,

²농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 잔류화학평가과,

³농촌진흥청 국립축산과학원 가축질병방역과, ⁴농촌진흥청 연구정책과,

⁵농촌진흥청 국립식량과학원 생산기술개발과

요 약 농약에 의해 알레르기가 나타날 수 있으므로 피부감작성시험은 농약 등록을 위한 필수 시험이다. 기니피그를 이용한 시험법이 많이 사용되었으나 동물의 수와 고통에 대한 윤리적 문제가 제기되어 *in vitro*, *in chemico* 등 동물 대체시험법이 개발되었다. 하지만 농약 품목에 적용하기 어렵다는 한계가 있어 동물의 수와 고통을 경감시킨 마우스를 이용한 LLNA법이 주로 활용되고 있다. 본 연구에서는 기존 LLNA법과 고농도로만 투여하는 rLLNA를 비교하여, rLLNA를 농약 품목 평가에 활용 가능한지 확인하고자 하였다. 품목 10개를 선정하여 기니피그 시험법의 결과와 LLNA BrdU-ELISA, rLLNA BrdU-ELISA, rLLNA DA 결과를 비교하고 민감도(sensitivity), 특이도(specificity), 정확도(accuracy)를 산출하였다. 기니피그 시험법과 비교 시, rLLNA BrdU-ELISA는 민감도 100%(4/4), 특이도 83%(5/6), 정확도 90%(9/10)를 보였고, rLLNA DA법은 100%의 예측력을 보였다. 또한, 농약 등록평가에 활용된 LLNA BrdU-ELISA 206건을 분석한 결과 rLLNA BrdU-ELISA는 민감도 90.9%(40/44), 특이도 100%(162/162), 정확도 98.1%(202/206)를 나타냈다. 4개 품목에서는 기존 LLNA BrdU-ELISA에서 양성이었는데 rLLNA법에서는 음성으로 평가되었다. 이는 양성반응이 중간 또는 저농도에서만 나타난 경우였다. 본 연구를 통해서 rLLNA는 높은 특이도로 감작성 음성을 판단하는데 유용하나 민감도의 한계가 있으므로 농약 평가에서의 적용 시 비시험법과의 병행, rLLNA 활용시의 전제 요건 등 지침이 마련되어야 할 것이다.

색인어: 농약, rLLNA, 피부감작성

● ●