

Untersuchung von Textilfarbstoffen im Local Lymph Node Assay (LLNA)

I. Haist, D. Brummer, A. Albrecht

**Forschung
Projekt F 1877**

**Forschung
Projekt F 1877**

I. Haist
D. Brummer
A. Albrecht

**Untersuchung von Textilfarbstoffen
im Local Lymph Node Assay (LLNA)**

Dortmund/Berlin/Dresden 2007

Diese Veröffentlichung ist der Abschlussbericht zum Projekt „Untersuchung repräsentativer Neustoffe (Textilfarbstoffe) im LLNA zur Bestimmung der hautsensibilisierenden Wirkungsstärke“ - Projekt F 1877 - im Auftrag der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Das Projekt wurde fachlich begleitet von: Dr. Ulrich Föst, BAuA; Dr. Peter Griem, Clariant GmbH; Dr. Angela Möller, Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz; Heidi Ott, BAuA; Dr. Anette Weber, DyStar Textilfarben GmbH & Co. Deutschland KG.

Autoren: Dr. Ingrid Haist
Dr. Daniela Brummer
Dr. Achim Albrecht

BSL BIOSERVICE
Scientific Laboratories GmbH
Behringstr. 6, 82152 Planegg

Herausgeber: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
Friedrich-Henkel-Weg 1-25, 44149 Dortmund
Telefon: 0231 9071-0
Telefax: 0231 9071-2454
E-Mail: poststelle@baua.bund.de
Internet: www.baua.de

Berlin:
Nöldnerstr. 40-42, 10317 Berlin
Telefon: 030 51548-0
Telefax: 030 51548-4170

Dresden:
Proschhübelstr. 8, 01099 Dresden
Telefon: 0351 5639-50
Telefax: 0351 5639-5210

Alle Rechte einschließlich der fotomechanischen Wiedergabe und des auszugsweisen Nachdrucks vorbehalten.

ISBN 978-3-88261-053-6

Inhaltsverzeichnis	Seite
Kurzreferat	4
Abstract	5
Résumé	6
Einleitung	7
Methodische Grundlagen des LLNA	8
Versuchsdurchführung	9
Testsubstanzauswahl	9
Eingesetzte Konzentrationen	9
Positivkontrolle	9
Testdurchführung	10
Ergebnisse	12
Diskussion	15
Ausblick	16
Introduction	17
Methodical principle of the LLNA	18
Test Procedure	19
Selection of Test Substances	19
Concentrations used	19
Positive Control	19
Test Procedure	20
Results	22
Discussion	25
Conclusions	26
Anhänge	27
Anhang 1: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit YELLOW E-JD 3442	
Anhang 2: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit C.I. Reactive Red 231	
Anhang 3: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit Produkt P-4G	
Anhang 4: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit C.I. Reactive Yellow 174	
Anhang 5: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit NAVY 14 08 723	
Anhang 6: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit Dispersionsrot 2754	
Anhang 7: Prüfbericht Stabilität der Prüfsubstanzen im Vehikel	

Untersuchung von Textilfarbstoffen im Local Lymph Node Assay (LLNA)

Kurzreferat

Die vorliegende Untersuchung umfasst die vergleichende Testung von 6 exemplarisch ausgewählten Textilfarbstoffen im Local Lymph Node Assay (LLNA). Diese Stoffe sind angemeldete Neustoffe nach dem Chemikaliengesetz. Ziel der Untersuchungen war es, Aussagen über die sensibilisierende Wirkstärke dieser Stoffe im Testsystem Local Lymph Node Assay zu erhalten. Alle 6 untersuchten Neustoffe waren in der Vergangenheit bereits im Meerschweinchen-Maximierungstest nach Magnusson und Kligman untersucht und als hautsensibilisierend eingestuft worden. Die zusätzliche Untersuchung im LLNA wurde durchgeführt, um die relativen Wirkstärken des sensibilisierenden Potentials der Textilfarbstoffe bestimmen und gegeneinander vergleichen zu können. Hierfür wurden die 6 Farbstoffe in einem parallelen Versuchsansatz in identischen Konzentrationen (soweit technisch möglich) und in demselben Vehikel (Aceton/Olivenöl, 3+1 (v/v)) untersucht. Da es sich um einen behördlich geforderten, arbeitsschutzrechtlich notwendigen Doppelversuch handelte, konnte diese Studie als anzeigepflichtig im Sinne des § 8 Abs. 7, Art. 1a Tierschutzgesetz betrachtet werden.

Nach den in der OECD Guideline 429 (OECD Guidelines for Testing of Chemicals, number 429 "Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay" (adopted: 24th April 2002)) vorgegebenen Kriterien waren 3 der getesteten Farbstoffe als sensibilisierend anzusehen, 3 der Stoffe als nicht sensibilisierend. Für keine der 6 Substanzen konnte der klassische EC₃-Wert über lineare Interpolation berechnet werden, da entweder alle getesteten Konzentrationen Stimulationsindices über 3 oder aber Stimulationsindices unter 3 zeigten. Deshalb wurde für die positiven Substanzen versucht, näherungsweise einen „EC₃-analogen Wert“ zu bestimmen.

Schlagwörter:

Local Lymph Node Assay (LLNA), Textilfarbstoffe, Wirkstärke; OECD 429, EC₃, Stimulationsindex, hautsensibilisierende Potenz

Testing of textile dyes in the local lymph node assay (LLNA)

Abstract

The present comparative study comprises the analysis of 6 representative new substances (textile dyes). The purpose of these studies was to derive information about the skin sensitizing potency of the selected textile dyes in the local lymph node assay (LLNA). All 6 textile dyes had previously been tested under the notified new substance regulation (German Chemicals Act) in Magnusson-Kligman maximization test in guinea pigs and had been characterized as skin sensitizing.

The additional testing in the LLNA was performed in order to assess the relative sensitization potency of the textile dyes. For this purpose, the 6 textile dyes were studied in parallel, using identical concentrations (as far as technically possible) and the same vehicle. Since this study involved repetition of animal testing notification according to § 8 section 7, article 1a of the German Animal Welfare Act was required.

According to the criteria of OECD guideline 429 (OECD Guidelines for Testing of Chemicals, number 429 "Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay" (adopted: 24th April 2002)), 3 of the tested substances are considered skin sensitizing, whereas 3 are considered non-sensitizing. The EC₃ values could not be calculated by linear interpolation for any of the 6 substances, since all concentrations either yielded stimulation indices greater than 3 or less than 3. Therefore, an attempt was undertaken to estimate EC₃-values for the positive substances.

Key words:

Local lymph node assay (LLNA), textile dyes, potency, OECD 429, EC₃ stimulation index, skin-sensitization potential

Détermination du pouvoir sensibilisant cutané de colorants textile par l'essai sur ganglions lymphatiques locaux (Local lymph node assay ou LLNA)

Résumé

La présente étude comparative comprend l'évaluation de 6 nouvelles substances exemplaires choisies (colorants textile) par la méthode du LLNA. Le but de cette étude était de définir le pouvoir prédictif par le test LLNA de l'induction d'une sensibilisation cutanée par ces matériaux. Les 6 matériaux testés étaient positifs dans d'autres batteries de tests (Sensibilisation d'après Magnusson/Klingmann) et classés comme sensibilisants.

L'étude complémentaire avec le LLNA a été réalisée afin de déterminer les pouvoirs sensibilisants relatifs des colorants textile et de les comparer les uns aux autres. Pour cela, les 6 substances ont été testées en parallèle à une concentration identique (sauf contrainte technique) dans le même vecteur. Etant donné que ceci représentait une étude exigée des experts et indispensable à l'établissement des droits du travail en matière de protection, cette étude pouvait être classée comme assujettie à publication en vertu du § 8 Abs. 7 Art. 1a du TSCHG (Législation allemande sur la protection animale).

D'après les critères figurant dans la ligne directrice OCDE 429 (OECD Guidelines for Testing of Chemicals, number 429 "Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay" (adopted: 24th April 2002)), 3 des 6 substances testées pouvaient être classées comme sensibilisantes, les 3 autres comme non-sensibilisantes. La valeur classique EC₃ ne pouvait pas être définie par interpolation linéaire pour aucune des 6 substances, car les indices de stimulations étaient supérieurs ou inférieurs à 3 pour toutes les concentrations testées. Aussi, une valeur analogue de l'EC₃ fut déterminée pour les substances positives.

Mots clés:

Essai sur ganglions lymphatiques locaux (Local lymph node assay ou LLNA), colorants textile, pouvoir, OCDE 429, EC₃, indice de stimulation, pouvoir sensibilisant cutané

Einleitung

Es ist bekannt, dass die hautsensibilisierende Wirkung verschiedener Chemikalien sehr unterschiedlich sein kann.

Der Local Lymph Node Assay (LLNA), der mittlerweile auch als ‚stand-alone-test‘ zur Untersuchung des hautsensibilisierenden Potentials anerkannt ist, kann durch Testung verschiedener Konzentrationen Auskunft über die relative Wirkstärke von Einzelsubstanzen geben. Im LLNA wird für jede getestete Substanzkonzentration ein Stimulationsindex (SI) ermittelt, der die Proliferationsrate der Lymphozyten im Vergleich zur Vehikelkontrolle angibt. Bei einem Stimulationsindex ≥ 3 wird die Substanz nach der vorgegebenen Richtlinie OECD 429 (OECD Guideline for the Testing of Chemicals; Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay) als positiv angesehen. Anhand dieser SI-Werte kann für eine Substanz der EC₃-Wert errechnet werden. Dieser gibt diejenige Konzentration der Prüfsubstanz an, bei der eine Verdreifachung der Proliferationsrate im Vergleich zur Vehikelkontrolle erfolgt. Allerdings liegen noch keine EU-weit abgestimmten Bewertungsmaßstäbe vor, um anhand dieser ermittelten EC₃-Werte konkrete Klassifizierungen (z.B. schwach, mittel, stark) der Sensibilisierungsstärke von Substanzen vorzunehmen. Vorschläge hierzu sind in einem Forschungsbericht der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) enthalten (Akkan et al., Beurteilung der Wirkstärke hautsensibilisierender Chemikalien anhand des Local Lymph Node Assay, Fb 1009; Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; Dortmund/Berlin/Dresden 2004).

Auslöser für die Durchführung des Projektes war die Erfahrung der BAuA, dass im Zusammenhang mit den nach Chemikaliengesetz angemeldeten Stoffen etwa jeder vierte Stoff sensibilisierend ist. Gleichzeitig zeigte ein in den 90er Jahren durchgeführtes Branchenprojekt der BAuA in der Textilindustrie, dass in diesem Bereich hohe dermale Expositionen vorliegen und persönliche Schutzmaßnahmen nicht die wünschenswerte Akzeptanz fanden. Im Rahmen der Risikobewertungen gemäß Richtlinie 93/67/EWG¹ führt dies zu der Schlussfolgerung, dass Maßnahmen zu ergreifen wären. Ziel des vorliegenden Projektes war, exemplarisch an 6 Textilfarbstoffen die hautsensibilisierende Potenz im LLNA zu bestimmen. Die auf der Grundlage des o.g. Forschungsberichtes der BAuA (Akkan et al., 2004) ermittelten Potenzaussagen sollen im Anschluss zur Ableitung differenzierter Arbeitsschutzmaßnahmen herangezogen werden.

¹ Richtlinie 93/67/EWG der Kommission vom 20. Juli 1993 zur Festlegung von Grundsätzen für die Bewertung der Risiken für Mensch und Umwelt von gemäß der Richtlinie 67/548/EWG des Rates notifizierte Stoffen

Methodische Grundlagen des LLNA

Der „Local Lymph Node Assay“ (LLNA) stellt ein relativ neues prädiktives Testsystem zur Erfassung eines hautsensibilisierenden Potentials von Chemikalien dar. Im Gegensatz zu biphasischen Versuchprotokollen (Induktion (engl. Sensitization) / Auslösung (engl. Challenge)) umfasst der LLNA nur die erste Phase (Induktion). Er orientiert sich an den immunologischen Mechanismen der Sensibilisierung und ermöglicht über die Messung der in vivo durch die Chemikalie induzierten Lymphknotenzellproliferation eine objektive und exakte Messung der Immunreaktion. 1992 wurde der LLNA in die Richtlinien der OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) für die immuntoxikologische Risikoanalyse neuer Chemikalien aufgenommen. Seit 2002 gibt es eine final verabschiedete eigene OECD-Guideline (OECD 429), in der der LLNA beschrieben wird.

Im LLNA werden CBA/Ca Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanz in einem geeigneten Vehikel an den dorsalen Oberflächen beider Ohren behandelt. Eine Kontrollgruppe erhält nur das Vehikel. Fünf Tage nach der ersten Behandlung erhalten die Mäuse eine intravenöse Injektion von 20 μCi ^3H -Methyl-Thymidin. Fünf Stunden später werden die Tiere schmerzlos getötet. Die drainierenden aurikulären Lymphknoten werden präpariert und für jedes Tier gepoolt. Aus den Lymphknoten werden Einzelzellsuspensionen hergestellt und diese durch Zugabe von Trichloressigsäure über Nacht bei 4°C präzipitiert. Anschließend wird im Präzipitat durch ^3H -Szintillationsmessung die Thymidininkorporation in die DNA als Maß der Lymphknotenzellproliferation ermittelt. Der Effekt der Testsubstanz auf die Proliferation der Lymphknotenzellen wird als Stimulationsindex (SI), d.h. als Verhältnis der gemessenen Radioaktivität der Testgruppe zu der der Vehikelkontrolle für jede Konzentration berechnet. Wenn mindestens eine Konzentration der Testsubstanz einen SI >3 und mindestens eine weitere einen SI <3 erbracht hat, kann durch lineare Interpolation der EC_{30} -Wert errechnet werden, der die (rechnerische) Konzentrationen angibt, bei der ein SI von 3 erreicht wird.

Versuchsdurchführung

Testsubstanzauswahl

Im vorliegenden Projekt wurden 6 Textilfarbstoffe aus den Neuanmeldungen nach dem Chemikaliengesetz ausgewählt, die sich bereits im Meerschweinchen-Maximierungstest nach Magnusson und Kligman als hautsensibilisierend erwiesen hatten und mit R43 gekennzeichnet werden.

Unter der Versuchsnummer 053226 wurden folgende Substanzen getestet.

Tab. 1 Liste der untersuchten Textilfarbstoffe

Versuchsnummer	Textilfarbstoff
053226A	YELLOW E-JD 3442
053226B	C.I. Reactive Red 231
053226C	Produkt P-4G
053226D	C.I. Reactive Yellow 174
053226E	NAVY 14 08 723
053226F	Dispersionsrot 2754

Eingesetzte Konzentrationen

Anhand von Löslichkeitsversuchen wurden für alle 6 Textilfarbstoffe die höchsten, noch technisch applizierbaren Konzentrationen ermittelt. Hierbei konnte für alle Farbstoffe, außer Dispersionsrot 2754, die höchste noch applizierbare Suspensionskonzentration mit 15% festgelegt werden. Für Dispersionsrot 2754 wurde als höchste applizierbare Konzentration 9% ermittelt.

Alle Testsubstanzen wurden, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten, in identischen Konzentrationen (soweit technisch möglich) in demselben Vehikel (Aceton/Olivenöl, 3+1 (v/v)) in parallelen Tests untersucht. Um eine möglichst große Spannbreite der eingesetzten Konzentrationen zu erreichen, wurden 4 verschiedene Konzentrationen zur Testung ausgewählt (siehe Tab. 2). Untersuchungen zur Stabilität der Prüfsubstanzen im Vehikel sind in Anhang 7 dargestellt.

Positivkontrolle

Als Positivkontrollsubstanz wurde *p*-Phenylendiamin (CAS-Nummer 106-50-3) eingesetzt. Eine Gruppe von 5 Mäusen wurde mit 1% *p*-Phenylendiamin in Aceton/Olivenöl, 3+1 (v/v) parallel zu den anderen Testgruppen behandelt.

Tab. 2 Liste der eingesetzten Konzentrationen der Textilfarbstoffe

Textilfarbstoff	Konzentrationen im Test (% in AOO (Aceton/Olivenöl (3+1)))			
YELLOW E-JD 3442	15	9	3	1
C.I. Reactive Red 231	15	9	3	1
Produkt P-4G	15	9	3	1
C.I. Reactive Yellow 174	15	9	3	1
NAVY 14 08 723	15	9	3	1
Dispersionsrot 2754	Nicht getestet*	9	3	1

*Dispersionsrot 2754 konnte technisch bedingt nicht höher als 9% appliziert werden

Testdurchführung

Alle 6 Textilfarbstoffe wurden im Local Lymph Node Assay gemäß den Vorgaben der Richtlinie OECD 429 und unter Einhaltung der Guten Labor Praxis getestet.

Topische Applikation

Nach Messung der Ohrdicke wurde jede Maus mit 25 µl der Testsubstanz in Vehikel beidseitig durch topische Applikation auf die dorsale Ohrhaut behandelt. Die Applikation wurde täglich über einen Zeitraum von 3 Tagen durchgeführt.

Administration von ³H-Methyl-Thymidin

Fünf Tage nach der ersten Applikation wurde allen Tieren intravenös (Schwanzvene) 250 µl ³H-Methyl-Thymidin injiziert. Bei einer spezifischen Aktivität der Lösung von 80 µCi/ml entspricht dieses einer Dosis von 20 µCi/Tier.

Präparation der Zellsuspension

Ungefähr 5 Stunden nach der ³H-Methyl-Thymidin-Injektion wurden alle Tiere schmerzlos getötet, die Ohrdicken gemessen und die drainierenden aurikulären Lymphknoten entnommen. Nach Erfassung des Einzelgewichts der Lymphknoten wurde für jedes Tier eine Zellsuspension der Lymphknotenzellen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) hergestellt. Hierfür wurden die Lymphknoten vorsichtig durch eine Polyamid Gaze (200 mesh) gedrückt. Die Gaze wurde mit PBS gewaschen und die Suspension zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

Zur Präzipitation der Makromoleküle wurden die Pellets resuspendiert und anschließend in ca. 3 ml einer 5% TCA (Trichloressigsäure) bei ca. 4°C über Nacht inkubiert. Jedes Präzipitat wurde zentrifugiert, in 1 ml 5% TCA resuspendiert und in Szintillationsgefäße mit 10 ml Szintillationscocktail überführt.

Detektion von inkorporiertem ³H-Methyl-Thymidin

Die ³H-Methyl-Thymidin-Inkorporation wurde in einem Szintillationszähler (Tricarb) gemessen und als Zahl (disintegrations per minute, DPM) dargestellt. Gleichzeitig wurde die Hintergrundzählrate des Gerätes bestimmt. Die Detektion der vorhandenen Radioaktivität wurde für jedes Tier einzeln durchgeführt.

Auswertung der Ergebnisse

Die proliferative Reaktion der Lymphknotenzellen wurde als das Verhältnis der DPM-Werte der Testgruppen zu dem der Kontrollgruppe errechnet. Von den Werten DPM/Lymphknoten wurde der Hintergrundwert abgezogen. Der Stimulationsindex (SI), der das Verhältnis der um den Hintergrund korrigierten DPM-Werte von Testsubstanz zur Vehikelkontrolle (Negativkontrolle) darstellt, wurde für jede Konzentration berechnet.

Eine Testsubstanz wird dann als sensibilisierend bezeichnet, wenn zumindest eine der getesteten Konzentrationen einen Anstieg der ³H-Methyl-Thymidin-Inkorporation zeigt, der den Wert der Negativkontrolle um mindestens das Dreifache übersteigt (Stimulationsindex größer oder gleich 3).

Detaillierte Angaben zu den Prüfbedingungen jeder Einzelprüfung sind in den Anhängen 1 bis 6 (finalisierte Prüfberichte) aufgeführt.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der sensibilisierenden Eigenschaften der Textilfarbstoffe im LLNA haben sich bei den untersuchten Konzentrationen 3 der getesteten Substanzen (C.I. Reactive Red 231, C.I. Reactive Yellow 174 und NAVY 14 08 723) als sensibilisierend und 3 der Substanzen (YELLOW E-JD 3442; Produkt P-4G und Dispersionsrot 2754) als nicht sensibilisierend erwiesen (siehe Tab. 3).

Für die Positivkontrolle (1% p-Phenylendiamin) wurde ein mittlerer Stimulationsindex von 9,9 ermittelt, der innerhalb des Bereiches der historischen Kontrollen von 8.5 ± 2.4 lag.

Tab. 3 Ermittelte Mittelwerte der Stimulationsindices

Textilfarbstoff	Mittelwerte der Stimulationsindices (Angaben in Klammer: Prüfsubstanzkonzentrationen; % in AOO (Aceton/Olivenöl (3+1)))			
YELLOW E-JD 3442	0,9 (15)	0,9 (9)	0,8 (3)	1,0 (1)
C.I. Reactive Red 231	4,6 (15)	4,4 (9)	3,4 (3)	4,8 (1)
Produkt P-4G	2,5 (15)	1,9 (9)	2,5 (3)	2,4 (1)
C.I. Reactive Yellow 174	7,8 (15)	5,5 (9)	3,3 (3)	4,2 (1)
NAVY 14 08 723	5,2 (15)	5,7 (9)	4,8 (3)	5,1 (1)
Dispersionsrot 2754	n.d. *	1,0 (9)	0,9 (3)	1,0 (1)

*Nicht durchgeführt

Für keine der 6 Substanzen konnte ein EC_3 -Wert mittels linearer Interpolation (Basketter et al., 1999)² ermittelt werden, da entweder alle getesteten Konzentrationen Stimulationsindices über 3 oder aber unter 3 verursachten. Eine klare Dosiswirkungsbeziehung der 3 positiv getesteten Textilfarbstoffe konnte nicht festgestellt werden.

Deswegen wurde für die 3 positiv getesteten Substanzen versucht, näherungsweise einen „ EC_3 -analogen Wert“ zu ermitteln (siehe Tab. 4). Dieser wurde durch lineare Extrapolation auf den Koordinatenursprung (SI=1 bei Konzentration=0) ausgehend vom Stimulationsindex der jeweils niedrigsten geprüften Konzentration ermittelt (siehe Fb 1009 der Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; Akkan et al., 2004).

² A Comparison of Statistical Approaches to the Derivation of EC_3 Values from Local Lymph Node Assay Dose Responses (Basketter et al.; Journal of applied Toxicology; J. Appl. Toxicol. 19, 261-266 (1999))

Die Berechnung des „EC₃-analogen Wertes“ ist jedoch mit erheblichen Unsicherheiten behaftet, da die positiv getesteten Prüfsubstanzen keine klare Dosiswirkungsbeziehung aufweisen und daher unklar ist, ob die niedrigste getestete Konzentration nahe an dem Punkt liegt, an dem die Dosiswirkungskurve vom Plateau Richtung Koordinatenursprung abknickt. Da diese Farbstoffe jedoch bereits bei Prüfkonzentrationen von 1% einen Stimulationsindex größer 3 zeigten, wären sie entsprechend des Vorschlages von Akkan et al. (2004, Fb 1009 der BAuA) bereits als mindestens „stark sensibilisierend“ anzusehen.

Tab. 4 Abgeschätzte EC₃-Werte

Textilfarbstoff	„EC ₃ -analoger Wert“ (in %)
C.I. Reactive Red 231	0,53
C.I. Reactive Yellow 174	0,63
NAVY 14 08 723	0,49

Zusätzlich wurde in den durchgeführten Assays am Versuchsende das Gewicht der Einzelymphknoten ermittelt, da die Erhöhung der Lymphknotengewichte einen zweiten zusätzlichen Endpunkt in der Ermittlung der sensibilisierenden Eigenschaften der Testsubstanzen darstellt. Die Einzelgewichte wurden anschließend gruppenweise gemittelt (siehe Tab. 5).

Tab. 5 Ermittelte durchschnittliche Lymphknotengewichte

Textilfarbstoff	Gemittelte Lymphknotengewichte (in mg) (Angaben in Klammer: Prüfsubstanzkonzentrationen; % in AOO (Aceton/Olivenöl (3+1)))			
YELLOW E-JD 3442	2,8 (15)	2,5 (9)	2,4 (3)	2,8 (1)
C.I. Reactive Red 231	4,1 (15)	3,7 (9)	3,9 (3)	3,9 (1)
Produkt P-4G	3,0 (15)	2,7 (9)	3,1 (3)	3,3 (1)
C.I. Reactive Yellow 174	4,7 (15)	4,5 (9)	3,7 (3)	3,9 (1)
NAVY 14 08 723	4,1 (15)	4,8 (9)	4,2 (3)	3,9 (1)
Dispersionsrot 2754	* n.d.	3,2 (9)	3,1 (3)	2,9 (1)
Vehikelkontrolle	2,6 (100% AOO (Aceton/Olivenöl (3+1)))			

*Nicht durchgeführt

Zur Erfassung eines irritativen Potentials der Textilfarbstoffe, das im LLNA unter Umständen zu einer falsch positiven Reaktion führen könnte, wurde als weiterer Endpunkt die Zunahme der Ohrdicken im Versuchsverlauf ermittelt. Hierzu wurden zu Versuchsbeginn (vor der ersten Behandlung) sowie am Versuchsende die Ohrdicken der Tiere einzeln gemessen. Anschließend wurden die Ergebnisse gruppenweise gemittelt (siehe Tab. 6).

Tab. 6 Ermittelte durchschnittliche Ohrdicken

Textilfarbstoff	Gemittelte Ohrdicken (μm) am Versuchsanfang versus Versuchsende (Angaben in Klammer: Prüfsubstanzkonzentrationen; % in AOO (Aceton/Olivenöl (3+1)))			
YELLOW E-JD 3442	200; 210 (15)	180; 190 (9)	190; 190 (3)	200; 210 (1)
C.I. Reactive Red 231	200; 210 (15)	200; 210 (9)	190; 190 (3)	200; 200 (1)
Produkt P-4G	200; 200 (15)	210; 210 (9)	200; 200 (3)	210; 220 (1)
C.I. Reactive Yellow 174	210; 220 (15)	210; 210 (9)	200; 210 (3)	220; 220 (1)
NAVY 14 08 723	210; 210 (15)	210; 210 (9)	200; 200 (3)	210; 210 (1)
Dispersionsrot 2754	* n.d.	210; 210 (9)	210; 210 (3)	210; 210 (1)
Vehikelkontrolle	200; 200 (100% AOO (Aceton/Olivenöl (3+1)))			

*Nicht durchgeführt

Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung des hautsensibilisierenden Potentials von Textilfarbstoffen im LLNA haben sich 3 der Textilfarbstoffe als positiv und 3 als negativ erwiesen. Dieses Ergebnis widerspricht teilweise den im Meerschweinchen-Maximierungstest nach Magnusson und Kligman (GPMT) gefundenen Ergebnissen, nach denen alle 6 Substanzen als hautsensibilisierend anzusehen sind. Die für die beobachtete Diskrepanz in Frage kommenden Ursachen stehen zur Diskussion. Da die GPMT teilweise bereits vor bis zu 20 Jahren durchgeführt wurden, wurde seitens der Hersteller vermutet, dass die damals untersuchten Substanzchargen möglicherweise nicht mit der gleichen hohen Reinheit vorlagen wie die aktuellen, im LLNA getesteten Substanzchargen. Ferner wurden für die im LLNA negativ getesteten Substanzen in den früher durchgeführten GPMT keine Hautreaktionen mit Scores größer 1 gefunden. Somit zeigten sich in diesen Untersuchungen allergische Hautreaktionen mit eher geringer Stärke, wenngleich oft bei einem hohen Prozentsatz der getesteten Tiere. Allerdings wies auch eine im LLNA positiv getestete Substanz im GPMT keine Scores größer 1 auf. Da beim Übergang vom GPMT zum LLNA nicht nur der getestete Endpunkt wechselt (von der allergischen Hautreaktion (immunologische Zweitantwort nach Challenge) im Meerschweinchen zur Lymphknotenproliferationsreaktion (immunologische Erstantwort während der Induktion) in der Maus), sondern auch die Spezies, kann letztlich auch ein speziesspezifischer Unterschied in der Reaktion des Immunsystems, und somit ein durch die Methode bedingtes unterschiedliches Ergebnis im LLNA und GPMT nicht ausgeschlossen werden.

Eine Berechnung des EC₃-Wertes im LLNA durch lineare Interpolation (Basketter et al. 1999) konnte für keine der Substanzen durchgeführt werden. Deswegen wurde für die 3 positiven Substanzen, bei denen die Stimulationsindices für die getesteten Konzentrationen alle über 3 lagen, versucht, näherungsweise einen „EC₃-analogen Wert“ durch lineare Extrapolation zu ermitteln (siehe Fb 1009 (Beurteilung der Wirkstärke hautsensibilisierender Chemikalien anhand des Local Lymph Node Assay) der Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Akkan et al., 2004):

Tab. 7 EC₃-analogue Werte

Textilfarbstoff	„EC ₃ -analoger Wert“ (in %)
C.I. Reactive Red 231	0,53
C.I. Reactive Yellow 174	0,63
NAVY 14 08 723	0,49

Nach den Vorschlägen von Akkan et al. (2004) sowie der Sensitization Expert Group (EC SEG, 2003) (siehe Fb 1009 (Beurteilung der Wirkstärke hautsensibilisierender Chemikalien anhand des Local Lymph Node Assay) der Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin) würden diese Substanzen somit als „stark sensibilisierend“ angesehen werden (siehe Tab. 8).

Tab. 8 Vorschlag zur Kategorisierung von sensibilisierenden Stoffen nach ihrer Wirkstärke (aus Fb 1009 (Beurteilung der Wirkstärke hautsensibilisierender Chemikalien anhand des Local Lymph Node Assay, Seite 152; Tab. 9.6)

Eingruppierung	EC ₃ im LLNA (%)
Klasse 1 ,sehr stark sensibilisierend‘	≤ 0.2
Klasse 2 , stark sensibilisierend‘	> 0.2 - ≤ 2.0
Klasse 3 ,mäßig sensibilisierend‘	> 2.0 - ≤ 20
Klasse 4 ,schwach sensibilisierend‘	> 20

Der „EC₃-analoge Wert“ ist jedoch mit Unsicherheiten behaftet, da beispielsweise keine klare Dosiswirkungsbeziehung vorliegt.

Die Ergebnisse der Messung der Lymphknotengewichte, die als zweiter Endpunkt für eine primäre Immunantwort im LLNA erfasst wurde, unterstützen die Ergebnisse der Proliferationsmessung.

Im LLNA kann es bei einer Testsubstanz, die in der verwendeten Konzentration eine lokale Hautirritation auslöst, zu einer Überlagerung der durch die Hautirritation im drainierenden Lymphknoten ausgelösten Proliferation und der durch eine spezifische Immunantwort ausgelösten Proliferation kommen. Ein solcher Effekt konnte im vorliegenden Versuch weitgehend ausgeschlossen werden, da sich eine Hautirritation in der Regel in einer lokalen Zunahme der Hautdicke äußert und eine derartige Verdickung der Ohren im Test nicht festgestellt wurde. Hieraus ist der Schluss zu ziehen, dass die beobachteten Reaktionen in den drainierenden Lymphknoten auf spezifische Immunreaktionen und nicht auf unspezifische Irritationsreaktionen zurückzuführen sind.

Ausblick

Um eine genauere Charakterisierung der hautsensibilisierenden Potenz der 3 positiv getesteten Textilfarbstoffe zu erhalten, müsste für die untersuchten Substanzen der Versuchsansatz (LLNA) unter Verwendung von niedrigeren Konzentrationen wiederholt werden. Da dies in unmittelbarer Zukunft nicht geplant ist, wurde für diese Substanzen versucht, näherungsweise einen „EC₃-analogen Wert“ abzuschätzen. Diese Werte weisen die positiv getesteten Stoffe als mindestens „stark hautsensibilisierend“ aus. Angesichts dieses Ergebnisses sollen differenzierte Arbeitsschutzmaßnahmen für den Umgang mit diesen Stoffen abgeleitet werden.

Introduction

It is a well known fact that the skin sensitizing effect of chemicals can vary strongly from one chemical substance to another. The Local Lymph Node Assay (LLNA), which in recent times has become accepted as a „stand-alone-test“ for the determination of a skin sensitising potential, also has the ability to determine the relative potency of individual substances when different concentrations are tested. In the Local Lymph Node Assay the proliferation rate of lymphocytes in treated groups compared to that in the vehicle control group, termed the Stimulation Index (SI), is determined for each concentration of test item. A substance will be regarded as positive, according to the specified OECD Guideline 429 (OECD Guideline for the Testing of Chemicals; Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay), if the Stimulation Index is ≥ 3 . Based on the SI the EC₃-value, which indicates the specific test substance concentration at which there is a three-fold increase of the proliferation rate compared to the vehicle control, can be calculated. However, there is still no consensus in the EU on an evaluation standard for a specific classification system (slight, moderate, strong) for the sensitizing potency of test substances based on these derived EC₃-values. A proposal has been made in a research report of the Federal Institute for Occupational Safety and Health (BAuA, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin) (Akkan et al., Beurteilung der Wirkstärke hautsensibilisierender Chemikalien anhand des Local Lymph Node Assay, Fb 1009; Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; Dortmund/Berlin/Dresden 2004).

This project was initiated due to the experience of the BAuA that approximately every fourth substance, notified according to the German Chemicals Act, is classified as a sensitizer. At the same time a project of the BAuA in the textile industry in the 1990's showed that in this industry a high degree of dermal exposure is present and personal safety measures were not as accepted as requested. Within the framework of risk assessment according to Directive 93/67/EEC¹ the conclusion has to be drawn that appropriate measures should be taken. The aim of the present study was to determine the skin sensitizing potency of 6 textile dyes. In the following, the assessment of the various potencies, which were determined on the basis of the above mentioned BAuA research report (Akkan et al., 2004), shall serve to deduce differentiated measures for workplace safety.

¹ Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993 laying down the principles for assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC

Methodical principle of the LLNA

The Local Lymph Node Assay (LLNA) is a relatively new predictive test system for the determination of the skin sensitizing potential of chemicals. In contrast to biphasal study protocols (sensitization/ challenge), the Local Lymph Node Assay contains only the first phase (induction). The LLNA orients itself according to the immunological mechanisms of sensitization and enables an objective and exact measurement of the immune reactivity by measurement of the *in vivo*, chemically-induced lymph node cell proliferation. In 1992 the LLNA was implemented into the Guidelines of the OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) for the risk analysis of new chemicals. Since 2002 the OECD-Guideline 429 has been adopted in which the LLNA is described.

In the LLNA test groups of CBA/Ca mice are treated on three consecutive days with different concentrations of the test substance in a suitable vehicle on the dorsal surface of both ears. A control group is treated with the vehicle only. Five days after the first application the mice receive an intravenous injection of 20 μCi ^3H -methyl-thymidine. Five hours later the mice are killed without pain. The draining „auricular lymph nodes“ are excised and pooled for each animal. A single cell suspension of pooled lymph node cells is prepared and precipitated overnight by addition of trichloro acetic acid at 4°C. Afterwards the thymidine incorporation into the DNA, as a measure of lymph node cell proliferation, is determined by ^3H -scintillation measurement in the precipitate. The Stimulation Index (SI), defined as the relation between the measured radioactivity in the test and control group is calculated for each concentration as a measure of the effect of the test substance on the proliferation of lymph node cells. If at least one concentration of test substance caused an $\text{SI} > 3$ and at least one concentration caused an $\text{SI} < 3$, the $\text{EC}_{3\%}$ -value which represents the (calculated) concentration at which the SI is equal to 3, can be determined.

Test Procedure

Selection of Test Substances

In the present study 6 textile dyes, that had previously been characterized as skin sensitizing in the guinea pig maximization test according to Magnusson and Kligman, and were labeled with R43, were chosen from the newly registered substances according to the German Chemicals Act.

The substances listed in table 1 were tested in project 053226.

Table 1 List of Tested Textile Dyes

Test Number	Textile Dye
053226A	YELLOW E-JD 3442
053226B	C.I. Reactive Red 231
053226C	Produkt P-4G
053226D	C.I. Reactive Yellow 174
053226E	NAVY 14 08 723
053226F	Dispersionsrot 2754

Concentrations used

Based on solubility tests the highest technically applicable concentration of 6 textile dyes was determined. With the exception of Dispersionsrot 2754, the highest applicable suspension concentration was set at 15% for all dyes. The highest applicable concentration of Dispersionsrot 2754 was established as 9%.

In order to attain comparability, all test substances were tested, as far as technically possible, in parallel and in the same vehicle (acetone/olive oil, 3+1 (v/v)). To obtain a wide range of concentrations analysed, 4 different concentrations were chosen (see table 2). Examinations regarding stability of test substances in the vehicle are given in Appendix 7.

Positive Control

p-Phenylenediamine (CAS-Number: 106-50-3) was used as a positive control. A group of five mice was treated with 1 % p-phenylenediamine in acetone/olive oil, 3+1 (v/v) in parallel to the other test groups.

Table 2 List of Concentrations of Textile Dyes Used

Textile Dye	Concentration in Test (% in AOO (Aceton/Olivenöl (3+1)))			
YELLOW E-JD 3442	15	9	3	1
C.I. Reactive Red 231	15	9	3	1
Produkt P-4G	15	9	3	1
C.I. Reactive Yellow 174	15	9	3	1
NAVY 14 08 723	15	9	3	1
Dispersionsrot 2754	Not tested*	9	3	1

*Dispersionsrot 2754 could not be applied at a concentration of higher than 9% for technical reasons

Test Procedure

All 6 textile dyes were tested following the instructions in OECD Guideline 429 in accordance with Good Laboratory Practice.

Topical Application

After measuring the thickness of the mouse ears, each mouse was treated with 25 µl of test substance on both ears by topical application to the dorsal skin of the ear. The application procedure was carried out daily for three consecutive days.

Administration of ³H-methyl-thymidine

Five days after the first application all animals were injected (tail vein) with 250 µl ³H-methyl-thymidine. At a specific activity of the solution of 80 µCi/ml this corresponds to a dosis of 20 µCi/animal.

Preparation of Cell Suspension

Approximately 5 hours after injection with ³H-methyl-thymidine all animals were killed without inducing pain, the thickness of the ears was measured and the draining auricular lymph nodes were excised. After determination of the individual weights of the lymph nodes, a cell suspension of lymph node cells in phosphate buffered saline (PBS) was prepared for each animal. For this purpose the lymph nodes were carefully pressed through a polyamide gauze (200 mesh). The gauze was washed with PBS and the suspension centrifuged. The supernatant was discarded and the pellets were resuspended with PBS. This washing procedure was repeated twice.

For precipitation of the macromolecules the pellets were resuspended and subsequently incubated at 4°C overnight in approximately 3ml of 5% TCA (trichloro acetic acid). Each precipitate was centrifuged, resuspended in 1 ml of 5% TCA and transferred into scintillation vials with 10% scintillation fluid.

Determination of incorporated ³H-methyl-thymidine

The ³H-methyl-thymidine incorporation was measured in a β-counter (Tricarb) and expressed as the number of disintegrations per minute (DPM). At the same time the background count rate of the instrument was determined. Detection of existing radioactivity was carried out for each animal individually.

Evaluation of Results

The proliferative response of lymph node cells was calculated as the ratio of DPM-values of the test groups to the control group. The background value was subtracted from the DPM/lymph node values. The Stimulation Index (SI), a measure of DPM-background corrected values of test substance in relation to vehicle control (negative control), was calculated for each concentration.

A test substance will be considered sensitizing if at least one concentration results in a 3-fold or greater increase in ³H-methyl-thymidine incorporation compared to the vehicle control group (Stimulation Index equal or greater to 3).

A detailed description of the individual test conditions can be found in the Appendixes 1-6.

Results

In testing the sensitizing properties of the textile dyes using the LLNA, 3 tested substances have proven to be sensitizers (C.I. Reactive Red 231, C.I. Reactive Yellow 174 and NAVY 14 08 723), while 3 test substances are not considered sensitizers (YELLOW E-JD 3442; Produkt P-4G and Dispersionsrot 2754) (see table 3).

A medium Stimulation Index of 9.9 was ascertained for the positive control (1 % p-phenylenediamine) that is within the range of the historical controls of 8.5 ± 2.4 .

Table 3 Determined Means of Stimulation Indices

Textile dye	Mean of Stimulation Indices (value in parentheses: test item concentration; % in AOO (Acetone/Olive Oil (3+1)))			
YELLOW E-JD 3442	0,9 (15)	0,9 (9)	0,8 (3)	1,0 (1)
C.I. Reactive Red 231	4,6 (15)	4,4 (9)	3,4 (3)	4,8 (1)
Produkt P-4G	2,5 (15)	1,9 (9)	2,5 (3)	2,4 (1)
C.I. Reactive Yellow 174	7,8 (15)	5,5 (9)	3,3 (3)	4,2 (1)
NAVY 14 08 723	5,2 (15)	5,7 (9)	4,8 (3)	5,1 (1)
Dispersionsrot 2754	n.d. *	1,0 (9)	0,9 (3)	1,0 (1)

*not tested

No EC₃-value could be determined for any of the 6 substances by linear interpolation (Basketter et al., 1999)² since either all tested concentrations induced a stimulation index of greater than 3 or all induced a stimulation index of less than 3. A clear dose dependency of the 3 positive textile dyes could also not be established.

For this reason an attempt was made to determine an approximate „EC₃-analogous-value“ (see table 4). This value was determined by linear extrapolation to coordinate origin (SI = 1 at concentration = 0) starting from the Stimulation Index of the respectively lowest tested concentration (see Fb 1009 of the Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin; Akkan et al., 2004).

²)A Comparison of Statistical Approaches to the Derivation of EC3 Values from Local Lymph Node Assay Dose Responses (Basketter et al.; J. Appl. Toxicol. 19, 261-266 (1999))

Calculation of the „EC₃-analogous-value“, however, has significant uncertainty since the positive test items do not show any clear dose dependency. For this reason it is unclear whether the lowest tested concentration is near to the point at which the dose effect curve deflects toward the coordinate origin. Since these textile dyes already showed a stimulation index greater than 3 at test concentrations of 1% they should at this point already be regarded at least as „strongly sensitizing“, according to the recommendation of Akkan et al. (2004, Fb 1009 of the BAuA).

Table 4 Estimated EC₃-Values

Textile Dye	„EC ₃ -analogous-value“ (in %)
C.I. Reactive Red 231	0,53
C.I. Reactive Yellow 174	0,63
NAVY 14 08 723	0,49

In addition, the weight of the individual lymph nodes was determined because an increase in lymph node weight is a second, individual end point in the determination of sensitizing properties of test substances. The mean of the individual weights was subsequently calculated groupwise (see table 5).

Table 5 Determined Mean Lymph Node Weights

Textile Dye	Mean Lymph Node Weights (in mg) (Value in Parentheses: Test Item Concentration; % in AOO (Acetone/Olive Oil (3+1)))			
YELLOW E-JD 3442	2,8 (15)	2,5 (9)	2,4 (3)	2,8 (1)
C.I. Reactive Red 231	4,1 (15)	3,7 (9)	3,9 (3)	3,9 (1)
Produkt P-4G	3,0 (15)	2,7 (9)	3,1 (3)	3,3 (1)
C.I. Reactive Yellow 174	4,7 (15)	4,5 (9)	3,7 (3)	3,9 (1)
NAVY 14 08 723	4,1 (15)	4,8 (9)	4,2 (3)	3,9 (1)
Dispersionsrot 2754	* n.d.	3,2 (9)	3,1 (3)	2,9 (1)
Vehicle Control	2,6 (100% AOO (Acetone/Olive oil (3+1)))			

*not tested

In order to analyse an irritating potential of the textile dyes which in some circumstances could lead to a false positive reaction in the LLNA, the gain in ear thickness in the course of the test was determined as an additional end point. For this purpose the ear thicknesses of the animals were measured individually at test begin (before the first treatment) and at test end. Subsequently, the mean of the results was calculated (see table 6).

Table 6 Determined Mean Ear Thicknesses

Textile Dye	Mean Ear Thicknesses (μm) at Test Begin vs. Test End (Values in Parentheses: Test Item Concentrations; % in AOO (Acetone/Olive Oil (3+1)))			
YELLOW E-JD 3442	200; 210 (15)	180; 190 (9)	190; 190 (3)	200; 210 (1)
C.I. Reactive Red 231	200; 210 (15)	200; 210 (9)	190; 190 (3)	200; 200 (1)
Produkt P-4G	200; 200 (15)	210; 210 (9)	200; 200 (3)	210; 220 (1)
C.I. Reactive Yellow 174	210; 220 (15)	210; 210 (9)	200; 210 (3)	220; 220 (1)
NAVY 14 08 723	210; 210 (15)	210; 210 (9)	200; 200 (3)	210; 210 (1)
Dispersionsrot 2754	* n.d.	210; 210 (9)	210; 210 (3)	210; 210 (1)
Vehicle Control	200; 200 (100% AOO (Acetone/Olive Oil (3+1)))			

*not tested

Discussion

In the present study for the determination of the skin sensitizing potential of textile dyes in the LLNA 3 of the tested dyes proved positive and 3 negative. These results are, in part, contrary to those found in the Guinea Pig Maximisation Test according to Magnusson and Kligman (GPMT) on the basis of which all 6 substances are to be regarded as skin sensitizing. The possible reasons of the observed discrepancy remains to be discussed. Since the GPMT was performed partly up to 20 years ago the manufacturers suspected that the substance lots tested at that point in time were not of the same purity as the substance lots currently tested in the LLNA. Furthermore, for those substances that yielded a negative test result in the LLNA, none of the earlier GPMT test results showed a skin reaction with a score of greater than 1. This indicates that in the GPMT test the substances showed weaker allergic reactions, even though often for a higher percentage of tested animals. On the other hand, one substance tested positive in the LLNA also did not reveal a score of higher than 1 in the GPMT. In switching from the GPMT to the LLNA not only the tested end point changes (from allergic skin reaction (secondary immunological response after challenge) in the guinea pig to reaction in lymph node cell proliferation (primary immunological response during induction) in the mouse), but also the species tested. For this reason, a species specific difference in the reactivity of the immune system and consequently differing test results due to the different test methods cannot be ruled out.

Calculation of the EC₃-value in the LLNA by linear interpolation (Basketter et al., 1999) was not possible for any of the substances. For this reason, for the 3 substances that tested positive and for which the stimulation indices for the tested concentrations were all above 3, the attempt was made to determine an approximate „EC₃-analogous-value“ by linear extrapolation (see Fb 1009 (Beurteilung der Wirkstärke hautsensibilisierender Chemikalien anhand des Local Lymph Node Assay) of the Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Akkan et al., 2004):

Table 7 EC₃-Analogous-Value“ (in %)

Textile Dye	„EC ₃ -Analogous-Value“ (in %)
C.I. Reactive Red 231	0,53
C.I. Reactive Yellow 174	0,63
NAVY 14 08 723	0,49

According to the recommendations of Akkan et al. 2004, as well as the Sensitization Expert group (EC SEG, 2003) (see Fb 1009 (Beurteilung der Wirkstärke hautsensibilisierender Chemikalien anhand des Local Lymph Node Assay) of the Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin) these substances would consequently be regarded as „strongly sensitizing (see table 8).

Table 8 Recommendations for Categorizing Sensitizing Substances according to their Potency (from Fb 1009 (Beurteilung der Wirkstärke hautsensibilisierender Chemikalien anhand des Local Lymph Node Assay, page 152; Tab.9.6)

Grouping	EC ₃ in the LLNA (%)
Class 1 „Very Strongly Sensitizing“	≤ 0.2
Class 2 „Strongly Sensitizing“	> 0.2 - ≤ 2.0
Class 3 „Moderately Sensitizing“	> 2.0 - ≤ 20
Class 4 „Weakly Sensitizing“	> 20

The „EC₃-analogous-value“, however, has uncertainty, since there is, for example, no clear dose dependency.

The results of the measurement of lymph node weights, which were recorded as a second end point for the primary immune response in the LLNA, support the results of the proliferation measurement.

If a test substance causes a local skin irritation at the concentration employed in the LLNA, the proliferation in the draining lymph node caused by the skin irritation can mask the proliferation caused by a specific immune response. This type of effect can be ruled out to a great extent in the present study, since a skin irritation normally is expressed in the thickness of the skin and this type of thickening of the skin of the ears was not perceived. From this the conclusion can be drawn that the observed reactions in the draining lymph nodes are a result of a specific immune reaction and not caused by an unspecific irritant reaction.

Conclusions

In order to achieve a more exact characterization of the skin sensitizing potency of the three textile dyes which tested positive, the test method (LLNA) would need to be repeated for the tested substances using lower concentrations. Since this is not currently being planned, an effort was made to estimate a „EC₃-analogous-value“. These values identify the substances that tested positive as, at least, „strongly sensitizing“. In view of this result, differentiated safety measures should be taken regarding the exposure to these substances at the workplace.

Anhänge

Anhang 1: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit YELLOW E-JD 3442

Anhang 2: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit C.I. Reactive Red 231

Anhang 3: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit Produkt P-4G

Anhang 4: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit C.I. Reactive Yellow 174

Anhang 5: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit NAVY 14 08 723

Anhang 6: Prüfbericht Sensibilisierungstest (LLNA) mit Dispersionsrot 2754

Anhang 7: Prüfbericht Stabilität der Prüfsubstanzen im Vehikel