

발간등록번호

11-1471057-000512-14

화장품 등 광독성 동물대체시험법
(*In vitro* 3T3 NRU 시험법) 가이드라인
(민원인 안내서)

2021. 8.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

화장품 등 광독성 동물대체시험법(*In vitro* 3T3 NRU 시험법) 가이드라인(민원인 안내서)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2021년 8 월 31일 <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> 담당자 확 인(부서장) </div> <div style="text-align: center;"> 강남희 김광진 </div> </div>		

이 안내서는 화장품 등 광독성 동물대체시험법(*In vitro* 3T3 NRU 시험법) 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 ('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2021년 8월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 특수독성과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-5153, 5155

팩스번호: 043-719-5150

제·개정 이력

연 번	제·개정 번호	승인일자	주요내용
1	B1-2007-4-002	2007.11.	화장품 독성시험 동물대체시험법 가이드라인(I) 제정
2	안내서-0748-01	2017.5.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」 개정에 따른 일괄 재분류 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16)
3	안내서-0748-02	2018.6.	제목을 “ 화장품 광독성 동물대체시험법(<i>In vitro</i> 3T3 NRU 시험법) 가이드라인”으로 수정, 내용 정비 및 OECD 가이드라인 영문본을 추가하여 개정
4	안내서-0748-03	2021.8.	OECD 가이드라인(TG 432) 개정사항 반영

목 차

I. 개요	6
II. 시험원리	6
III. 제한점 및 고려사항	7
IV. 시험방법	7
V. 결과 판정	10
VI. 시험결과 및 보고	11
- 별첨 1 : 번역본 [OECD TG 432]	
- 별첨 2 : 원문 [OECD TG 432]	

화장품 등 광독성 동물대체시험법 (*In vitro* 3T3 NRU 시험법) 가이드라인

I. 개요

본 시험법은 BALB/c 3T3 세포를 이용하여 시험물질을 적용한 후 빛 노출에 의해 나타나는 시험물질의 광독성(phototoxicity)을 평가하는 생체외(*in vitro*) 광독성 시험법(3T3 NRU)이다.

본 시험법은 BALB/c 3T3 세포에 시험물질을 적용하고 인공 태양광을 조사하거나 조사하지 않았을 때의 세포독성을 비교하여 광독성을 평가한다. 세포독성은 neutral red¹⁾를 사용하여 측정하며, PIF (photo irritation factor)²⁾ 및 MPE (mean photo effect)³⁾ 값을 이용하여 광독성 유무를 판정한다.

본 시험법을 일상적으로 사용하기 전에 가이드라인에 제시된 모든 숙련도 물질(별첨 1-표 1)을 시험하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다.

II. 시험원리

In vitro 3T3 NRU 광독성 시험은 세포독성을 유발하지 않는 수준의 인공 태양광에 노출되었을 때 시험물질에 의한 세포독성을 측정하는 것에 기초한다. 세포독성은 시험물질 적용 후 생체 염료인 neutral red(NR)의 세포 내 축적 정도를 측정하여 평가한다. NR은 약한 양이온성 염색시약으로 비이온성 확산에 의해 세포막을 통과하여 리소솜에 축적된다. NR은 세포질(중성에 가까운 pH)에서는 전하를 띠지 않지만 리소솜 공간 내(lumen)(낮은 pH)에서는 양전하를 띠며 갇혀있게 된다. 광독성물질은 활성산소종의 생성, 리소솜 막의 투과도 증가 및 pH 기울기(gradient) 감소 등을 통해 세포 손상을 유도하고, 결과적으로 NR의 흡수를 감소시킨다. 본 시험법은 이러한 원리를 바탕으로 시험물질 적용 및 광조사 유무에 따른 NR 흡수 정도를 측정하여 광독성물질을 구별할 수 있다.

1) Neutral red : 비확산방법으로 세포막을 통과하여 라이소솜 안에 축적되는 양이온성 염색시약

2) PIF (광자극지수) : 시험물질 처리 후 자외선 조사유무에 따른 IC₅₀ 값을 비교하여 생성된 지수

3) MPE (평균 광효과) : 시험물질 처리 후 자외선 조사유무에 따른 농도 반응곡선을 계산하여 얻은 값

III. 제한점 및 고려사항

광독성시험을 수행하기 전 OECD TG 101에 따라 시험물질의 자외/가시부 흡수 스펙트럼(UV/vis absorption spectrum)을 측정하여 광반응 유발 가능성을 확인할 수 있다. 시험물질의 몰 흡광계수(MEC)가 $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 미만이면 광반응을 일으킬 가능성이 낮아 광독성시험을 수행할 필요가 없다.

본 시험법은 광유전독성, 광알레르기, 광발암성과 같이 시험물질과 빛이 결합된 작용을 예측하기 위한 시험법은 아니지만, 경우에 따라 본 시험법의 음성 결과에 따라 추가적인 다른 시험(예: 광유전독성)이 필요하지 않을 수 있다.

IV. 시험방법

4.1 세포 준비

BALB/c 3T3 clone A31(ATCC 또는 ECACC) 세포주가 권장되며, 전체 계대수가 가급적 100 미만인 세포를 사용한다. 세포배양배지는 10% NBCS (new-born calf serum), 4 mM 글루타민, 페니실린(100 IU) 및 스트렙토마이신($100 \mu\text{g/mL}$) 등이 포함된 DMEM을 사용하며, 37°C , 5~7.5% CO_2 조건(사용된 완충용액에 따라 조절)에서 배양한다. 시험물질 당 2개의 96-well 플레이트에 1×10^4 cells/well로 배양하여 준비한다.

세포는 정기적으로(예: 6개월에 한 번) UV 조사량에 따른 민감도를 점검해야 한다. 세포의 UV 민감도는 계대수에 따라 증가할 수 있으므로 계대수가 높은 세포를 사용하는 경우 본 시험에서 사용되는 광량보다 높은 용량이 포함된 여러 광량을 사용하여 UV 민감도를 입증해야 한다. 세포를 96-well 플레이트에 배양한 후 다음날 광조사하고, 3일차에 NR 흡수 정도를 측정한다.

4.2 시험물질 준비

시험물질은 UV 조사 중 간섭을 피하기 위해 단백질 성분이나 광 흡수 성분(예: 페놀 레드와 같은 pH-지시약, 비타민) 등이 없는 완충용액(예: EBSS 또는 HBSS)에 용해해야 한다. 수용성 물질이 아닌 경우 사용하는 용매는 DMSO 또는 에탄올이 권장된다. 물질이 물, DMSO, 에탄올에 잘 녹지 않는 경우, 세포독성이 약한 다른 용매를 사용할 수 있다.

사용하기 전 모든 용매에 대해서 시험물질과의 반응성, 광독성 유발, 광독성 영향의 방해, 라디칼 제거 특성 및 용매에 녹였을 때의 화학적 안정성 등의 특성을 평가해야 한다.

DMSO 또는 에탄올에 용해된 시험물질의 경우, 동일한 용매에 연속 희석하여 8개 농도의 희석액을 조제한 후 수용성 용매(예: EBSS 또는 HBSS)에 옮겨서 세포에 적용한다. 수용성 용매에서의 시험물질 최고 농도가 1000 µg/mL이 되도록 조제한다.

UV 조사(+Irr) 및 UV 비조사(-Irr) 시 시험물질의 농도 범위는 용량설정시험을 통해 결정하며, 최고 농도는 생리적 시험 조건(예: 삼투압 및 pH 스트레스는 피해야 함) 내에 있어야 하고, 1000 µg/mL을 초과해서는 안 된다.

시험물질은 보관 시 안정성을 입증할 수 있는 자료가 없다면 시험 당일에 준비하며, 시험물질이 광활성화되거나 분해되지 않는 조건 하에서 처리 및 취급한다. 또한 CO₂ 배양기 밖에서 50분간 세포에 UV를 조사하는 동안 알칼리화가 되지 않도록 주의를 기울여야 한다.

매 시험마다 양성대조군 및 용매대조군을 동시에 시험해야 하며, 양성대조물질은 잘 알려진 광독성물질인 Chlorpromazine(CPZ)을 주로 사용하고, 시험물질을 용해한 용매를 용매대조군으로 사용한다.

4.3 UV 조사 조건

생체내(*in vivo*) 광독성 반응은 UVA 및 가시광선과 관련되며, UVB는 광독성 반응과는 관련이 적지만 세포독성이 매우 강하기 때문에 UVA와 가시광선은 투과할 수 있으면서 UVB는 줄이는 필터를 사용하여 스펙트럼을 조절한다. 인공광원으로는 인공태양광조사기(solar simulator)를 사용하는 것이 적절하다. 필터를 장착한 인공태양광조사기의 광도 분포는 한낮의 야외 광도 분포와 유사해야 한다. 세포 배양용 플라스틱 제품들은 UV 안정화제를 포함하기 때문에 시험에 사용하는 96-well 플레이트 뚜껑을 통과하는 스펙트럼을 측정에 사용해야 한다.

광독성시험을 수행하기 전에 적절한 UVA 측정기를 사용하여 광세기를 정기적으로 점검해야 한다. 광세기는 시험에 사용하는 96-well 플레이트 뚜껑을 통과하여 측정하며 UVA 측정기는 광원에 대해 보정되어 있어야 한다.

UVA 영역에서 5 J/cm²의 광량은 Balb/c 3T3 세포에 대해 독성이 없으면서 시험 물질을 활성화 시켜 광독성 반응을 일으키기에 충분하며, 50분 내에 5 J/cm²에 도달하기 위한 광세기(1.7 mW/cm²)이다. 아래의 수식을 이용하여 광량이 5 J/cm²에 도달하도록 하는 노출 시간 및 광세기 값(irradiance values)을 계산할 수 있다.

$$t(\text{분}) = \frac{\text{광조사량(J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{광세기(mw/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1\text{J} = 1\text{Wsec})$$

마찬가지로, 만약 다른 세포주 또는 광원을 사용하는 경우, 세포에 무해하면서 광독성 참고물질을 활성화하는데 충분한 광량을 선정하기 위해 조사량을 보정해야 한다.

4.4 시험물질 및 대조물질 적용

시험 1일차에 세포배양배지 100 µL를 96-well 플레이트 주변 well에 넣어 공시료(blank)를 준비하고, 나머지 well에는 1×10⁵ cells/mL의 세포 현탁액 100 µL를 넣는다(=1×10⁴ cells/well). 각 시험물질군(8개 농도), 양성대조군 및 용매대조군 당 2개의 플레이트를 준비한다(UV 조사 및 비조사). UV를 조사하지 않은(-Irr) 플레이트는 세포 독성을 결정하기 위해 사용하고, 다른 1개는 UV조사 시(+Irr) 광독성을 결정하기 위해 사용한다. 세포는 플레이트 바닥의 반 정도가 단층으로 채워지도록 18-24시간 동안 배양한다.

시험 2일차에 배양이 끝난 세포는 완충용액으로 세척하고, 시험물질 또는 용매를 각 well에 100 µL씩 넣어 빛을 차단한 상태로 60분 간 배양한다. 플레이트의 뚜껑을 덮은 채로 세포독성이 없는 최대 조사량(예: 5 J/cm²)으로 실온에서 약 50분 동안 광조사한다. 나머지 플레이트는 실온에서 빛이 차단된 곳에 50분 동안 둔다. 이후 시험물질 용액을 제거하고 완충용액(시험물질이 포함되지 않음) 150 µL로 두 번 세척한 다음 세포배양배지를 넣고 18-24 시간 동안 배양한다.

4.5 세포생존율 측정

배양이 끝나면 위상차 현미경으로 세포의 성장, 형태, 단층배양 정도를 확인하고 세포 형태 변화와 세포 성장에 대한 영향을 기록한다. 시험 3일차에 37℃로 미리 가온한 완충용액 150 µL로 세포를 조심스럽게 세척하고, NR 배양배지(혈청을 함유하지 않은 세포배양배지에 NR을 50 µg/mL로 녹임) 100 µL를 첨가한 후 CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양한다. 배양 후 NR 배양배지를 제거하고 완충용액 150 µL로

세척한다. NR 추출액(물:에탄올:아세트산 = 49:50:1) 150 μ L를 각 well에 첨가한 후 마이크로타이터 플레이트 교반기 위에서 최소 10분 동안 천천히 교반시킨다. 분광광도계를 사용하여 540 \pm 10 nm에서 NR 추출액의 흡광도를 측정한다.

4.4 결과 평가

- (1) 광조사 유무에 따라 농도-반응을 나타내는 적절한 농도를 선정하며, 가능한 경우 시험물질의 IC₅₀(세포생존율이 50%로 감소되는 농도) 값을 구한다.
- (2) PIF 값은 아래의 수식을 이용하여 계산한다. 광조사 유무로 IC₅₀를 계산할 수 없는 경우 시험물질에 대한 PIF 값은 결정할 수 없다.

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr, \text{비조사조건})}{IC_{50}(+Irr, \text{조사조건})}$$

- (3) MPE 값은 아래의 수식으로 계산한다.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

* PE_c = RE_c × DE_c

: 농도 c에서의 PE(photo effect, 광효과)

* RE_c = Rc(-Irr)-Rc(+Irr)

: 농도 c에서의 RE(response effect, 반응효과)로 광조사 유무 시 관찰되는 반응 값의 차이

* DE_c : 농도 c에서의 DE(Dose Effect, 용량효과)

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

* C*(equivalence concentration)

: UV 조사(+Irr) 시 반응과 UV 비조사(-Irr) 시 반응이 같은 시험물질 농도

* W_i(가중치 값) = MAX {Ri(+Irr), Ri(-Irr)}

: UV 조사 시(+Irr)와 UV 비조사(-Irr) 시 반응 값의 최대 값

- (4) PIF 및 MPE 값은 소프트웨어(Phototox 2.0, ZEBET at the BfR, Berlin Germany)를 사용하여 계산할 수 있다(Source: <http://www.oecd.org>).

V. 결과 판정

5.1 결과 판정

판정기준은 시험물질의 PIF 값 2 미만 또는 MPE 값이 0.1 미만인 경우 “광독성 없음”으로 판정한다. PIF 값이 2 이상, 5 미만 또는 MPE 값이 0.1 이상, 0.15 미만인 경우 “불확실한 광독성”으로 판정하며, PIF 값이 5 이상 또는 MPE 값이 0.15 이상인 경우 “광독성 있음”으로 판정한다.

판정	PIF 값	MPE 값
광독성 없음 (No phototoxicity)	PIF < 2	또는 MPE < 0.1
불확실한 광독성 (Equivocal phototoxicity)*	PIF ≥ 2 및 < 5	또는 MPE ≥ 0.1 및 < 0.15
광독성 있음 (Phototoxicity)	PIF ≥ 5	또는 MPE ≥ 0.15

시험된 농도 중 최고농도에서만 광독성이 나타나는 경우 위험성 확인을 위해 피부 흡수·피부 내 시험물질 축적 관련 자료 및 기타 시험자료(ROS assay, *in vitro* 동물피부 또는 인체피부시험, 피부모델 시험 등)를 고려할 필요가 있다.

1차 시험에서 명백한 양성 또는 음성 결과를 나타내는 경우 1회 이상의 용량설정 예비시험으로 충분하다. 모호하거나 경계선에 있거나 불명확한 결과들은 추가 시험을 해야 한다. 이와 같은 경우 농도 범위, 농도 간격, 배양시간, 광조사 시간 등의 시험 조건 변경을 고려할 수 있다. 물에 불안정한 화학물질의 경우 광조사 시간을 줄이는 것이 적절할 수 있다.

5.2 인정 요건

각 시험에서 다음의 조건을 만족하는 경우에만 시험결과가 인정된다.

- (1) 양성대조물질로 CPZ를 사용한 경우 UV 조사 조건에서 $IC_{50} = 0.1-2.0 \mu\text{g/mL}$, UV 비조사 조건에서 $IC_{50} = 7.0-90.0 \mu\text{g/mL}$, 광자극 지수(PIF) > 6이어야 한다.
- (2) 용매대조군의 UV 조사 시 세포생존율은 비조사 시 세포생존율 대비 80% 이상이어야 하며, 용매대조군의 NR 절대 흡광도값($OD_{540 \pm 10 \text{ NRU}}$)은 0.4 이상이어야 한다.

VI. 시험결과 및 보고

시험결과보고서에는 다음의 내용을 포함하도록 한다.

시험물질 및 용매

- 시험물질의 식별자료, 일반명, IUPAC, CAS 번호(알려진 경우)
- 물리적 성상 및 순도, 물리화학적 특성
- 자외/가시부 광선의 흡수스펙트럼
- 안정성, 광안정성(알려진 경우)
- 용매 선택사유, 용매에 대한 시험물질의 용해도, 시험 배양배지에서 용매의 백분율

세포

- 세포의 종류, 근원, 계대수, 마이코플라스마 및 그 외 오염인자 존재 여부, *In vitro* 3T3 NRU 광독성시험에 사용한 인공태양광조사기로 측정한 특정 계대 범위에서 세포의 광조사 민감도

시험조건

- 시험물질 처리 전후의 배양조건(배양배지의 종류 및 조성, CO₂ 농도, 온도, 습도, 처리 전후의 배양기간)
- 시험물질 농도 설정 근거(UV 조사 및 비조사시), 시험물질 최고농도의 근거(시험물질의 용해도 제한이 있는 경우 및 세포독성이 없는 경우)
- 시험물질 처리 배양배지의 종류 및 조성(완충용액), 시험물질 처리기간
- 광원의 선택 이유, 광원과 인공태양광조사기의 제조사 및 종류
- 광원의 스펙트럼 특성, 필터의 투과 및 흡수 특성, 인공태양광조사기의 특성 및 보정, UVA 광세기, 자외선/가시광선 노출 기간, UVA 광량 등
- Neutral red 처리 배양배지의 조성, 배양기간, 배양조건(CO₂ 농도, 온도, 습도), 추출 조건(추출액, 기간) 등

결과

- 각 시험물질 농도 및 용매대조군의 세포생존율(평균값)
- 광조사 유무에 따른 농도 반응 곡선(시험물질 농도에 따른 상대 세포생존율)
- 농도-반응 곡선 분석: 가능하면 IC₅₀ 계산[IC₅₀(+Irr), IC₅₀(-Irr)]
- PIF 또는 MPE의 계산을 이용하여 광조사 유무에 따른 두 농도 반응 곡선 비교
- 용매대조군의 시험 허용 기준, 평균, 표준편차
- 세포의 광조사 유무에 따른 절대생존율(Neutral red 흡광도)

- 양성 대조군의 $IC_{50}(+Irr)$, $IC_{50}(-Irr)$, PIF/MPE, 평균, 표준편차

별첨 1. 번역본(OECD TG 432)

생체외(*in vitro*) 3T3 NRU 광독성시험법

In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test

서론

1. 광독성은 인체가 환경적인 빛에 노출 후 국소 또는 전신에 적용된 광반응 물질에 의해 유발되는 독성반응을 말한다.
2. 생체외(*in vitro*) 3T3 NRU(Neutral Red Uptake) 광독성시험은 빛 노출에 의해 활성화된 시험물질의 광독성을 확인하는데 사용된다. 본 시험법은 빛의 유무에 따라 시험물질에 노출된 세포의 상대적인 생존율 감소를 측정함으로써 광독성을 평가한다. 본 시험법에서 양성으로 확인된 화학물질들은 국소 또는 전신 적용 후 피부 및/또는 눈에 분포됨에 따라 생체내(*in vivo*)에서 광독성 반응을 일으킬 수 있다.
3. 본 시험 가이드라인에서 사용된 용어 정의는 부록 A에 기술되어 있다.

초기 고려사항

4. 많은 종류의 화학물질이 광독성을 유발하는 것으로 보고되고 있다⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾. 이들의 공통적인 특징은 태양광 내의 빛에너지를 흡수한다는 것이다. 광반응이 일어나기 위해서는 충분한 광양자(light quanta)를 흡수해야 한다. 따라서 광독성시험을 실시하기 전에 시험물질의 자외/가시부 흡수스펙트럼(UV/vis absorption spectrum)을 OECD 시험 가이드라인 101에 따라 측정할 수 있다. 만약 화학물질의 몰 흡광계수(molar extinction/absorption coefficient, MEC)가 $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 미만인 경우(메탄올로 측정), 그 화학물질은 광반응을 일으킬 가능성이 낮다⁽⁵⁾⁽⁶⁾. 이러한 화학물질들은 광독성 평가를 위한 생체외(*in vitro*) 3T3 NRU 광독성시험이나 다른 생물학적 시험을 할 필요

가 없다⁽¹⁾⁽⁷⁾. 일반적으로 이 원칙은 모든 시험물질에 적용되지만, 화학물질의 의도적인 사용 용도 또는 잠재적인 노출 조건에 따라 더욱 구체적인 지침이 적용될 수 있다(예: 의약품의 경우 ICH S10)(부록 B 참고).

5. 본 시험법의 신뢰성(reliability)과 상관성(relevance)이 평가되었으며⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾, 생체내(*in vivo*) 급성 광독성 영향을 예측할 수 있음이 밝혀졌다. 본 시험법은 화학물질과 빛의 결합된 작용(combined action)으로 나타날 수 있는 기타 부작용을 예측하기 위해 고안된 시험법은 아니다(예: 광유전독성, 광알레르기, 광발암성은 그 자체로 다루지 않음). 또한 본 시험법은 광독성의 간접적 기전, 시험물질의 대사산물 및 혼합물의 영향 등을 보기 위하여 고안된 시험법은 아니다. 그러나 경우에 따라 본 시험법의 결과가 음성이면 다른 시험(예: 광유전독성)이 필요하지 않을 수 있다(메모 2 참고⁽⁶⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾).

6. *In vitro* 3T3 NRU 광독성시험은 대사 활성계가 없음에도 불구하고 현재까지 모든 광독성물질을 식별하지 못했다는 증거가 없기 때문에 대사 활성계를 이용하여 수행할 필요가 없다⁽¹³⁾.

시험원리

7. 본 시험법의 기본 원리는 세포독성을 나타내지 않는 수준의 인공 태양광(simulated solar light)에 노출되었을 때와 노출되지 않았을 때의 화학물질에 의한 세포독성을 비교하는 것이다. 본 시험법에서 세포독성은 시험물질 처리 및 자외선 조사 18-24시간 후 생체염료(vital dye)인 neutral red(NR) 흡수의 농도의존적 감소 정도로 나타낸다⁽¹⁴⁾. NR은 비이온성 확산에 의해 쉽게 세포막을 통과하고 리소좀 내에 축적되는 약한 양이온성 염색시약이다. NR은 세포질의 중성에 가까운 pH에 전하를 띠지 않지만 리소좀 루멘(lumen)의 낮은 pH에서 양전하를 띠며 갇혀 있다. 리소좀 공간 내(lumen)의 낮은 pH는 능동적으로 유지되고, ATP를 필요로 하며, 리소좀 막의 온전성(integrity)에 의존한다. 광독성물질은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성 및 리소좀 막의 증가된 투과도, pH 기울기(gradient) 감소와 점차 비가역적이 되는 기타 변화로 이어지는 다른 메커니즘을 통해 세포 손상을 유도한다⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾. 생체이물(xenobiotics) 작용에 의해 유도된 변화는 결과적으로 NR의 흡수와 결합을 감소시켜 살아있는 세포와 손상되거나 죽은 세포를 구별할 수 있게 한다.

8. BALB/c 3T3 세포를 96-well 플레이트 2개에 18-24시간 동안 단층배양(monolayer)하고, 시험물질을 8가지 농도로 1시간 동안 전처리한다. 2개의 플레이트 중 1개는 빛(irradiation)을 조사하고, 다른 플레이트는 어두운 곳에 둔다. 두 플레이트 모두 새로운 세포 배양 배지로 교환하고 18-24시간 동안 배양한 후 NR 흡수 정도로 세포생존율을 확인한다. 세포생존율은 용매대조군 대비 농도별 시험물질 처리군의 NRU 값을 백분율(%)로 나타내고 각 시험농도에 대하여 계산한다. 광독성을 예측하기 위해 빛(irradiation)을 조사한 것과 하지 않은 것에서 얻어진 IC₅₀ 값(용매대조군과 비교하여 세포생존율이 50%로 감소되는 농도)을 비교한다.

시험준비

세포

9. 불멸화된 마우스 섬유아세포(fibroblast) 세포주인 BALB/c 3T3 clone A31(ATCC 또는 ECACC)이 검증연구에 사용되었으므로 공인된 세포 기관에서 얻은 세포주의 사용을 권장한다⁽²³⁾. 다른 세포나 세포주를 사용할 수 있으나 지침 문서 No. 34의 원칙에 따라 본 시험법에 사용하는 세포주와 동등함을 반드시 입증하여야 한다(즉, 참고물질에 대한 적절한 반응)⁽²²⁾.

10. 세포의 마이코플라스마(mycoplasma) 오염은 실험실 도착시 검사하며(권고사항에 대해 참고문헌⁽¹⁷⁾ 참고) 오염되지 않을 때만 사용해야 한다⁽¹⁸⁾.

11. 세포의 UV 민감도는 본 가이드라인에 기술된 품질 관리 과정에 따라 정기적으로 점검하는 것이 중요하다. 세포의 UVA에 대한 민감도는 계대수(passage number)에 따라 증가할 수 있으므로, 전체 계대수가 가급적 100 미만인 BALB/c 3T3 세포를 시험에 사용해야 한다(29항 및 부록 C 참고). 높은 계대수의 세포를 사용한 경우, 세포가 본 가이드라인의 품질 지침(parameter)을 준수하는 것을 입증하기 위한 데이터가 있어야 한다.

배양 배지 및 배양 조건

12. 일상적인 세포 계대와 시험 절차 동안 적절한 배양 배지와 배양 조건을 사용해야 한다. BALB/c 3T3 세포의 경우 10% new-born calf serum, 4 mM 글루타민, 페니실린(100 IU) 및 스트렙토마이신(100 µg/mL) 등이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 사용하며 37°C, 완충용액에 따라 5-7.5% CO₂ 조건에서 배양한다. 사용된 완충용액에 따라 CO₂ 수치는 조절될 수 있다. 세포 배양 조건은 사용한 세포주의 일반적인 배양 범위(historical range)안에서 세포분열주기를 보장하여야 한다.

배양 준비

13. 냉동 보관된 세포는 적절한 밀도로 배양 배지에 분주하고 본 시험법에 사용하기 전에 최소 한 번 계대배양을 한다.

14. 광독성시험에 사용할 세포는 적절한 밀도로 배양 배지에 분주하여 시험 종료시(세포배양 48시간 후 세포생존율을 결정하는 시기)에도 세포가 플레이트 바닥 전체를 덮지 않도록 한다. 96-well 플레이트에서 배양하는 BALB/c 3T3 세포에 대해 권고하는 배양 밀도는 1×10^4 cells/well이다.

15. 시험물질 1개당 각각 2개의 96-well 플레이트에 동일한 조건으로 세포를 배양한다. 1개의 플레이트에는 UV를 조사하고(+Irr) 다른 1개는 UV를 조사하지 않으며(-Irr), 나머지 조작과정은 동시에 동일하게 진행한다.

시험물질 조제

16. 보관시 시험물질의 안정성을 입증할 수 있는 자료가 없다면 시험 당일에 준비한다. 시험물질 취급과 처리는 시험물질이 광활성화되거나 분해되지 않는 조건 하에서 수행하도록 한다.

17. 이상적으로는 시험물질은 UV 조사 중 간섭을 피하기 위해 단백질 성분이나 광흡수 성분(예: 페놀 레드와 같은 pH-지시약, 비타민) 등이 없는 완충용액(예: Earle's 또는 Hank's Balanced Salt Solution(EBSS 또는 HBSS))에 용해되어야 한다. CO₂ 배양기

밖에서 50분간 세포에 UV를 조사하는 동안 알칼리화가 되지 않도록 주의를 기울여야 한다. 5% CO₂ 조건에서 배양하는 경우 강한 완충용액을 선택해야 한다.

18. 물에 잘 녹지 않는 시험물질은 적절한 용매에 녹인다. 만약 용매를 사용하면 모든 농도의 시험군과 용매대조군에서 같은 용량이어야 하고, 그 농도에서 세포독성이 없어야 한다.

19. 수용성 물질이 아닌 경우, 용매로는 디메틸설폭사이드(dimethyl sulphoxide, DMSO) 또는 에탄올(EtOH)이 권장된다. 물질이 물, DMSO, 에탄올에 잘 녹지 않는 경우, 세포독성이 약한 다른 용매가 적절할 수 있다. 사용하기 전에 모든 용매에 대해서 시험물질과의 반응성, 광독성 유발, 광독성 영향의 방해, 라디칼 제거 특성 및/또는 용매 속에서의 화학적 안정성에 대한 특성이 평가되어야 한다. 유기용매인 DMSO 또는 에탄올에 용해된 시험물질의 경우, 동일한 용매에 8가지 연속 희석액을 준비하고, 연속 희석한 8가지 저장용액(stock solution)은 세포 적용을 위해 수용성 용매(예: EBSS 또는 HBSS)로 옮긴다. 시험물질 저장용액은 수용성 용매에서 최고 농도 1000 µg/mL가 되도록 DMSO 또는 에탄올에 가장 높은 농도로 용해시켜 준비한다. 수용성 용매에서 유기용매의 최종 농도는 8개 시험농도 모두에서 일정하게 유지(일반적으로 1%(v/v))되어야 한다.) 유기 용매에 용해된 시험물질은 수용성 용매로 옮겨질 때 침전될 수 있어 수용성 희석액의 용해도를 평가해야 하며 관찰된 것을 기록해야 한다.

20. 시험물질의 안정성에 영향을 주지 않는다면 용해에 도움이 되는 와류혼합(vortex mixing), 초음파 처리, 가온 등을 이용할 수 있다.

UV 조사 조건

21. **광원** : 광독성시험에서 적절한 광원(예: 인공태양광조사기(solar simulator))과 필터의 선택은 중요한 요소이다. 보통 생체내(*in vivo*)에서 UVA와 가시광선이 광독성 반응과 관련이 있으며⁽³⁾⁽¹⁹⁾ UVB는 광독성 반응과는 관련이 적지만 세포독성이 매우 강하다. 파장이 313 nm에서 280 nm⁽²⁰⁾로 바뀌면 세포독성은 1000배 증가한다. 허용가능한 광원은 전체 태양 스펙트럼(290-700 nm)을 방출한다. UVA와 가시광선의 투과가 가능하도록 하면서 UVB를 줄이는 필터를 사용하여 스펙트럼을 조절할 수 있다(부록 C 참

고). 또한, 사용된 파장, 광량, 광원 장비(예: 개방 또는 폐쇄 시스템)가 시험계에 지나치게 해로운 영향(예: 적외선 영역에서 열/파장의 방출)을 주어서는 안 된다.

22. 인공태양광조사기가 적절한 인공광원으로 인정된다. 필터를 장착한 인공태양광조사기의 광도 분포는 한낮의 야외 광도 분포와 유사하여야 한다⁽²¹⁾. 제논 아크(xenon arc)와 수은-할로겐 아크(mercury-metal halide arc)는 둘 다 인공태양광조사기에 사용된다⁽²²⁾. 후자는 열이 좀 덜 나고 값이 싼 장점이 있지만 제논 아크에 비해 태양광과의 유사도는 낮다. 모든 인공태양광조사기는 상당량의 UVB를 방출하며, 세포독성이 매우 강한 UVB 파장을 줄이기 위하여 필터를 장착해야 한다(부록 A). 세포 배양용 플라스틱 재료들이 UV 안정화제를 포함하기 때문에 시험에 사용하는 것과 같은 96-well 플레이트 뚜껑을 통과하는 스펙트럼을 측정하여야 한다. 장착된 필터 또는 장비의 불가피한 필터 효과에 의해 스펙트럼의 일부를 줄이기 위해 취한 조치와 관계없이, 이러한 필터 아래에 기록된 스펙트럼은 표준화된 실외광을 벗어나지 말아야 한다⁽²¹⁾. 국제적으로 공인된 실외광의 방출 표준인 옥외조명 표준 D65는 ISO DIS 18909:2006에서 제공된다. 생체외(*In vitro*) 3T3 NRU 광독성 시험법의 검증 연구에 사용되었던 필터를 사용한 인공태양광조사기의 스펙트럼 광세기 분포도⁽¹⁰⁾⁽²³⁾는 부록 C의 그림 1과 같다.

23. **광량 측정** : 광세기는 적절한 UVA 측정기를 사용하여 광독성시험 전에 정기적으로 점검하여야 한다(부록 A). 광세기는 시험에 사용하는 것과 같은 96-well 플레이트 뚜껑을 통해 측정하여야 한다. UVA 측정기는 광원에 대하여 보정되어 있어야 한다. 더 큰 간격에서, 외부에서 보정된 참조용 UV-vis 분광복사계(spectroradiometer)는 현장에서 필터된 스펙트럼 광세기를 측정하고, 필요시 광대역 UVA 측정기를 보정하기 위해 사용된다. 그렇지 않은 경우 동일한 광원/필터 조합을 갖추고 있다는 전제하에 중앙 교정 실험실에서 UVA 측정기를 정기적으로 보정할 수 있다.

24. UVA 영역에서 5 J/cm^2 의 광량은 BALB/c 3T3 세포에 대해 독성이 없으면서 화학물질을 활성화시켜 광독성 반응을 일으키기에 충분한 것으로 밝혀졌으며⁽⁶⁾⁽²⁴⁾, 50분 내에 5 J/cm^2 에 도달하기 위한 광세기는 1.7 mW/cm^2 이었다(부록 C 그림 2 참고). 다음의 수식을 이용하여 광량이 5 J/cm^2 에 도달하도록 하는 다른 노출 시간 및/또는 광세기 값(irradiance values)이 사용될 수 있다.

25.
$$t(\text{분}) = \frac{\text{광조사량}(\text{J}/\text{cm}^2) \times 1000}{\text{광세기}(\text{mw}/\text{cm}^2) \times 60} \quad (1\text{J} = 1\text{Wsec})$$

26. 마찬가지로, 만약 다른 세포주 또는 광원을 사용하는 경우, 세포에 무해하면서 광독성 참고물질(예: Table 1에 제시된 숙련도 물질)을 활성화하는데 충분한 광량을 선정하기 위해 조사량을 보정하여야 한다⁽²⁸⁾.

시험조건

시험물질 농도

27. UV 조사(+Irr) 및 UV 비조사(-Irr) 시 시험물질의 농도 범위는 용량설정시험을 통해 결정한다. 화학물질의 용해도는 노출 과정동안 변화할 수 있기 때문에 처음과 60분 후(또는 계획된 일정 처리 시간)에 용해도를 평가해 보는 것이 좋다. 또한 부적절한 배양조건, 강산성, 강알칼리성 화학물질에 의해 유도되는 독성을 피하기 위해 세포배양 시 pH는 6.5-7.8 범위 내에 있어야 한다.

28. 시험물질의 최고 농도는 생리적 시험 조건(예: 삼투압 및 pH 스트레스는 피해야 함) 내에 있어야 한다. 시험물질에 따라 최고 농도를 제한하는 요소로서 다른 물리화학적 특성들이 고려될 수도 있다. 상대적으로 불용성이며 포화농도에서 무독성인 물질의 경우, 도달할 수 있는 최고 농도를 시험해야 한다. 세포독성이 없는 화학물질(침전되기까지 IC₅₀ 값이 없음)의 경우, 시험 조건에서 용해도 한계를 확인하는 것이 유용하다. 이 경우에 시험에서 침전을 나타낼 수 있는 2~3개 농도를 포함하는 것이 좋으며, 이 후 광독성 분석에서 이 농도들은 제외시킨다. 시험물질의 최대농도는 1000 µg/mL을 초과해서는 안 된다. 대부분의 경우 1000 µg/mL까지 명확한 세포독성(광조사 하에)이 없는 화합물(compounds)은 광독성이 없는 것으로 간주될 수 있기 때문에 최대 농도를 100 µg/mL로 낮출 수 있다⁽⁵⁾. 광자극 지수(Photo Irritation Factor, PIF) 산출을 위한 IC₅₀ 값을 설정하기 위해 광 비조사 조건에서는 더 높은 최대농도를 고려할 수 있다. 일정한 희석비율로 8개의 시험물질 농도를 정한다(47항 참고).

29. UV 비조사시에는 세포독성이 없지만 UV 조사 시에 강한 세포독성이 나타나는

시험물질에 대한 정보(농도설정시험 등으로부터 얻어진)가 있다면, UV 조사 시의 농도 범위를 UV 비조사시의 농도 범위와 다르게 하여 유용한 시험결과를 얻을 수 있다.

대조군(controls)

30. 세포의 광조사 민감도 및 축적데이터(historical data) 확립 : 시험에 사용하는 세포에 대하여 UV 조사량 증가에 따른 민감도를 최소 한 번 점검한다. 가장 높은 계대수의 세포를 사용하는 경우 UV 민감도를 입증해야 하며, 본 시험법에서 사용되는 광량보다 높은 여러 광량을 사용해야 한다. 이 광량은 광원의 UV 부분을 측정하여 쉽게 정량된다. 세포는 3T3 NRU 광독성시험에서 사용된 동일한 밀도로 배양한 후 다음날 광조사한다(“다. 시험방법” 참고). 3일차에 NR 흡수 정도로 세포생존율을 결정한다. 세포독성이 없는 최대 광량(예: 검증연구 시 UVA 5 J/cm²)은 표 1의 숙련도 물질들을 정확히 구별하는데 충분한 양이어야 한다.

31. 광조사 민감도, 시험 점검 : 조사시 용매대조군의 세포생존율은 비조사시 세포생존율의 80% 이상이어야 한다.

32. 용매대조군의 생존율 : 용매대조군에서 얻어진 NR의 절대 흡광도값(OD_{540±10} NRU)은 각 well에 분주된(1×10^4 cells/well) 세포가 2일간의 시험기간 동안 정상적으로 분열하면서 성장했음을 보여주는 지표이다. 용매대조군의 OD₅₄₀ NRU는 ≥ 0.4 이어야 한다(즉 배경(background)용매 흡광도의 약 20배).

33. 세포와 함께 NR을 배양하는 동안 NR 용액의 결정화(crystallisation)의 결정(crystal)으로 인해 변동성이 증가(high variability)할 수 있으므로 주의해야 한다. NR 용액의 pH 변화는 NR 결정(crystal)형성을 유발할 수 있다. pH 안정제(예: HEPES)를 세포 배양 배지에 첨가하면 결정화(crystallisation)를 방지할 수 있다⁽²⁹⁾. 공급업체(suppliers)에 따라 NR의 품질이 다를 수 있으므로 시험에 사용하기 전에 NR을 사전 점검해야 한다. 세포 배양 배지에서 NR 용액의 여과 또는 원심분리를 권장한다.

34. 양성대조군 : 매 시험마다 chlorpromazine(CPZ)과 같은 이미 알려진 광독성물

질을 양성대조물질로 하여 동시에 시험해야 한다. CPZ를 이용하여 표준 프로토콜에 따라 시험하였을 경우 다음과 같은 시험결과가 얻어져야 한다. UV 조사 조건에서 $IC_{50} = 0.1-2.0 \mu\text{g/mL}$, UV 비조사 조건에서 $IC_{50} = 7.0-90.0 \mu\text{g/mL}$, 광자극 지수(PIF) > 6이어야 한다. 또한 양성대조군에 대한 시험결과를 지속적으로 모니터링 한다. 각 실험실은 시간 경과에 따른 시험 수행능력(performance) 점검을 위해 평균 광효과(Mean Photo Effect, MPE)를 포함하는 축적 데이터베이스(historical databases)를 확립해야 한다(표 1).

35. 시험물질의 종류나 용해도의 특성을 고려하여 CPZ 대신 다른 광독성물질도 양성대조물질로 사용할 수 있다(표 1).

시험 방법^{[8][9][10][22][23][24]}

시험 1일차

36. 배양 배지 100 μL 를 96-well 플레이트 주변 well에 넣어 공시료(blank)를 준비하고, 나머지 well에는 배양 배지에 현탁한 $1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 의 세포 현탁액 100 μL 를 넣는다($=1 \times 10^4 \text{ cells/well}$). 각 시험물질 당 용매대조군을 포함하여 2개의 플레이트를 준비한다. 마찬가지로, 양성대조군에 대해 용매대조군을 포함하여 2개의 플레이트를 준비한다.

37.

38. 세포는 플레이트 바닥의 반 정도가 단층으로 채워지도록 18-24시간 동안 배양한다(12항 참고). 이 배양 기간 동안 세포의 회복, 부착 및 기하급수적인 성장이 가능하다.

39.

시험 2일차

40. 배양 후 배양 배지를 제거하고 배양에 사용된 완충용액 150 μL 로 조심스럽게 세척한다(17항 참고). 적절한 농도의 시험물질 또는 용매(용매대조군)를 포함하는 완충용액 100 μL 를 넣는다. 8개 농도의 시험물질을 2개의 플레이트에 적용한다. 시험물질을 처리한 세포를 빛이 차단된 곳에 60분 동안 배양한다.

41. 각 시험물질의 8개 농도 및 대조군 당 2개의 플레이트를 준비하고, 1개는 광조사를 하지 않고(-Irr) 세포독성을 결정하기 위해 사용하고(대조군 플레이트), 다른 1개는 광조사시(+Irr) 광독성을 결정하기 위해 사용한다(처리군 플레이트).

42. 광조사(+Irr)를 위해 세포독성이 없는 최대의 조사량으로 96-well 플레이트의 뚜껑을 덮은 채로 실온에서 약 50분 동안 조사한다(예: 5 J/cm^2 , 부록 C 참고). 광조사를 하지 않은(-Irr) 플레이트는 실온에서 빛이 차단된 곳에 50분(빛 노출 시간) 동안 둔다.

43. 시험물질 용액을 제거하고 배양에 사용된 완충용액(시험물질이 포함되지 않음) 150 μL 로 조심스럽게 두 번 세척한다. 완충용액을 배양 배지로 교환하고 하룻밤(18-24 시간, 12항 참고) 동안 배양한다.

시험 3일차

- 현미경 관찰

44. 위상차 현미경(phase contrast microscope)을 사용하여 세포의 성장, 형태, 단층 배양 정도를 확인하고 세포 형태 변화와 세포 성장에 대한 영향을 기록해 둔다.

- Neutral red 흡수 시험

45. 37°C로 미리 가온한 완충용액 150 μL 로 세포를 조심스럽게 세척하고, 세척액을 제거한 후, NR(3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, CAS number 553-24-2; C.I. 50040) 배양 배지(혈청을 함유하지 않은 배양 배지에 NR을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 녹임) 100 μL 를 첨가하여⁽²³⁾ CO₂ 배양기에서 12항에 기술된 바와 같이 3시간

동안 배양한다.

46. 배양 후 NR 배양 배지를 제거하고 완충용액 150 μ L로 세척하며 완충용액은 빨아들이거나 원심분리하여 제거한다.

47. NR 추출액 150 μ L(물:에탄올:아세트산 = 49:50:1)를 각 well에 첨가한다.

48. 세포로부터 NR이 추출되어 균질한 용액이 형성될 때까지 마이크로타이터 플레이트 교반기(microtiter plate shaker) 위에서 최소 10분 동안 천천히 교반시킨다.

49. 분광광도계(spectrophotometer)를 사용하여 540 ± 10 nm에서 NR 추출액의 흡광도를 측정한다(기준을 잡기 위해 공시험(blank)를 사용한다). 다음 분석을 위하여 적절한 전자 파일 형식으로 데이터를 저장한다.

시험자료 및 보고

데이터

50. 광조사 유무에 따라 농도-반응을 나타내는 적절한 농도를 선정하여 분석하며, 가능한 경우 시험물질의 IC_{50} (세포생존율이 50%로 감소되는 농도) 값을 구한다. 만약 세포독성이 나타나면 시험 농도 범위는 농도-반응 범위를 확보하기 위해 업데이트할 수 있다(예: 세포생존율이 50%를 초과하거나 이하로 나타나는 농도).

51. 1차 시험에서 명백한 양성 또는 음성 결과를 나타내는 경우(53항 참고) 1회 이상 용량설정 예비시험으로 충분하다.

52. 모호하거나 경계선에 있거나 불명확한 결과들은 추가 시험을 통해 명확히 해야한다(56항 참고). 이와 같은 경우 농도 범위, 농도 간격, 배양시간, 광조사 시간 등의 시험

조건 변경을 고려해 볼 수 있다. 물에 불안정한 화학물질의 경우 광조사 시간을 줄이는 것이 적절할 수 있다.

결과 평가

53. PIF 값 또는 MPE 값을 계산하여 시험결과를 평가한다.

54. 연속 농도-반응 곡선을 이용하여 불연속적인 용량 반응 값을 측정하고 광 세포독성 측정 값을 구한다. 데이터는 보통 비선형 회귀 방법으로 구하며⁽²⁵⁾, 데이터의 변동성의 영향을 평가하기 위해 부트스트랩(bootstrap) 과정을 권장한다.

55. PIF 값은 다음과 같은 수식을 이용하여 계산한다.

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr, \text{비조사조건})}{IC_{50}(+Irr, \text{조사조건})}$$

광조사 유무로 IC_{50} 를 계산할 수 없다면, 시험물질에 대한 PIF 값은 결정할 수 없다.

56. MPE 값은 농도 용량 반응 곡선의 비교를 기초로 하고 있다⁽²⁶⁾. MPE는 n개의 PE 값 가중평균으로 정의된다.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

- $PE_c = RE_c \times DE_c$

: 농도 c에서의 PE(photo effect, 광효과)

- $RE_c = R_c(-Irr) - R_c(+Irr)$

: 농도 c에서의 RE(response effect, 반응효과)로 광 조사 유무 시 관찰되는 반응값의 차이

- DE_c : 농도 c에서의 DE(Dose Effect, 용량효과)

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

- C^* (equivalence concentration)
: UV 조사(+Irr) 시 반응과 UV 비조사(-Irr) 시 반응이 같은 시험물질 농도
- W_i (가중치 값) = MAX { $R_i(+Irr)$, $R_i(-Irr)$ }
: UV 조사 시(+Irr)와 UV 비조사(-Irr) 시 반응 값의 최대 값

DEc (용량효과)는 C (실제농도)와 C^* 가 비슷하면 0에 가까운 값이 되고 C^* 가 C (실제농도)보다 상대적으로 매우 크거나 작을 때는 1이 된다. UV 조사 시 반응 값이 UV 비조사 시의 반응 값보다 매우 크거나 작으면 용량효과는 1로 한다. 농도 그리드 C_i 는 실험에 사용된 농도 값에 의해 정의된 각 농도 간격에 동일한 수의 포인트가 포함되도록 선택된다. MPE의 계산은 두 곡선 중 적어도 하나가 여전히 최소 10%의 반응 값을 나타내는 최대 농도 값으로 제한된다. 이 최대 농도가 +Irr 실험에서 사용된 최고 농도보다 높으면 +Irr 곡선의 잔여 부분이 응답 값 "0"으로 설정된다. MPE값이 0.15(cut-off value) 이상이면 시험물질은 광독성으로 분류한다.

57. PIF 값 및 MPE 값은 소프트웨어(Phototox 2.0, ZEBET at the BfR, Berlin Germany)를 사용하여 계산할 수 있다⁽²⁷⁾. (Source: <http://www.oecd.org>)

시험결과 해석

58. 검증 연구를 기반으로⁽¹⁰⁾, 시험물질은 PIF 값 2 미만 또는 MPE 값이 0.1 미만인 경우 "광독성 없음"으로 판정한다. 그리고 PIF 값이 2 이상, 5 미만 또는 MPE 값이 0.1 이상, 0.15 미만인 경우 "불확실한 광독성"로 판정하며, PIF 값이 5 이상 또는 MPE 값이 0.15 이상인 경우 광독성 있음"으로 판정한다. 의약품 화학물질에 적용되는 추가 지침이 도움이 될 수 있다⁽⁶⁾.

판정	PIF 값	MPE 값
광독성 없음 (No phototoxicity)	PIF < 2	또는 MPE < 0.1
불확실한 광독성 (Equivocal phototoxicity)*	PIF ≥ 2 및 < 5	또는 MPE ≥ 0.1 및 < 0.15
광독성 있음 (Phototoxicity)	PIF ≥ 5	또는 MPE ≥ 0.15

* 이 카테고리의 화학물질은 의약품 분야에서 전신 약물(systemic drugs)과의 연관성은 확실하지 않으며, 일반적으로 추가적인 광안전성 평가가 필요함을 의미하는 것은 아니다⁽⁶⁾.

59. 시험을 확립하기 위해서는 광독성 평가를 일상적으로 수행하기 전에 먼저 표 1의 숙련도물질을 이용하여 숙련도를 입증해야 하며, PIF나 MPE 값이 표 1에 언급된 값에 근접해야 한다⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

표 1. 숙련도 물질

화학물질명	CAS No.	PIF	MPE	광독성	Absorption Peak	용매
Amiodarone HCL	19774-82-4	>3.25	0.27-0.54	예	242 nm 300 nm (shoulder)	Ethanol
Chlorpromazine HCL	69-09-0	>14.4	0.33-0.63	예	309 nm	Ethanol
Norfloxacin	70458-96-7	>71.6	0.34-0.90	예	316 nm	Acetonitrile
Anthracene	120-12-7	>18.5	0.19-0.81	예	356 nm	Acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium	50865-01-5	>45.3	0.54-0.74	예	402 nm	Ethanol
L-Histidine	7006-35-1	no PIF	0.05-0.10	아니오	211 nm	Water
Hexachlorophene	70-30-4	1.1-1.7	0.00-0.05	아니오	299 nm 317 nm (shoulder)	Ethanol
Sodium sulfate	151-21-3	1.0-1.9	0.00-0.05	아니오	no absorption	Water

출처: Spielmann et al. 1998⁽⁹⁾

결과 해석

61. 최고농도에서만 광독성이 나타나면(특히 화학물질이 수용성인 경우), 위험성 평가를 위해 피부 흡수 및 피부 내 화학물질 축적 관련 자료 및/또는 다른 시험자료(예: ROS assay, *in vitro* 동물피부 또는 인체피부 시험, 피부모델 시험) 등을 고려할 필요가 있다.

시험 보고서

62. 시험보고서에는 다음과 같은 정보를 포함해야 한다.

시험물질

- 시험물질의 식별자료, 일반명, IUPAC, CAS 번호(알려져 있을 경우)
- 물리적 성상 및 순도

- 시험 수행과 관련된 물리화학적 특성
- 자외/가시부 광선의 흡수스펙트럼(UV/vis absorption spectrum)
- 안정성, 광안정성(알려져 있을 경우)

용매

- 용매 선택사유
- 용매에 대한 시험물질의 용해도
- 시험 배양 배지에서 용매의 백분율

세포

- 세포의 종류 및 근원
- 마이코플라스마 및 다른 오염인자 존재 여부
- 세포 계대수
- *In vitro* 3T3 NRU 광독성시험에 사용한 인공태양광조사기로 측정한 특정 계대 범위에서 세포의 광조사 민감도

시험 조건 (1); 시험물질 처리 전후의 배양조건

- 배양 배지의 종류 및 조성
- 배양조건(CO₂ 농도, 온도, 습도)
- 배양기간(처리 전, 처리 후)

시험 조건 (2); 시험물질 처리조건

- 시험물질 농도 설정 근거(UV 조사 및 비조사시)
- 시험물질의 용해도 제한이 있는 경우와 세포독성이 없는 경우, 시험물질 최고농도에 대한 근거
- 시험물질 처리 배양 배지에 대한 종류 및 조성(완충용액)
- 시험물질 처리 기간

시험 조건 (3); 광조사

- 광원의 선택이유
- 광원과 인공태양광조사기의 제조사 및 종류
- 광원의 스펙트럼 특성
- 필터의 투과 및 흡수 특성
- 인공태양광조사기의 특성 및 보정

- 광원과 시험계간의 거리
- 이 거리에서의 UVA 광세기: mW/cm^2 로 표시
- 자외선/가시광선 노출 기간
- UVA 광량 (조사 x 시간): J/cm^2 로 표시
- 광조사 시 세포 배양 온도 및 어두운 곳에서의 세포배양 온도

시험 조건 (4); *Neutral red* 생존율 시험

- *Neutral red* 처리 배양 배지의 조성
- *Neutral red* 배양기간
- 배양조건(CO_2 농도, 온도, 습도)
- *Neutral red* 추출 조건(추출액, 기간)
- *Neutral red* 광도를 읽는 분광광도기의 파장
- 이차파장(사용한 경우)
- 분광광도기 공시료(blank) 내용물(사용한 경우)

결과

- 시험물질 각각의 농도와 용매대조군에서의 세포생존율(평균값으로 표시)
- 농도-반응 곡선 분석: 가능하면 IC_{50} 계산 [$\text{IC}_{50}(+\text{Irr})$, $\text{IC}_{50}(-\text{Irr})$]
- PIF 또는 MPE의 계산을 이용하여 광조사 유무에 따른 두 농도 반응 곡선 비교
- 용매대조군의 시험 허용 기준
- 세포의 광조사 유무에 따른 절대생존율(*Neutral red* 흡광도)
- 음성대조군과 용매대조군의 기록(평균, 표준편차)
- 양성대조군의 시험 적용기준
- 양성대조군의 $\text{IC}_{50}(+\text{Irr})$, $\text{IC}_{50}(-\text{Irr})$, PIF/MPE
- 양성대조군의 기록: $\text{IC}_{50}(+\text{Irr})$, $\text{IC}_{50}(-\text{Irr})$, PIF/MPE, 평균, 표준편차

결과 토의

결론

참고문헌

1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.
2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.
3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.
4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.
5. Bauer D, Averett LA, De Smedt A, Kleinman MH, Muster W, Pettersen BA, Robles C. (2014). Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. Regul Toxicol Pharmacol, 68: 70-75.
6. ICH S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Guidance for Industry. January 2015. <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm065007.htm>
7. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.
8. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.
9. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.
10. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell,

- W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro* 12, 305-327.
11. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th - 31st October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
 12. Lynch AM, Guzzie PJ, Bauer D, Gocke E, Itoh S, Jacobs A, Frul CA, Schepky A, Tanaka N, Kasper P. (2011) Consideration on photochemical genotoxicity. II: report of the 2009 International Workshop on Genotoxicity Testing Working Group. *Mutat Res* 723: 91-100.
 13. Ceridono M, Tellner Par, Bauer D, Barroso J, Alépée N, Corvi R, De Smedt A, Fellows MD, Gibbs NK, Heisler E, Jacobs A, Jirova D, Jones D, Kanádarová H, Kasper P, Akunda JK, Krul C, Learn D, Liebsch M, Lynch AM, Muster W, Nakamura K, Nash JF, Pfannenbecker U, Phillips G, Robles C, Rogiers V, Van De Water F, Liminga UW, Vohr HW, Wattrelos O, Woods J, Zuang V, Kreysa J, Wilcox P. (2012) The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity Testing - The report of an ECVAM-EFPIA workshop. *Reg Tox Pharm.* 63: 480-488.
 14. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119-124.
 15. Brunk UT, Svensson I (1999) Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Report*; 4(1-2): 3-11.
 16. Johansson A-C, Appelqvist H, Nilsson C, Kågedal K, Roberg K, Öllinger K. (2010) Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*;15(5):527-540. doi:10.1007/s10495-009-0452-5)
 17. OECD (2018). Guidance Document on Good In Vitro Methods Practices (GIVIMP). OECD Series on Testing and Assessment No. 286. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-documenton-good-in-vitro-method-practices-givimp_9789264304796-en

18. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225-237.
19. Lambert L.A, Wamer W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.
20. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.
21. ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.
22. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275.
23. ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.
24. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679-708.
25. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995). Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127-138.
26. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of doseresponse curves and its use for predicting the *in vitro* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, 445-462.
27. Software to be used with TG 432: phototox version 2.0
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4software.htm>
28. INVITTOX Protocol 78. 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity Assay. ECVAM DB-ALM; 2008. <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
29. Baker C. S., 1998. Crystallization of neutral red vital stain from minimum essential medium due to pH instability. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 Sep;34(8):607-8

부록 1. 용어 정의

혼합물(Mixture) : 서로 반응하지 않는 두 개 이상의 물질로 구성된 혼합물 또는 용액⁽⁴⁾

광세기(복사 조도, Irradiance): 자외선(UV)이나 가시광선이 표면에 작용하는 세기 (W/m^2 또는 mW/cm^2)

광량(Dose of light): 자외선(UV) 또는 가시광선이 표면에 작용하는 양(광세기 x 시간)으로 표면적 당 Joules($W \times s$)로 표현됨(예: J/m^2 or J/cm^2)

자외선 파장대(UV light wavebands) : CIE(commission internationale de L'Eclairage) 권고에 따라 **UVA**(315-400nm), **UVB**(280-315nm), **UVC**(100-280nm)로 구분함. UVA와 UVB를 320nm에서 구분하기도 하고 UVA를 340nm에서 UVA-1과 UVA-2로 나눌 수도 있음

세포생존율(Cell viability) : 세포 전체 활성을 측정하는 지표로서, 시험에 사용된 종말점과 시험설계에 따라 총 세포수 및 세포 생명력과 관련됨(예: 세포 라이소솜으로 neutral red 염색액이 흡수되는 정도)

상대 세포생존율(Relative cell viability) : 용매대조군(또는 음성대조군)에 대한 세포생존율을 표시하는 것으로 시험물질을 처리하지 않은 전체 시험과정(Irr +/-)을 거쳐서 나온 결과

몰 흡광계수(Molar Extinction Coefficient, MEC): 몰 흡광계수(몰 흡광도라고도 함)는 특정 조건(예: 용매, 온도 및 파장)에 있는 분자의 상수이며 그 분자가 얼마나 광자를 흡수하는지에 대한 효과를 반영함(주로 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ 로 표시)

PIF(Photo-irritation-factor, 광자극 지수) : 시험물질 처리 후 자외선 조사유무에 따른 IC_{50} 값을 비교하여 생성된 지수

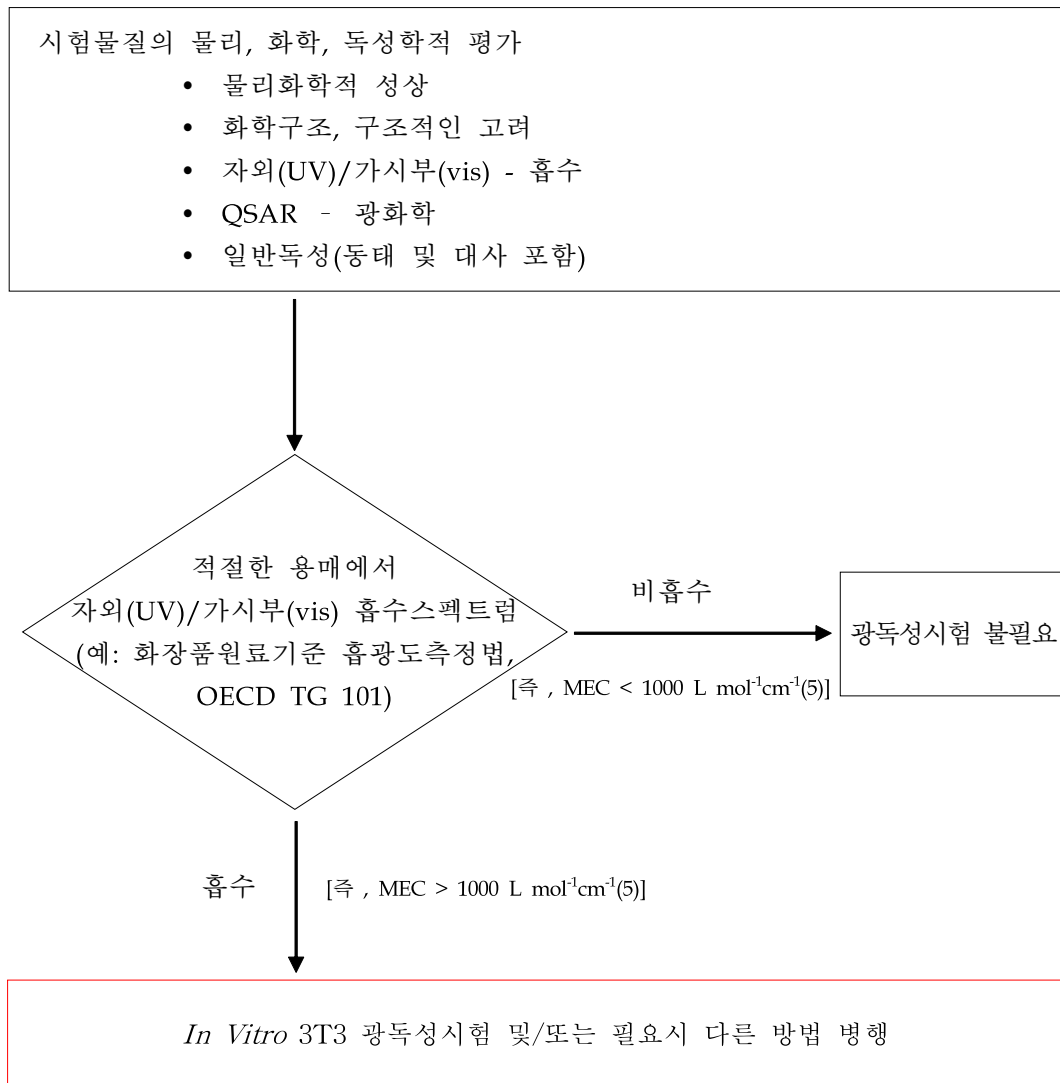
IC_{50} : 세포의 생존율이 50%로 감소되는 시험물질의 농도

MPE(Mean photo effect, 평균 광효과) : 시험물질 처리 후 자외선 조사유무에 따른 농도 반응 곡선을 수학적으로 계산하여 얻은 값

광독성(Phototoxicity) : 화학물질이 피부에 적용되거나 전신투여 된 후 피부가 빛에 노출 되었을 때 나타나는 급성 독성 반응

부록 2. 화학물질 광독성 시험의 흐름도

일부 규제 가이드라인에서 이전 임계값(MEC 값)이 사용되고 있을 수 있다. $MEC > 1000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 는 과학적 데이터에 근거하지만⁽⁵⁾, 확실하지 않는 경우 규제당국과 상의해야 한다.



부록 3.

그림1. 필터를 장착한 광조사기의 스펙트럼 광세기 분포도

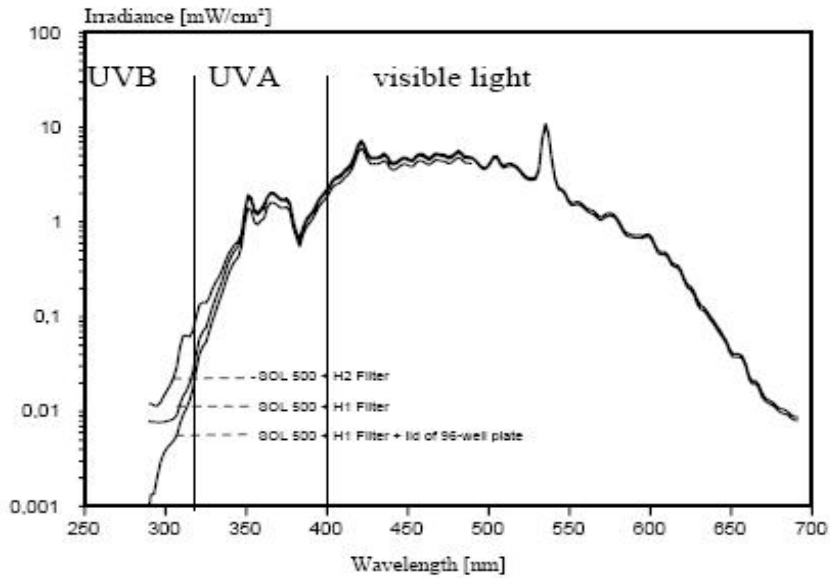


그림 1은 필터를 사용한 광조사기의 여과된 스펙트럼 분포도의 한 예이다. 이 그림은 *in vitro* 3T3 NRU 광독성시험법 검증을 위해 사용되었던 광조사기(doped metal halide source)로부터 얻은 결과이다⁽⁶⁾⁽⁸⁾⁽¹⁷⁾. 2개의 다른 필터(H1 필터, H2 필터)와 플레이트 뚜껑을 닫았을 때의 추가적인 여과 효과(filtering effect)를 보여준다. H2 필터는 많은 양의 UVB에 견딜 수 있는 시험계(피부모델시험, RBC 광용혈 시험)에서만 사용되었고, 3T3 NRU 광독성시험에는 H1 필터가 사용되었다. 96-well 플레이트 뚜껑의 추가 여과기능이 UVB 범위에서 주로 관찰되며, Amiodarone과 같은 화학물질이 자극하기에 충분한 UVB가 여전히 남아있음을 보여준다(Table 2 참고).

그림 2. BALB/c 3T3 세포 광조사 민감도(UVA로 측정)

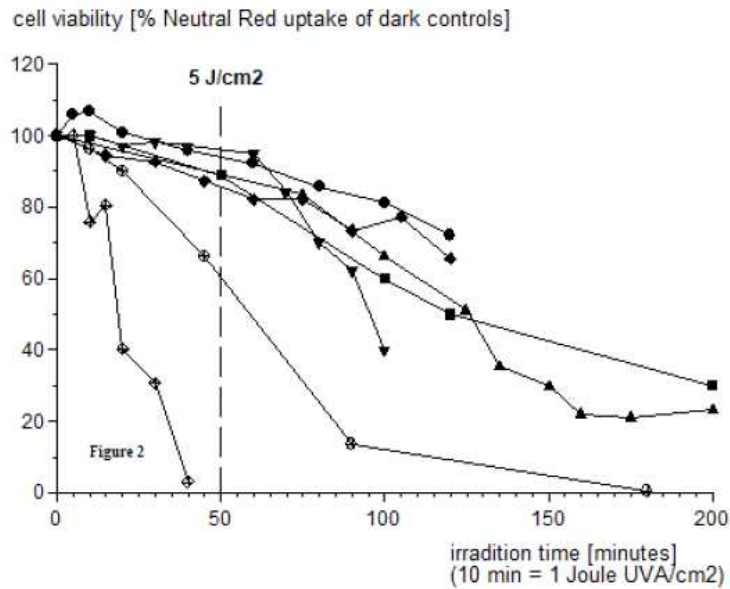


그림 2는 7개의 실험실에서 3T3 NRU 광독성시험법 검증을 위해 UVA 범위에서 측정된 세포에 대한 광조사 민감도이다⁽¹⁾. Open symbol로 표시된 2개의 곡선은 나이든 세포(계대가 많이 이루어진 세포)에서 얻어진 값으로, 새로운 세포주로 교체되어야 한다. Bold symbol로 표시된 곡선은 광조사 내성이 있는 세포를 나타낸다. 이 그림에서 세포독성이 없는 최고 조사량은 UVA 영역에서 5 J/cm²(수직점선)이다.

OECD/OCDE

432

Adopted:
18 June 2019

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS

In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test

INTRODUCTION

1. Phototoxicity is defined as a toxic response elicited by topically or systemically administered photoreactive chemicals after the exposure of the body to environmental light.
2. The *in vitro* 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) phototoxicity test is used to identify the phototoxic potential of a test chemical activated by exposure to light. The test evaluates photo-cytotoxicity by the relative reduction in viability of cells exposed to the test chemical in the presence versus absence of light. Chemicals identified as positive in this test may be phototoxic *in vivo*, following topical application or systemic application and distribution to the skin and/or eyes.
3. Definitions used in this Test Guideline are provided in Annex A.

INITIAL CONSIDERATION

4. Many types of chemicals have been reported to induce phototoxic effects (1)(2)(3)(4). Their common feature is their ability to absorb light energy within the sunlight range. Photoreactions require sufficient absorption of light quanta. Thus, before testing is considered, a UV/vis absorption spectrum of the test chemical may be determined according to OECD Test Guideline 101. It has been reported that if the molar extinction/absorption coefficient (MEC) is less than $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (measured in methanol), the chemical is unlikely to be photoreactive (5)(6). Such chemicals may not need to be tested in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test or any other biological test for adverse photochemical effects (1)(7). In general, this principle applies to all test chemicals, however, depending on the intended use of the chemical or potential exposure conditions, more specific guidelines may apply (such as ICH S10 for pharmaceuticals) (5). See also Annex B.

© OECD, (2019)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at <http://www.oecd.org/termsandconditions/>

5. The reliability and relevance of the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test was evaluated (8)(9)(10)(11). The *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test was shown to be predictive of acute phototoxicity effects in animals and humans *in vivo*. The test is not designed to predict other adverse effects that may arise from combined action of a chemical and light, e.g., it does not address photogenotoxicity, photoallergy, or photocarcinogenicity, *per se*. Furthermore, the test has not been designed to address indirect mechanisms of phototoxicity, effects of metabolites of the test chemical, or effects of mixtures. However, in some cases, a negative *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test may obviate the need for other testing, e.g. photogenotoxicity (see Note 2 (6) (12)(13)).
6. The *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test does not need to be performed with a metabolic activation system, because at this time, there is no evidence that any phototoxicants would be missed in the absence of metabolic activation toxicants (13).

PRINCIPLE OF THE TEST METHOD

7. The *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test is based on a comparison of the cytotoxicity of a chemical when tested in the presence and in the absence of exposure to a non-cytotoxic dose of simulated solar light. Cytotoxicity in this test is expressed as a concentration-dependent reduction of the uptake of the vital dye Neutral Red (NR) when measured 18-24 hours after treatment with the test chemical and irradiation (14). NR is a weak cationic dye that readily penetrates cell membranes by non-ionic diffusion and accumulates intracellularly in lysosomes. NR is not charged at close-to-neutral pH of the cytoplasm but becomes positively charged and trapped in low pH of lysosomal lumen. The low pH of lysosomal lumen is actively maintained, requires ATP, and is dependent on integrity of the lysosomal membrane. Phototoxins can induce cell damage through formation of Reactive Oxygen Species (ROS) and other mechanisms that lead to increased permeability of the lysosomal membrane, reduction in the pH gradient, and other changes that gradually become irreversible (15)(16). Such changes brought about by the action of xenobiotics result in a decreased uptake and binding of NR. It is thus possible to distinguish between viable and damaged or dead cells.
8. BALB/c 3T3 cells are maintained in culture for 18-24 h for formation of monolayers. Two 96-well plates per test chemical are pre-incubated with eight different concentrations of the test chemical for 1 h. Thereafter one of the two plates is exposed to an irradiation dose whereas the other plate is kept in the dark. In both plates, the treatment buffer is then replaced with fresh culture medium and cell viability is determined by NRU after an 18-24 h incubation. Cell viability is expressed as percentage of test chemical-treated NRU values compared with solvent controls, and is calculated for each test concentration. To predict the phototoxic potential, the concentration-responses obtained in the presence and in the absence of irradiation are compared, including the concentration reducing cell viability to 50 % compared to the solvent controls (i.e., IC₅₀).

DESCRIPTION OF THE TEST METHOD

*Preparations**Cells*

9. An immortalised mouse fibroblast cell line, BALB/c 3T3, clone A31, obtained from either the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, or from the European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, was used in the validation study. It is recommended that cells be obtained from a recognised cell depository (23). Other cells or cell lines may be used with the same test procedure if culture conditions are adapted to the specific needs of the cells, but equivalency must be demonstrated (i.e., appropriate responses to reference chemicals), in accordance with the principles of Guidance Document No. 34 (22).

10. Cells should be checked for mycoplasma contamination upon arrival in the laboratory (see (17) for recommendations) and only used if none is found (18).

11. It is important that UV sensitivity of the cells is checked regularly according to the quality control procedure described in this guideline. Because the UVA sensitivity of cells may increase with the number of passages, BALB/c 3T3 cells with a total passage number preferably less than 100 should be used in the assay (see paragraph 29 and Annex C). If cells of a higher passage numbers are used data must be available to demonstrate that cells adhere to the quality parameters in this guideline.

Media and culture conditions

12. Appropriate culture media and incubation conditions should be used for routine cell passage and during the test procedure, e.g., for BALB/c 3T3 cells these are DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 10% new-born calf serum, 4 mM glutamine, penicillin (100 IU), and streptomycin (100 µg/mL), and humidified incubation at 37°C, targeting 5-7.5% CO₂ depending on the buffer (see paragraph 17). Depending on buffer used, the CO₂ levels may be adjusted. It is important that cell culture conditions assure a cell division cycle time within the normal historical range of the cells or cell line used.

Preparation of cultures

13. Cells from frozen stock cultures are seeded in culture medium at an appropriate density and subcultured at least once before they are used in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test.

14. Cells used for the phototoxicity test are seeded in culture medium at the appropriate density so that cultures will not reach confluence by the end of the test, i.e., when cell viability is determined 48 h after seeding of the cells. For BALB/c 3T3 cells grown in 96-well plates, the recommended cell seeding density is 1×10^4 cells per well.

15. For each test chemical cells are seeded identically in two separate 96-well plates. Both plates are then taken concurrently through the entire test procedure under identical culture conditions except for the time period where one of the plates is irradiated (+Irr) and the other one is kept in the dark (-Irr).

Preparation of test chemical

16. Test chemicals must be prepared fresh on the day of testing unless data demonstrate their stability in storage. It is recommended that all chemical handling and the initial treatment of cells be performed under conditions that would avoid photoactivation or degradation of the test chemical prior to irradiation.

17. Ideally, test chemicals shall be dissolved in buffered salt solutions, e.g. Earle's or Hanks' Balanced Salt Solution (EBSS or HBSS), or other physiologically balanced buffer solutions, which must be free from protein components and light absorbing components (e.g., pH indicators such as phenol red and vitamins) to avoid interference during irradiation. Since during irradiation, cells are kept for about 50 minutes outside of the CO₂ incubator, care has to be taken to avoid alkalinisation. If the cells are incubated at 5% CO₂ only, a stronger buffer should be selected.

18. Test chemicals of limited solubility in water should be dissolved in an appropriate solvent. If a solvent is used it must be present at a constant volume in all cultures (i.e., in the solvent controls, as well as in all concentrations of the test chemical) and be non-cytotoxic at that concentration.

19. If the materials are not aqueous soluble, then dimethylsulphoxide (DMSO) or ethanol (EtOH) are the recommended solvents. Other solvents of low cytotoxicity may be appropriate if the material is poorly soluble in water, DMSO or ethanol. Prior to use, all solvents should be assessed for specific properties (e.g., reaction with the test chemical, induce phototoxicity, quenching of the phototoxic effect, radical scavenging properties and/or chemical stability in the solvent). For test chemicals dissolved in the organic solvents DMSO or ethanol, a dilution series of eight dilutions will be prepared in the same solvent, and the eight stock solutions prepared in organic solvent will be transferred into the aqueous vehicle (e.g., EBSS or HBSS) for application to the cells. The stock solution for each test chemical should be prepared at the highest soluble concentration in DMSO or ethanol to achieve a maximum concentration of 1000 µg/mL in the aqueous vehicle. The final solvent concentration in the aqueous vehicle should be kept constant in all of the eight test concentrations (generally 1% (v/v)). Test chemicals prepared in the organic solvent may precipitate upon transfer into the aqueous vehicle. Accordingly, the aqueous dosing dilutions should be evaluated for solubility and the observations recorded.

20. Vortex mixing, sonication, and/or warming to appropriate temperatures may be used to aid solubilisation unless this compromises the stability of the test chemical.

Irradiation Conditions

21. *Light source:* The choice of an appropriate light source (e.g. a solar simulator) and filters is a crucial factor in phototoxicity testing. Light of the UVA and visible regions is usually associated with phototoxic reactions *in vivo* (3)(19), whereas generally UVB is of less relevance but is highly cytotoxic; the cytotoxicity increases 1000-fold as the wavelength goes from 313 to 280 nm (20). Acceptable light sources emit the entire solar spectrum (290 nm through 700 nm). Adjustment of the spectrum can be performed using filters to attenuate UVB while allowing transmittance of UVA and visible light (see Annex C). Furthermore, the wavelengths, doses employed, and light source equipment used (e.g., open or closed system) should not be unduly deleterious to the test system (e.g., from emission of heat/ wavelengths in the infrared region).

22. Simulation of sunlight with solar simulators is considered the optimal artificial light source. The irradiation power distribution of the filtered solar simulator should be close to

that of outdoor daylight given in (21). Both xenon arcs and (doped) mercury-metal halide arcs are used as solar simulators (22). The latter have the advantage of emitting less heat and being cheaper, but the match to sunlight is not as good as that provided by xenon arcs. All solar simulators emit significant quantities of UVB and should be suitably filtered to attenuate the highly cytotoxic UVB wavelengths (Annex A). Because cell culture plastic materials contain UV stabilisers, the transmitted spectrum should be measured through the same type of 96-well plate lid as will be used in the assay. Irrespective of measures taken to attenuate parts of the spectrum by filtering or by unavoidable filter effects of the equipment, the spectrum recorded below these filters should not deviate from standardised outdoor daylight (21). External light standard D65, the internationally recognized emission standard for outdoor daylight, is provided in ISO DIS 18909:2006. An example of the spectral irradiance distribution of the filtered solar simulator used in the validation study of the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test is given in (10)(23). See also Annex C Figure 1.

23. *Dosimetry*: The intensity of light (irradiance) should be regularly checked before each phototoxicity test using a suitable broadband UVA-meter (Annex A). Irradiance should be measured through the same type of 96-well plate lid as will be used in the assay. The UVA-meter must have been calibrated to the light source. At greater intervals, an externally calibrated reference UV-vis spectroradiometer should be used to measure spectral irradiance of the filtered light source on-site and to adjust the calibration of the broadband UVA-meter if needed. Alternatively, regular calibration of the UVA-meter could be performed at a central calibration laboratory provided that this facility is equipped with an identical light source/filter combination.

24. A dose of 5 J/cm² (as measured in the UVA range) was determined to be non-cytotoxic to BALB/c 3T3 cells and sufficiently potent to excite chemicals to elicit phototoxic reactions (6)(24). To achieve 5 J/cm² within a time period of 50 min, irradiance was adjusted to 1.7 mW/cm². See Annex C, Figure 2. Alternate exposure times and/or irradiance values may be used to achieve 5 J/cm² using the formula:

$$25. \quad t \text{ (min)} = \frac{\text{irradiation dose (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiance (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

26. Similarly, if another cell line or a different light source is used, the irradiation should be calibrated so that a dose regimen can be selected that is not deleterious to the cells but sufficient to excite standard phototoxins (e.g., proficiency chemicals described in Table 1) (28).

Test conditions

Test chemical concentrations

27. The ranges of concentrations of a chemical tested in the presence (+Irr) and in the absence (-Irr) of light should be adequately determined in dose range-finding experiments. It may be useful to assess solubility initially and at 60 min (or whatever treatment time is to be used), as solubility can change during the course of exposure. To avoid toxicity induced by improper culture conditions or by highly acidic or alkaline chemicals, the pH of the cell cultures with added test chemical should be in the range 6.5 to 7.8.

28. The highest concentration of the test chemical should be within physiological test conditions (e.g., osmotic and pH stress should be avoided). Depending on the test chemical, it may be necessary to consider other physio-chemical properties as factors limiting the highest test concentration. For relatively insoluble chemicals that are not toxic at concentrations up to the saturation point, the highest achievable concentration should be tested. For non-cytotoxic chemicals (no IC_{50} value up to precipitation), it might be useful to demonstrate the solubility limit under assay conditions. In this case, including two or three concentrations in the main experiment that will likely show precipitation may be useful. These concentration(s) should then be excluded from phototoxicity analyses. The maximum concentration of a test chemical should not exceed 1000 $\mu\text{g/mL}$. In many cases, the maximum concentration can be reduced to 100 $\mu\text{g/mL}$, since compounds without any significant cytotoxicity (under irradiation) up to this limit can be considered as being devoid of relevant phototoxicity (5). A higher maximum concentration, without irradiation, might still be considered to establish IC_{50} values for Photo Irritation Factor (PIF) calculation. A geometric dilution series of 8 test chemical concentrations with a constant dilution factor should be used (see paragraph 47).

29. If there is information (from a range finding experiment) that the test chemical is not cytotoxic up to the limit concentration in the dark experiment (-Irr), but is highly cytotoxic when irradiated (+Irr), the concentration ranges to be selected for the (+Irr) experiment may differ from those selected for the (-Irr) experiment to fulfil the requirement of adequate data quality.

Controls

30. *Radiation sensitivity of the cells, establishing of historical data:* A working bank of cells may be checked at least once for sensitivity to the light source by assessing their viability following exposure to increasing doses of irradiation. UV sensitivity should be demonstrated on the highest cell passage number in use. Several doses of irradiation, including levels greater than those used for the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test should be used in this assessment. These doses are quantitated easier by measurements of UV parts of the light source. Cells are seeded at the same density used in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test and irradiated the next day (see Test procedure section). Cell viability is then determined on the third day using Neutral Red uptake. It should be demonstrated that the resulting highest non-cytotoxic dose (e.g., in the validation study: 5 J/cm^2 [UVA]) was sufficient to classify the proficiency chemicals (Table 1) correctly.

31. *Radiation sensitivity, check of current test:* The test meets the quality criteria if the irradiated solvent controls show a viability of more than 80% when compared with non-irradiated solvent control.

32. *Viability of solvent controls:* The absolute optical density ($OD_{540\pm 10 \text{ NRU}}$) of the Neutral Red extracted from the solvent controls indicates whether the 1×10^4 cells seeded per well have grown with a normal doubling time during the two days of the assay. A test meets the acceptance criteria if the mean $OD_{540\pm 10 \text{ NRU}}$ of the solvent controls is ≥ 0.4 (i.e., approximately twenty times the background solvent absorbance).

33. Attention should be paid to crystallisation of the Neutral Red (NR) solution during the incubation with the cells, since crystals may lead to high variability. A shift in the pH of the neutral red solution may trigger formation of NR crystals. Addition of pH stabilisers (e.g., HEPES) to the cell culture medium may prevent crystallization (29). It is recommended to pre-qualify the stock Neutral Red before use in the experiments since the quality from various

suppliers may differ. Filtration or centrifugation of the solution of Neutral Red in the cell culture media is highly recommended.

34. *Positive control:* A known phototoxic chemical shall be tested concurrently with each *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. Chlorpromazine (CPZ) is recommended. For CPZ tested with the standard protocol in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, the following test acceptance criteria were defined: CPZ irradiated (+Irr): $IC_{50} = 0.1$ to $2.0 \mu\text{g/mL}$; CPZ non-irradiated (-Irr): $IC_{50} = 7.0$ to $90.0 \mu\text{g/mL}$. The Photo Irritation Factor (PIF), should be ≥ 6 . The historical performance of the positive control should be monitored. Each laboratory performing this assay should establish its own historical databases including Mean Photo Effect (MPE) to monitor the performance over time (Table 1).

35. Other phototoxic chemicals, suitable for the chemical class or solubility characteristics of the chemical being evaluated, may be used as the concurrent positive controls in place of chlorpromazine (Table 1).

Test procedure (8)(9)(10)(22)(23)(24):

1st day:

36. Dispense $100 \mu\text{L}$ culture medium into the peripheral wells of a 96-well tissue culture microtiter plate (= blanks). In the remaining wells, dispense $100 \mu\text{L}$ of a cell suspension of 1×10^5 cells/mL in culture medium (= 1×10^4 cells/well). Two plates should be prepared for each series of individual test chemical concentrations, including the solvent controls. Similarly, two plates should be prepared for the positive controls, including solvent controls.

37.

38. Incubate cells for 18-24 h (see paragraph 12) until they form an approximately half confluent monolayer. This incubation period allows for cell recovery, adherence, and exponential growth.

39.

2nd day:

40. After incubation, decant culture medium from the cells and wash gently with $150 \mu\text{L}$ of the buffer solution used for incubation (see paragraph 17). Add $100 \mu\text{L}$ of the buffer containing the appropriate concentration of test chemical or solvent (solvent control). Apply 8 different concentrations of the test chemical to both plates. Incubate cells with the test chemical in the dark for 60 minutes.

41. From the two plates prepared for each series of 8 test chemical concentrations and the controls, one plate is selected for the determination of cytotoxicity (-Irr) (i.e., the control plate), and one (the treatment plate) for the determination of photocytotoxicity (+Irr).

42. To perform the +Irr exposure, irradiate the cells at room temperature for approximately 50 minutes through the lid of the 96-well plate with the highest dose of radiation that is non-cytotoxic (i.e., 5 J/cm^2 ; see also Annex C). Keep non-irradiated plates (-Irr) at room temperature in dark conditions for approximately 50 min (= light exposure time).

43. Decant test solution and carefully wash twice with $150 \mu\text{L}$ of the buffer solution used for incubation, but not containing the test material. Replace the buffer with culture medium and incubate overnight (18-24 h; see paragraph 12).

3rd day:

Microscopic evaluation

44. Cells should be examined for growth, morphology, and integrity of the monolayer using a phase contrast microscope. Changes in cell morphology and effects on cell growth should be recorded.

Neutral Red Uptake test

45. Wash the cells with 150 µL of the pre-warmed (37°C) buffer solution. Remove the buffer solution. Add 100 µL of a 50 µg/mL Neutral Red (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, CAS number 553-24-2; C.I. 50040) in medium without serum (23) and incubate (as described in paragraph 12) for 3 h.

46. After incubation, remove the NR medium, and wash cells with 150 µL of the buffer. Decant and remove excess buffer by blotting or centrifugation.

47. Add exactly 150 µL NR desorb solution (freshly prepared 49 parts water + 50 parts ethanol + 1 part acetic acid).

48. Shake the microtiter plate gently on a microtiter plate shaker for at least 10 min until NR has been extracted from the cells and has formed a homogeneous solution.

49. Measure the optical density of the NR extract at 540±10 nm in a spectrophotometer, using blanks as a reference. Save data in an appropriate electronic file format for subsequent analysis.

DATA AND REPORTING:

Quality and quantity of data

50. Appropriate concentrations which capture the concentration-responses in the presence and absence of irradiation should be selected to allow meaningful analysis of the data, and if possible a determination of the concentration of test chemical by which cell viability is reduced to 50% (IC₅₀). If cytotoxicity is observed, the ranges of concentrations tested may be updated to capture the range of concentration-responses (e.g., those concentrations which result in viabilities above and below 50%).

51. For both clearly positive and clearly negative results (see paragraph 53), the primary experiment, supported by one or more preliminary concentration range-finding experiment(s), may be sufficient.

52. Equivocal, borderline, or unclear results should be clarified by further testing (see also paragraph 56). In such cases, modification of experimental conditions should be considered. Experimental conditions that might be modified include the concentration range or spacing, the incubation time, and the irradiation-exposure time. A shorter exposure time may be appropriate for water-unstable chemicals.

Evaluation of results

53. To enable evaluation of the data, a Photo-Irritation-Factor (PIF) or Mean Photo Effect (MPE) should be calculated.

54. For the calculation of the measures of photocytotoxicity (see below) the set of discrete concentration-response values has to be approximated by an appropriate continuous concentration-response curve (model). Fitting of the curve to the data is commonly performed by a non-linear regression method (25). To assess the influence of data variability on the fitted curve a bootstrap procedure is recommended.

55. A Photo-Irritation-Factor (PIF) is calculated using the following formula:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

If an IC_{50} in the presence or absence of light cannot be calculated, a PIF cannot be determined for the test material.

56. The Mean Photo Effect (MPE) is based on comparison of the complete concentration response curves (26). It is defined as the weighted average across a representative set of photo effect values

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

The photo effect (PE_c) at any concentration (C) is defined as the product of the response effect (RE_c) and the dose effect (DE_c) i.e., $\text{PE}_c = \text{RE}_c \times \text{DE}_c$. The response effect (RE_c) is the difference between the responses observed in the absence and presence of light, i.e., $\text{RE}_c = R_c(-\text{Irr}) - R_c(+\text{Irr})$. The dose-effect is given by

$$\text{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

where C^* represents the equivalence concentration, i.e., the concentration at which the $+\text{Irr}$ response equals the $-\text{Irr}$ response at concentration C . If C^* cannot be determined because the response values of the $+\text{Irr}$ curve are systematically higher or lower than $R_c(-\text{Irr})$ the dose effect is set to 1. The weighting factors w_i are given by the highest response value, i.e., $w_i = \text{MAX}\{R_i(+\text{Irr}), R_i(-\text{Irr})\}$. The concentration grid C_i is chosen such that the same number of points falls into each of the concentration intervals defined by the concentration values used in the experiment. The calculation of MPE is restricted to the maximum concentration value at which at least one of the two curves still exhibits a response value of at least 10%. If this maximum concentration is higher than the highest concentration used in the $+\text{Irr}$ experiment the residual part of the $+\text{Irr}$ curve is set to the response value "0". The chemical is classified as phototoxic depending on whether the MPE value is larger than a properly chosen cut-off value ($\text{MPE}_{\geq 0.15}$).

57. A software package for the calculation of the PIF and MPE is available from the OECD Secretariat (27).

Interpretation of Results

58. Based on the validation study (10), a test chemical with a PIF < 2 or an MPE < 0.1 predicts: “no phototoxicity”. A PIF ≥ 2 and < 5 or an MPE ≥ 0.1 and < 0.15 predicts: “equivocal” phototoxicity and a PIF ≥ 5 or an MPE ≥ 0.15 predicts: “phototoxicity”. Further guidance specific to pharmaceutical chemicals other guidelines may be helpful (6).

Prediction	PIF		MPE
No phototoxicity	PIF < 2	or	MPE < 0.1
Equivocal phototoxicity*	PIF ≥ 2 and < 5	or	MPE ≥ 0.1 and < 0.15
Phototoxicity	PIF ≥ 5	or	MPE ≥ 0.15

Note: * In the pharmaceutical sector, chemicals in this category are of questionable relevance for systemic drugs and generally do not warrant further photosafety evaluation (6).

59. For any laboratory initially establishing this assay, the proficiency chemicals listed in Table 1 should be tested to establish proficiency prior to the routine testing of test chemicals for phototoxicity. PIF or MPE values should be close to the values mentioned in Table 1 (9)(10)(11).

Table 1. Proficiency chemicals

Chemical	CAS No.	PIF	MPE	Phototoxic	Absorption Peak
Amiodarone HCL	19774- 82-4	>3.25	0.27- 0.54	Yes	242 nm 300 nm (shoulder) in ethanol
Chlorpromazine HCL	69-09-0	>14.4	0.33- 0.63	Yes	309 nm in ethanol
Norfloxacin	70458- 96-7	>71.6	0.34- 0.90	Yes	316 nm in acetonitrile
Anthracene	120-12-7	>18.5	0.19- 0.81	Yes	356 nm in acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium	50865- 01-5	>45.3	0.54- 0.74	Yes	402 nm in ethanol
L – Histidine	7006-35- 1	no PIF	0.05- 0.10	No	211 nm in water
Hexachlorophene	70-30-4	1.1- 1.7	0.00- 0.05	No	299 nm 317 nm (shoulder) in ethanol
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	1.0- 1.9	0.00- 0.05	No	no absorption in water

Source: Values from Spielmann et al. 1998 (9).

Interpretation of data

61. If phototoxic effects are observed only at the highest test concentration, (especially for water soluble test chemicals) additional considerations may be necessary for assessment of hazard. These may include data on skin absorption, and accumulation of the chemical in the skin and / or data from other tests, e.g., testing of the chemical in the ROS assay, *in vitro* animal or human skin assays, or skin models.

Test Report

62. The test report should include the following information:

Test chemical:

- identification data, common generic names and IUPAC and CAS number, if known;
- physical nature and purity;
- physicochemical properties relevant to conduct of the study;
- UV/vis absorption spectrum;
- stability and photostability, if known.

Solvent:

- justification for choice of solvent;
- solubility of the test chemical in solvent;
- percentage of solvent present in treatment medium.

Cells:

- type and source of cells;
- absence of mycoplasma and other contamination;
- cell passage number;
- Radiation sensitivity of cells from a particular passage range, determined with the irradiation equipment used in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test.

Test conditions (1); *incubation before and after treatment*:

- type and composition of culture medium;
- incubation conditions (CO₂ concentration; temperature; humidity);
- duration of incubation (pre-treatment; post-treatment).

Test conditions (2); *treatment with the chemical*:

- rationale for selection of concentrations of the test chemical used in the presence and in the absence of irradiation;
- in case of limited solubility of the test chemical and absence of cytotoxicity: rationale for the highest concentration tested;
- type and composition of treatment medium (buffered salt solution);
- duration of the chemical treatment.

Test conditions (3); *irradiation*:

- rationale for selection of the light source used;
- manufacturer and type of light source and radiometer
- spectral irradiance characteristics of the light source;
- transmission and absorption characteristics of the filter(s) used;
- characteristics of the radiometer and details on its calibration;
- distance of the light source from the test system;
- UVA irradiance at this distance, expressed in mW/cm²;
- duration of the UV/vis light exposure;
- UVA dose (irradiance x time), expressed in J/cm²;
- temperature of cell cultures during irradiation and cell cultures concurrently kept in the dark.

Test conditions (4); *Neutral Red viability test*:

- composition of Neutral Red treatment medium;
- duration of Neutral Red incubation;
- incubation conditions (CO₂ concentration; temperature; humidity);
- Neutral Red extraction conditions (extractant; duration);
- wavelength used for spectrophotometric reading of Neutral Red optical density;
- second wavelength (reference), if used;
- content of spectrophotometer blank, if used.

Results:

- cell viability obtained at each concentration of the test chemical, expressed in percent viability of mean, concurrent solvent controls;
- concentration response curves (test chemical concentration vs. relative cell viability) obtained in concurrent +Irr and -Irr experiments;
- analysis of the concentration-response curves: if possible, computation/calculation of IC₅₀ (+Irr) and IC₅₀ (-Irr);

- comparison of the two concentration response curves obtained in the presence and in the absence of irradiation, either by calculation of the Photo-Inhibition-Factor (PIF), and/or by calculation of the Mean-Photo-Effect (MPE) depending on the dose-response curve;
- test acceptance criteria; concurrent solvent control;
- absolute viability (optical density of Neutral Red extract) of irradiated and non-irradiated cells;
- historic negative and solvent control data; means and standard deviations.
- test acceptance criteria; concurrent positive control;
- $IC_{50}(+Irr)$ and $IC_{50}(-Irr)$ and PIF/MPE of positive control chemical;
- historic positive control chemical data: $IC_{50}(+Irr)$ and $IC_{50}(-Irr)$ and PIF/MPE; means and standard deviations.

Discussion of the results.

Conclusions.

LITERATURE

- (1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.
- (2) Santamaria, L. and Primo, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.
- (3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.
- (4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.
- (5) Bauer D, Averett LA, De Smedt A, Kleinman MH, Muster W, Pettersen BA, Robles C. (2014). Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. Regul Toxicol Pharmacol, 68: 70-75.
- (6) ICH S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Guidance for Industry. January 2015. <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm065007.htm>
- (7) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris
- (8) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U.,

- Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a BALB/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic. In Vitro* 8, 793-796.
- (9) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXII/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.
- (10) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro* 12, 305-327.
- (11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th – 31st October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat
- (12) Lynch AM, Guzzie PJ, Bauer D, Gocke E, Itoh S, Jacobs A, Frul CA, Schepky A, Tanaka N, Kasper P. (2011) Consideration on photochemical genotoxicity. II: report of the 2009 International Workshop on Genotoxicity Testing Working Group. *Mutat Res* 723: 91-100.
- (13) Ceridono M, Tellner Par, Bauer D, Barroso J, Alépée N, Corvi R, De Smedt A, Fellows MD, Gibbs NK, Heisler E, Jacobs A, Jirova D, Jones D, Kanádarová H, Kasper P, Akunda JK, Krul C, Leam D, Liebsch M, Lynch AM, Muster W, Nakamura K, Nash JF, Pfannenbecker U, Phillips G, Robles C, Rogiers V, Van De Water F, Liminga UW, Vohr HW, Wattrelos O, Woods J, Zuang V, Kreysa J, Wilcox P. (2012) The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: practical experience and implications for phototoxicity Testing – The report of an ECVAM-EFPLA workshop. *Reg Tox Pharm.* 63: 480-488.
- (14) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119-124.
- (15) Brunk UT, Svensson I (1999) Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Report*; 4(1-2): 3-11.
- (16) Johansson A-C, Appelqvist H, Nilsson C, Kågedal K, Roberg K, Öllinger K. (2010) Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis*;15(5):527-540. doi:10.1007/s10495-009-0452-5)
- (17) OECD (2018). Guidance Document on Good In Vitro Methods Practices (GIVIMP). OECD Series on Testing and Assessment No. 286. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-good-in-vitro-method-practices-givimp_9789264304796-en
- (18) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225-237.

- (19) Lambert L.A., Wamer W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.
- (20) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.
- (21) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.
- (22) Sunscreen Testing (UV-B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275
- (23) ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.
- (24) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679-708.
- (25) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127-138.
- (26) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, 445-462.
- (27) Software to be used with TG 432: phototox version 2.0
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4software.htm>
- (28) INVITTOX Protocol 78. 3T3 Neutral Red Uptake (NRU) Phototoxicity Assay. ECVAM DB-ALM; 2008. <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (29) Baker C. S., 1998. Crystallization of neutral red vital stain from minimum essential medium due to pH instability. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998 Sep;34(8):607-8

Annex A. DEFINITIONS

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more chemicals in which they do not react (4).

Irradiance: the intensity of ultraviolet (UV) or visible light incident on a surface, measured in W/m^2 or mW/cm^2 .

Dose of light: the quantity (= intensity x time) of ultraviolet (UV) or visible radiation incident on a surface, expressed in Joules (= $W \times s$) per surface area, e.g., J/m^2 or J/cm^2 .

UV light wavebands: the designations recommended by the CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) are: UVA (315-400nm) UVB (280-315nm) and UVC (100-280nm). Other designations are also used; the division between UVB and UVA is often placed at 320nm, and the UVA may be divided into UV-A1 and UV-A2 with a division made at about 340nm.

Cell viability: parameter measuring total activity of a cell population (e.g., uptake of the vital dye Neutral Red into cellular lysosomes), which, depending on the endpoint measured and the test design used, correlates with the total number and/or vitality of the cells.

Relative cell viability: cell viability expressed in relation to solvent (negative) controls which have been taken through the whole test procedure (either +Irr or -Irr) but not treated with test chemical.

MEC (Molar Extinction/absorption Coefficient): a constant for any given molecule under a specific set of conditions (e.g. solvent, temperature, and wavelength) and reflects the efficiency with which a molecule can absorb a photon (typically expressed as $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

PIF (Photo-Irritation-Factor): factor generated by comparing two equally effective cytotoxic concentrations (IC_{50}) of the test chemical obtained in the absence (-Irr) and in the presence (+Irr) of a non-cytotoxic irradiation with UVA/vis light.

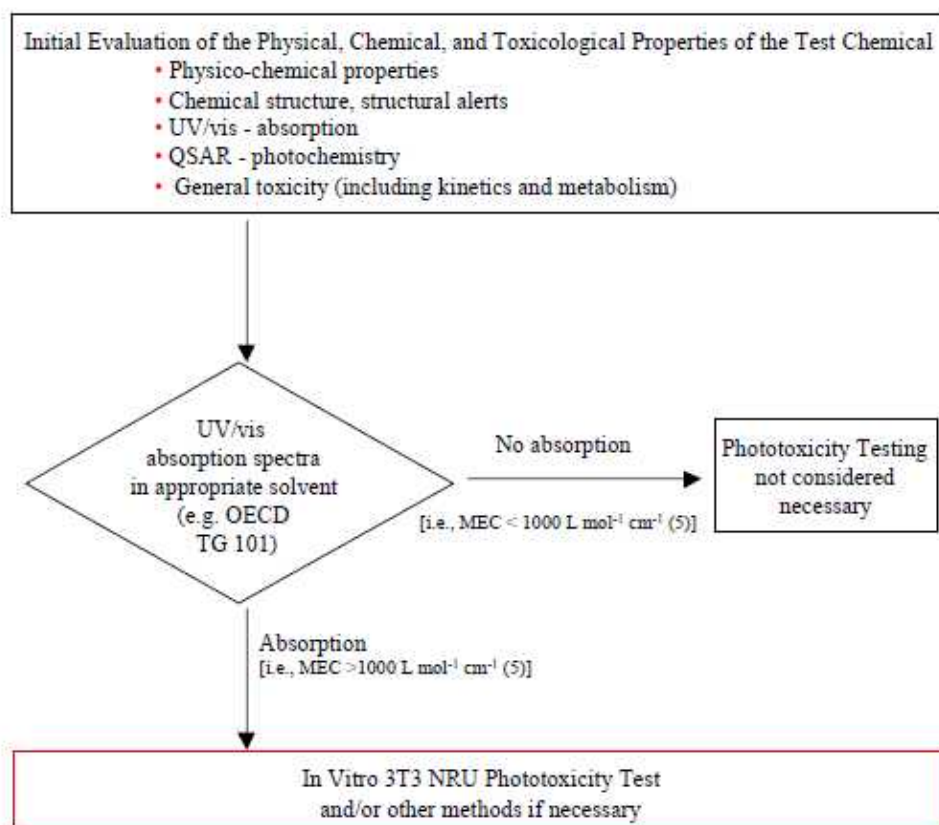
IC_{50} : the concentration of the test chemical by which the cell viability is reduced by 50%

MPE (Mean-Photo-Effect): measurement derived from mathematical analysis of the concentration response curves obtained in the absence (-Irr) and in the presence (+Irr) of a non-cytotoxic irradiation with UVA/vis light.

Phototoxicity: acute toxic response that is elicited after the first exposure of skin to certain chemicals and subsequent exposure to light, or that is induced similarly by skin irradiation after systemic administration of a chemical.

Annex B. The role of the 3T3 NRU test in a sequential approach to the phototoxicity testing of chemicals.

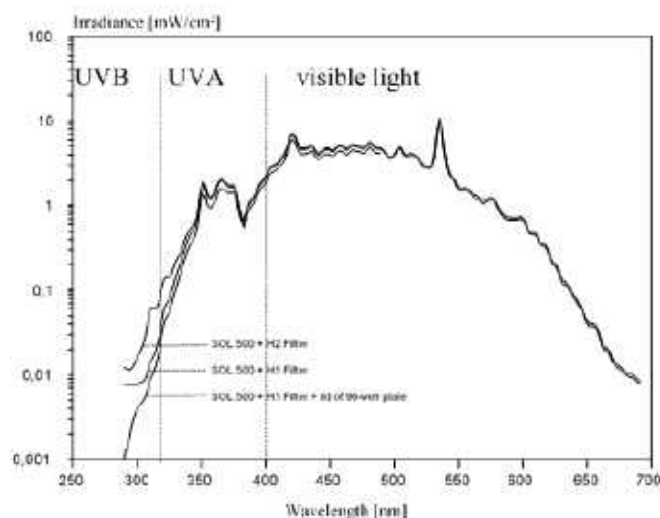
Note: In some regulatory guidelines, older threshold MEC values may have been used. The $\text{MEC} > 1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ is based on scientific data (5), but when in doubt, regulatory authorities should be consulted.



Annex C.

Figure 1. Spectral power distribution of a filtered solar simulator.

See paragraph 22. Figure 1 gives an example of an acceptable spectral power distribution of a filtered solar simulator. It is from the doped metal halide source used in the validation trial of the 3T3 NRU PT (6)(8)(17). The effect of two different filters and the additional filtering effect of the lid of a 96-well cell culture plate are shown. The H2 filter was only used with test systems that can tolerate a higher amount of UVB (skin model test and red blood cell photo-hemolysis test). In the 3T3 NRU-PT the H1 filter was used. The figure shows that additional filtering effect of the plate lid is mainly observed in the UVB range, still leaving enough UVB in the irradiation spectrum to excite chemicals typically absorbing in the UVB range, like Amiodarone (see Table 2).



“화장품 등 광독성 동물대체시험법(체외 3T3 NRU 시험법) 가이드라인(민원인 안내서) ”

발 행 일	2021년 8월
발 행 인	식품의약품안전평가원장 서경원
편집위원장	독성평가연구부장 정자영
편 집 위 원	윤혜성, 김광진, 윤소영, 강남희, 이정선, 이용선, 홍미혜, 윤남희, 차민희
도움주신분	임경민(이화여자대학교), 배옥남(한양대학교), 안수선(아모레퍼시픽)
문 의 처	식품의약품안전평가원, 특수독성과 Tel : 043-719-5153, 5155 Fax : 043-719-5150
주 소	충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원

공익신고자 보호제도란?

- 공익신고자(친족 또는 동거인 포함)등이 공익신고 등으로 인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장**, **불이익보호조치**, **신변보호조치** 등을 통하여 보호하는 제도

[공직자 부조리 및 공직신고안내]

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 > 공직자 부조리 신고” 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고 센터 > 부패·공익신고 상담” 코너

♣ 보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공익보호지원과.

전화 044-200-7773