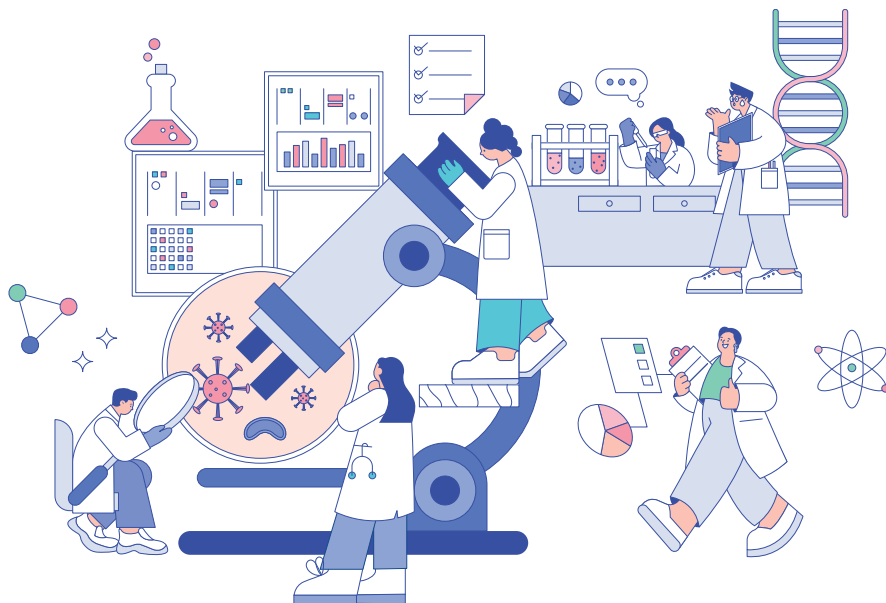


국민 안전이 기준입니다
YOUR SAFETY IS OUR STANDARD

화장품 등 동물대체시험법 가이드라인

인체피부모델을 이용한 광독성시험법

2024. 3.



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원



Korean Center for the
Validation of Alternative Methods
한국동물대체시험법검증센터

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭	화장품 등 광독성 동물대체시험법 (인체피부모델을 이용한 광독성시험법) 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"/> 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 단순 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"/> 행정사무의 통일을 기하기 위하여 내부적으로 행정사무의 세부 기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 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.

2024년 3월 25일

담당자
 확 인(부서장)

강 남 희
 이 종 권

이 안내서는 화장품 등 광독성 동물대체시험법(인체피부모델을 이용한 광독성시험법)에 가이드라인에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2024년 3월 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 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서 등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 비임상자원연구과 및 한국동물대체시험법검증센터(KoCVAM)에 문의하시기 바랍니다.
전화번호: 043-719-5502, 5506

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-1222-01	2022. 9.	화장품 등 광독성 동물대체시험법 (인체피부모델을 이용한 광독성시험법) 가이드라인(민원인 안내서) 제정
2	안내서-1222-02	2024. 3.	화장품 등 광독성 동물대체시험법 (인체피부모델을 이용한 광독성시험법) 가이드라인(민원인 안내서) 개정 - 숙련도 물질정보 및 부형제 등 변경

목 차

화장품 등 광독성 동물대체시험법
(인체피부모델을 이용한 광독성시험법)
가이드라인(민원인 안내서)



I. 요약문	1
1. 개요	1
2. 시험원리	2
3. 제한점 및 고려사항	2
4. 시험방법	3
5. 인정요건	10
6. 결과 해석 및 예측 모델	10
7. 시험결과 및 보고	11
II. 번역문	15
III. 원문	49

I

요약문

1 ▶ 개요

본 시험법은 인체피부모델(Reconstructed human Epidermis, RhE) 조직에 시험물질을 국소 적용한 후 인공태양광의 조사 유무에 따른 광독성 유발 가능성을 식별하는 것으로 인공태양광을 조사하지 않은 조건과 비교하여 인공태양광을 조사하였을 때 시험물질에 노출된 세포생존율의 상대적 감소율로 광독성 물질과 비광독성 물질을 평가하는 *in vitro* 인체피부모델을 이용한 광독성시험법(Reconstructed human Epidermis Phototoxicity Test, RhE PT)이다.

본 시험법은 인체피부의 최상층부(outermost layer)인 표피(epidermis)의 생화학적 및 생리학적 특성을 매우 유사하게 모방하여 재구성한 인체피부모델(RhE)의 생체외(*in vitro*) 시험계를 기반으로 하며 MTT 분석법으로 확인된 세포생존율을 흡광도(OD) 또는 HPLC/UPLC-spectrophotometry로 측정한다.

본 시험에서 양성으로 식별되는 시험물질은 피부, 눈 등 기타 상피(epithelia)에 국소적으로 적용한 후 외부 빛에 노출되면 생체내(*in vivo*)에서 광독성을 일으킬 수 있으며 ‘*In vitro* 피부자극시험: 인체피부모델을 이용한 시험법(OECD TG439)’에 기술된 시험물질의 노출 및 세포생존율 측정방법과 ‘*In vitro* 3T3 NRU 광독성시험법(OECD TG432)’에 기술된 표준조사(irradiation) 절차를 조합하여 사용한다.

본 시험법을 사용하는 실험실은 가이드라인에 제시된 숙련도 물질을 사용하여 기술적 숙련도를 입증해야 하고, 가이드라인에서 제시하고 있는 인정요건 모두를 만족시키는 결괏값만 유효한 것으로 인정된다.

2 ▶ 시험원리

광반응성물질(photoreactive chemicals)이 피부에 국소 노출된 후 자연광(environmental light)에 노출되면서 유발하는 급성독성반응을 광독성(광자극: photoirritation)이라고 한다. RhE PT에서 광독성은 RhE 조직에 시험물질을 노출시킨 후 세포독성이 없는 양의 인공태양광을 조사할 때 세포생존율의 상대적 감소를 인공태양광이 없을 때와 비교하여 평가한다.

다층의 고도로 분화·배양된 3차원 인체피부모델(RhE) 조직에 여러 농도의 시험물질을 국소적으로 적용하고 표준배양조건에서 18시간~24시간 동안 배양하여 생체조직에 침투시킨 후 광조사를 하지 않은 그룹과 비교한 광조사 그룹 세포생존율의 상대적 감소를 평가하여 광독성을 결정한다.

3 ▶ 제한점 및 고려사항

광반응성은 충분한 광양자(light quanta) 흡수를 필요로 하므로 시험 전 「UV-VIS Absorption Spectra에 대한 OECD TG101」에 따라 시험물질의 자외(UV)/가시부(vis) 흡수 스펙트럼을 확인하여야 한다. 몰 흡광계수(molar extinction/absorption coefficient, MEC)가 $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 미만인 물질은 광반응을 일으킬 가능성이 낮으므로 광독성시험이 필요하지 않을 수 있다.

또한, 혼합물, 시험하기 어려운 물질(예: 불안정한 물질) 또는 본 시험가이드라인의 적용 가능 범위에 포함되지 명확하지 않은 물질 등은 본 시험법의 적용이 어려울 수 있으며, 화학물질과 빛의 결합 작용(combined action)으로 나타날 수 있는 기타 부작용(예: 광유전독성, 광알레르기, 광발암성 등)을 예측하기 위해 고안된 시험법은 아니다.

4 ▶ 시험방법

4.1. 시험물질 및 대조군 준비

4.1.1. 시험물질

보관 시 안정성을 증명하는 데이터가 있는 경우를 제외하고 시험 당일 조제해야 한다. 시험물질 관리 및 조직의 초기 처리 과정은 광조사 전 시험물질이 광활성화되거나 분해되지 않는 조건에서 수행되어야 한다. 시험물질이 UV를 흡수하여 UV 필터와 같은 역할을 하므로 시험물질의 최대 권장 조제 농도는 10%를 초과해서는 안 된다. 일반적으로 유효한 예측을 하기 위해서는 최소 하나의 시험물질 농도에서 인정 가능한 시험결과를 확보할 수 있도록 3개~5개 농도별 두 개의 반복군(replicate)을 시험하는 것이 적절하다.

- 수용성 시험물질: 초순수(ultra-pure water) 또는 완충용액(예: DPBS 또는 페놀레드가 포함되어 있지 않은 HBSS)으로 조제한다. 사용되는 완충용액에는 광조사 과정에서 간섭이 일어나지 않도록 단백질 성분 및 광흡수 성분(예: 페놀레드 또는 비타민 등의 pH 지시약)이 없어야 한다.
- 지용성 시험물질: 참기름(sesame oil) 또는 기타 적합한 오일(UV 흡수가 낮으면서 RhE 조직에 사용 가능성이 증명된 미네랄 오일 등)에 조제한다. 물과 오일에서 용해도가 낮은 시험물질의 경우 순수 에탄올 또는 아세톤:올리브 오일 혼합액(4:1 v:v)을 사용할 수 있다.

다른 부형제(vehicle)/용매(solvent)를 사용하는 경우 부형제의 안정성과 시험계와의 호환성 확인을 위해 선정된 부형제로 사전시험을 수행할 것을 권장하며, 시험물질의 안정성을 해치지 않는 수준에서 용해를 돕기 위해 볼텍스 혼합, 초음파 및/또는 적절한 온도로 가온하는 등의 방법이 사용될 수 있다.

4.1.2. MTT 간섭

살아있는 인체피부모델에 시험을 수행하기 전 측정되는 평가항목(MTT 분석법)에 대한 시험물질의 간섭을 평가할 것을 권장한다. 시험물질의 MTT 분석법에 대한 간섭 가능성이 확인되는 경우 “MTT 환원물질 및 유색 물질의 보정” 단락에 기술된 것과 같이 변형된 대조군의 적용을 권장한다(59단락~66 단락 참조).

4.1.3. 부형제대조군(부형제가 DPBS일 경우 부형제대조군과 음성대조군 동일함) 및 양성대조군(PC)

각 반복시험(run)에서 동시에 시험하여야 한다.

- 부형제대조군: 초순수(수용성 물질 부형제) 또는 참기름(지용성 물질 부형제) 및/또는 기타 시험물질 용해에 사용되는 부형제가 추천된다.
- 양성대조군: 초순수(또는 DPBS 및 페놀레드가 포함되지 않은 HBSS)에 최종 농도 0.01%~0.02%가 되도록 용해한 염산클로르프로마진(chlorpromazine-HCl)이 추천된다. 숙련도 입증을 위한 시험 확립에 앞서 염산클로르프로마진의 용량반응평가를 위해 추가적인 농도를 시험할 수 있다.

4.2. 조사(Irradiation) 조건

적절한 광원(예: 인공태양광 조사기) 및 필터의 선택은 광독성시험에서 중요한 요소이며 인정 가능한 광원은 전체 태양광 스펙트럼(290 nm~700 nm)을 방출할 수 있어야 한다. 세포독성과 관련있는 UVB를 약화시키면서 *in vivo* 광독성 반응과 관련있는 UVA와 가시광선을 투과시키기 위해 필터를 사용하여 스펙트럼을 조정할 수 있다(부록 2 참조).

인공태양광 조사기로 태양광을 모방하는 것을 바람직한 인공 광원으로 간주한다. 모든 인공태양광 조사기는 상당한 양의 UVB를 방출하며 UVB 파장을 약화시키도록 필터가 장착되어 있어야 한다(부록 2). 필터를 장착한 인공태양광 조사기의 분광 조사강도(spectral irradiance)는 야외 일광과 유사해야 한다. 세포배양용 플라스틱 기구가 UV 안정화제(stabilizer)를 함유하고 있기 때문에 방출되는 스펙트럼은 시험법에서 사용되는 것과 동일한 종류의 플라스틱 덮개를 통해 측정되어야 한다.

4.3. 시험절차

4.3.1. 조직 순화(tissue conditioning)

RhE 조직을 수령하면 모든 키트 구성품의 무결성을 점검한다. 멸균 상태에서 well 당 0.9 mL 배지가 들어 있는 6-well 플레이트로 조직을 옮긴다. 플레이트를 표준배양조건(37 °C ± 1 °C, 5% ± 1% CO₂, 90% ± 10% RH) 배양기에 최소 60분간 둔다. 전배양은 하룻밤 동안 가능하지만 배지는 처음 60분이 지나면 교체해야 한다.

최소 60분의 전배양 후 6-well 플레이트의 조직을 배양기에서 꺼내 조직 아래 배지를 37 °C로 가온한 새 배지로 교체한 후 바로 조직에 시험물질을 적용한다. 시험물질을 바로 적용하지 않은 경우, 시험물질 적용 전까지 배양기에 넣어 놓는다. 각 처리 조건 및 처리 그룹별로 네 개 조직을 처리하는데, 두 개는 조사없이 시험물질만 적용하는 세포독성 평가에 사용하고, 두 개는 시험물질 적용 및 광조사 후 광독성 여부를 평가하기 위해 사용한다.

4.3.2. 시험물질 적용

RhE 조직에 시험물질을 국소 적용한다. 초순수 또는 수용성 완충용액에 용해한 시험물질의 경우 용액 50 μ L를 RhE 조직에 국소 적용하고 가볍게 퍼주는데, 필요한 경우 멸균한 둥근 헤드 파스퇴르 피펫 또는 유사한 장비를 사용한다. 오일에 용해한 시험물질의 경우 용액 25 μ L를 RhE 조직에 국소 적용하고 고르게 퍼주는데, 필요한 경우 멸균한 둥근 헤드 파스퇴르 피펫을 사용한다. 조직 위에 고르게 퍼주는 것이 용이하지 않다면 멸균한 나일론 메쉬(둥근 형태)를 추가적인 분배 도구로 조직에 국소적으로 사용할 수 있다. 피부에 자극이 갈 수 있는 부형제의 경우 처리 용량은 부형제에 의한 세포독성을 피하도록 제한되어야 한다. 예컨대, 에탄올 또는 아세톤 : 올리브 오일 혼합액(4:1)에 용해한 적용 용액은 20 μ L~25 μ L를 넘지 않아야 하는데, 이보다 높은 용량은 세포독성을 일으킬 수 있기 때문이다.

물질을 처리한 후 조직을 배양기에 넣고 표준 배양조건에서 하룻밤(18시간~24시간) 동안 배양한다. 다음 날 완충용액(예: DPBS 또는 페놀레드가 포함되어 있지 않은 HBSS) 0.9 mL를 채운 6-well 플레이트 또는 완충용액 0.3 mL를 채운 24-well 플레이트로 조직을 옮긴다.

4.3.3. 조사(Irradiation) 조건

광조사 그룹(+Irr)에 인공태양광 6 J/cm² 달성을 위해 실온에서 60분간 1.7 mW/cm²(또는 그 상당)로 덮개로 덮은 플레이트에 조사한다. 광원이 과도한 열을 생산하여 플레이트 덮개 아래에 물방울이 생기는 경우 팬을 사용하여 플레이트를 환기시킨다. 광조사를 하지 않은 그룹(-Irr)의 플레이트는 실온에서 빛을 차단한 채 두고(예: 박스 안) 광조사 하는 조직과 동일한 노출 공간에 두는 것이 좋다. 물질 적용에 나일론 메쉬가 사용되었다면 광조사 또는 빛 차단 전에 이를 조심스럽게 제거해야 한다.

광조사가 완료되면 멸균 DPBS without Ca⁺⁺ & Mg⁺⁺(CMF-DPBS)가 든 세척병으로 각 조직을 세척한다. 조직 표면에서 물질을 효과적으로 제거하기 위해 약 20회의 세척이 필요하다. 조직에 적용된 현탁액을 제거하는데 수행된 절차는 문서로 기록하고 최종보고서에 포함시켜야 한다. 세척한

모든 조직을 가온한 0.9 mL의 새 배지가 든 새로운 플레이트로 옮긴다. 각 조직의 표면은 멸균 면봉의 끝부분으로 조심스럽게 물기를 제거한다.

시험물질이 광조사를 방해하거나 막는 경우(예: 짙은 유색이나 불투명한 물질 등) 광조사 또는 빛을 차단하기 전 조직에 적용된 현탁액을 제거해야 한다. 시험 조건하에서 18시간~24시간의 노출 기간 동안 RhE 조직으로 침투하는 시험물질은 광조사 때에 조직 내부에서 생물학적으로 이용 가능(bioavailable)하다. UVA/가시광선에 노출하거나 빛을 차단하기 전 시험물질을 제거하기 위해 세척 배지(예: CMF-DPBS)에 적신 멸균 면봉을 사용할 수 있다. 광조사 전 적용된 시험물질을 세척하는 타당한 이유를 시험보고서에 제시해야 한다.

광조사 전 18시간~24시간 노출은 광조사 동안 활성광독성종(reactive phototoxic species)이 유발되는 조직모델 내부의 가장 가까운 표적세포까지 시험물질을 확산시키기에 충분한 시간을 보장한다. 광조사 후 표준배양조건에서 조직을 하룻밤(18시간~24시간) 배양한다.

4.3.4. MTT 세포생존을 시험

표준배양조건에서 18시간~24시간 배양한 조직 인서트를 6-well 플레이트에서 꺼낸 다음 인서트 바닥을 멸균 거즈 또는 종이 타올로 짚어 물기를 제거하고 라벨을 붙인 24-well MTT 플레이트의 해당 well로 옮긴다. 37 °C로 가온된 1 mg/mL MTT 용액을 라벨이 붙은 24-well 플레이트의 해당 well에 피펫을 이용하여 300 µL씩 넣는다. 24-well 플레이트를 표준 배양조건에서 3시간 동안 배양한다.

MTT 배양이 끝나면 인서트를 24-well 플레이트에서 꺼낸 다음 인서트 바닥을 멸균 거즈 또는 종이 타올로 짚어 물기를 제거하고 라벨을 붙인 새로운 24-well MTT 플레이트의 해당 well로 옮긴다. 이소프로판올(추출 용액) 2 mL로 조직을 추출한다. 24-well 플레이트를 밀봉(파라필름 이용)하고 실온에서 최소 2시간 동안 플레이트 교반기를 이용하여 부드럽게 흔들어 포르마잔을 추출한다. 또 다른 방법으로 하룻밤 동안 추출하는 것도 가능하다. 위에 설명한 대로 플레이트를 밀봉한 후 흔들지 않고 실온에서 빛을 차단한 채 추출한다. 추출 용액을 취하기 전 플레이트 교반기에서 최소 15분간 흔들어 준다.

추출이 끝나면 조직 인서트를 well에서 들어 올리고 추출 용액을 인서트가 있던 well에 따라주거나 조직에 구멍을 뚫어(20 게이지 주사바늘 사용) 추출 용액이 인서트를 꺼낸 well에 흘러내리도록 한다. 추출 용액이 균일해질 때까지 피펫으로 추출 용액을 최소 3회 위아래로 피펫팅하여 혼합해 준다. 각 조직별로 추출 용액을 200 µL씩 분취하고 라벨을 붙인 96-well flat bottom microtiter 플레이트에 피펫으로 옮겨 준다. 끝으로 이소프로판올 200 µL를 blank well에 넣는다.

96-well 플레이트의 흡광도(OD)는 540 nm~595 nm 파장에서 microtiter-plate 분광광도계를 사용하여 측정하는데, 최대 ± 30 nm 필터 밴드 패스에서 570 nm 파장을 사용하는 것이 좋다. 참조 필터(reference filter) 판독은 필요하지 않다. 또 다른 방법으로 포르마잔 추출물 샘플의 흡광도를 HPLC/UPLC-spectrophotometry로 판정할 수도 있다.

4.4. 세포생존율

각 시험물질별로 측정된 OD 값은 부형제대조군(세포생존율 100%로 설정) 대비 세포생존율(%)을 계산하는데 사용된다. HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용한 경우 조직 세포생존율(%)은 동일한 부형제를 사용한 부형제대조군(음성대조군)에서 얻은 MTT 포르마잔 피크 면적 대비 시험물질에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 MTT 포르마잔 피크 면적의 비율(%)로 계산된다.

광조사 그룹에서의 각 시험물질 또는 양성대조군 처리 조직(+Irr)의 상대적 세포생존율(또는 대조군 대비 %)은 해당하는 부형제대조군(음성대조군) 처리 조직(+Irr)의 평균과 비교하여 계산된다. 마찬가지로, 광조사를 하지 않은 그룹에서 각 시험물질 또는 양성대조군 처리 조직(-Irr)의 상대적 세포생존율(또는 대조군의 세포생존율(%))은 해당하는 부형제대조군(음성대조군) 처리 조직(-Irr)의 평균과 비교하여 계산된다. 대조군의 개별 세포생존율(%)을 평균하여 각각의 +Irr과 -Irr 농도 별 평균 대조군 세포생존율(%)을 구한다. 공식은 다음과 같다.

$$\text{대조군 세포생존율(\%)} = \frac{\text{각 시험물질 또는 양성대조군 처리 조직의 보정한 OD}}{\text{음성/용매대조군의 보정한 OD}} \times 100$$

4.5. MTT 환원물질 및 유색 물질 보정

시험물질의 광학적 특성 또는 MTT에 대한 화학적 반응(색 발현을 유발할 뿐만 아니라 이를 막거나 복귀시키기도 함)은 시험을 간섭하여 세포생존율을 잘못 측정하게 한다. 이런 현상은 특정 시험물질이 세척을 통해 조직에서 완전히 제거되지 않거나 시험물질이 표피에 침투하였을 때 발생한다. 시험물질이 MTT에 직접 작용하거나(예: MTT 환원제), 원래 색을 띠거나, 조직 처리과정에서 발색된다면 시험물질의 세포생존율 측정 시의 색간섭을 검출하고 보정하기 위해 추가적인 대조군을 설정하여야 한다(59단락~66단락 참조). 직접적인 MTT 환원 및 유색 시약으로 인한 간섭을 보정하는 방법에 대한 자세한 설명은 피부·안자극 및 부식에 대한 OECD 검증 시험법에 대한 표준작업지침서(SOP)들을 참조한다.

직접적인 MTT 환원제를 식별하기 위해 각 시험물질의 최고 농도를 새로 준비한 MTT 용액에 넣는다. 시험물질을 포함한 MTT 혼합액이 청색 또는 자색으로 변하면 해당 시험물질은 직접적으로 MTT를 환원시키는 것으로 간주하며, 흡광도(OD) 측정 또는 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용하는 것과는 별개로 사멸된 RhE 조직을 이용한 추가적인 기능 점검이 수행되어야 한다. 이러한 추가 기능 점검은 잔여 대사활성만을 가진 사멸된 조직을 이용하는데, 이 조직에서도 살아있는 조직과 유사한 방식으로 시험물질을 흡수하게 된다. 최소 2개의 죽은 조직 반복군(광조사군과 비조사군 각 한 개씩)에 MTT 환원성을 평가할 시험물질을 각각 최고 농도로 적용한 다음, 비특이적 MTT 환원성(NSMTT)을 평가하기 위해 전체 시험절차를 진행한다. MTT 환원제에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 세포생존율(%)에서 동일한 MTT 환원제에 노출된 죽은 조직에서 얻은 비특이적 MTT 환원값을 빼서 실제 조직 세포생존율을 계산하는데, 보정되는 시험과 동시에 수행된 부형제대조군(음성대조군)과 비교하여 계산한다(%NSMTT).

유색 시험물질 또는 초순수·이소프로판올과 만났을 때 발색되는 시험물질로 인한 간접 가능성을 확인하고, 추가적인 대조군의 필요성을 결정하기 위해 물(노출 시 환경) 및/또는 이소프로판올(추출 용액)에 용해된 시험물질을 분석해야 한다. 초순수 및/또는 이소프로판올에 용해된 시험물질이 570 nm \pm 30 nm 범위에서 빛을 흡수하는 경우 추가적인 발색 대조군이 사용되어야 한다.

MTT 시험을 강하게 간접하여 표준 흡광도(OD)를 측정할 수 없는 유색 시험물질의 경우 MTT 포르마잔 측정을 위한 대안으로 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용할 수 있다(65단락~66 단락 참조). HPLC/UPLC-spectrophotometry는 MTT 포르마잔을 정량하기 전에 시험물질로부터 MTT 포르마잔을 분리할 수 있게 해준다. HPLC/UPLC-spectrophotometry는 MTT 포르마잔 측정을 위해 모든 종류의 시험물질(유색, 무색, MTT 환원제, 비환원제)에 사용될 수 있다.

4.6. 숙련도

본 시험법을 본격적으로 사용하기 전 실험실은 표 1에 제시된 6가지 숙련도 물질을 올바르게 분류하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 제시된 물질의 이용이 가능하지 않거나 기타 합당한 사유로 사용할 수 없는 경우 표 1에 기술된 것과 동일한 선정 기준이 적용되었다는 전제하에 충분한 *in vivo* 및 *in vitro* 데이터가 있는 다른 물질(예: 참고물질)을 사용할 수 있다. 제시된 것과 다른 숙련도 물질을 사용하는 경우 타당한 이유가 있어야 한다.

표 1. 숙련도 물질¹

	숙련도 물질	CAS RN	<i>In vivo</i> ²	부형제 ³	일반적인 광독성 범위 [% w/v 또는 % v/v]
광독성 물질					
1	Chlorpromazine-HCl	69-09-0	PT	물	0.003% ~ 0.01%
2	Anthracene	120-12-7	PT	에탄올 ⁴ 또는 아세톤:올리브 오일(4:1)	0.01% ~ 0.03%
3	Bergamot oil ⁶	8007-75-8	PT	오일 ⁵	0.0316% ~ 3.16%
비광독성 물질					
4	Sodium dodecyl sulphate	151-21-3	NPT	물	시험된 최고농도까지 비 광독성(1%)
5	Octyl salicylate	118-60-5	NPT	오일	시험된 최고농도까지 비 광독성(10%)
6	4-Aminobenzoic acid(PABA)	150-13-0	NPT	오일 또는 에탄올	시험된 최고농도까지 비 광독성(10%)

Note: ¹ 숙련도 물질은 사전검증과 후속 연구에 사용된 물질의 일부(subset)이며 다음의 기준에 근거하여 선정되었다. (i) 상업적으로 이용 가능할 것, (ii) 광독성 영향의 전체 범위(비 광독성부터 강한 광독성까지)를 나타낼 것, (iii) 잘 정의된 화학구조를 가질 것, (iv) 검증과정에 사용된 화학적 기능(chemical functionality)을 나타낼 것, (v) 다수의 시험과 실험실에서 재현 가능한 *in vitro* 결과를 제공할 것, (vi) *in vitro*에서 올바르게 예측될 것, (vii) 극심한 독성 프로파일(예: 생식계에 발암성 또는 독성을 가짐)이나 과도한 폐기 비용이 없을 것, (viii) 선정된 물질에 대한 결과 및 프로토콜 세부사항이 문헌에 있을 것.

² PT – Phototoxic, NPT – Non-Phototoxic(note: *in vivo* 분류는 3T3 NRU PT test(OECD TG432)의 검증연구에서 도출되었으며, 해당 평가항목(endpoint)에 대해 검증된 *in vivo* 시험법이 없기 때문에 대부분 임상데이터에 근거한다).

³ 부형제는 사전검증연구와 후속 연구를 기반으로 제안된다.

⁴ 에탄올 – EtOH(Ethanol)

⁵ 오일 – 참기름(sesame oil)

⁶ 광독성 반응의 변동성은 불순물에 영향을 받으므로 특히 이러한 이유 때문에 상업적으로 이용 가능한 비정제 베르가모트 오일(Bergamot oil)을 사용할 것을 권장한다. 정제하지 않은 Bergamot oil은 태양 스펙트럼의 UVA와 UVB 영역에서 상당한 흡광도를 가진다.

5 ▶ 인정요건

인체피부모델을 이용한 광독성시험법은 아래의 인정기준을 충족해야 한다.

- 부형제대조군(음성대조군) 또는 양성대조군으로 처리한 두 개의 반복 조직 간에 상대적 세포생존율 차이는 20%를 초과하지 않아야 한다.
- 광조사를 하지 않고 시험된 부형제대조군(음성대조군)의 세포생존율은 표 2에 제시된 인정 범위 내에 있어야 한다.

표 2. 본 시험가이드라인에 포함된 MTT 시험법의 부형제(즉, 음성) 대조군 OD 값 인정 범위

	인정 하한값	인정 상한값
EpiDerm™(EPI-200)	0.8	2.8

- 광조사 상태에서 시험된 부형제대조군(음성대조군)의 세포생존율은 광조사를 하지 않고 시험된 부형제대조군(음성대조군)과 비교하여 80% 이상(\geq)이어야 한다. 이러한 대조군은 세포에 과도한 방사선민감성(radiation sensitivity)이 없음을 보여준다.
- 양성대조군은 양성예측 결과가 나와야 한다.

광독성 가능성 평가에 사용되는 각 시험물질 처리 그룹은 아래의 기준을 충족해야 한다.

- 광조사를 하지 않은 시험물질 처리 조직의 세포생존율은 최대 권장 농도인 10%[또는 세포독성으로 최대 농도가 제한적인 경우 최대허용용량(maximum tolerated dose)]에서 광독성과 비광독성 예측이 모두 가능할 만큼 충분히 높아야 한다(예: 세포생존율 > 35%).

6 ▶ 결과 해석 및 예측 모델

광조사 상태에서 처리한 하나 이상의 시험농도의 상대적 세포생존율이 광을 조사하지 않고 처리한 동일 농도의 상대적 세포생존율과 비교하여 30% 이상(\geq) 줄어든 물질은 광독성(또는 광독성 가능성)이 있는 것으로 예측된다.

광조사 상태에서 처리한 모든 시험농도의 상대적 세포생존율이 광을 조사하지 않고 처리한 동일 농도의 상대적 세포생존율과 비교하여 30% 이상(\geq) 줄어들지 않은 물질은 광독성(또는 광독성 가능성)이 없는 것으로 예측된다.

모든 농도가 광독성이 없는 것으로 예측되고, 최소 하나의 농도가 절사값(cut-off)인 5% 이하이며(또는 이거나), 반복군(replicate)에서 얻은 결과가 불일치 하는 경우 두 번째 반복시험(run)을 수행해야 한다. 두 번의 반복시험 결과가 불일치하는 경우 세 번째 반복시험을 수행해야 한다. 이러한 경우 광독성 가능성이 있다면 광독성이 나타날 것으로 예상되는 농도 범위로 시험할 것을 권장한다.

7 ▶ 시험결과 및 보고

시험보고서는 다음의 사항을 포함한다.

시험물질 및 대조군(양성대조군 및 부형제대조군)

- 단일성분 물질: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 순도, 불순물의 화학적 정보(가능한 수준까지) 등의 화학물질 식별정보
- 다성분 물질, UVCB 및 혼합물: 가능한 많은 화학적 정보(위의 내용 참조)를 통한 화학물질 특성, 구성성분의 정량적 형태 및 관련 물리화학적 특성
- 물리적 성상, 수용성 및 추가적인 모든 물리화학적 특성
- 공급원, 로트 번호(있는 경우)
- 시험 전 시험물질/대조군 물질의 준비 방법(예: 가온, 분쇄)
- 시험물질의 안정성, 유통기한, 재분석을 위한 데이터(알고있는 경우)
- 부형제(부형제 선정의 타당성, 부형제에서 시험물질의 용해도)

사용된 RhE 모델 및 프로토콜(가능하면 선정의 근거 포함)

- 사용된 RhE 모델(배치 번호 포함)
- 수행능력을 포함한 사용된 특정 RhE 모델에 대한 모든 근거 자료. 이 자료는 조직 개발사/공급사가 『분석증명서』 또는 『QC 출하 보고서』의 형태로 제공해야 하며 다음의 정보를 포함해야 한다(단, 이에 국한되지는 않음).

- i) 세포생존율
- ii) 장벽기능
- iii) 형태학적 특징
- iv) 해당 모델의 품질관리(QC)
- 사용되는 모델의 과거 데이터에 대한 참고자료. 이 자료는 과거 배치 데이터에 대한 참고자료와 함께 QC 데이터의 인정가능성을 포함해야 한다(단, 이에 국한되지 않음).
- 숙련도 물질의 시험을 통한 시험법 수행의 숙련도에 대한 기술

시험 조건

- 측정장비(예: 분광광도계)의 보정 정보, MTT 포르마잔 정량화에 사용된 파장 및 밴드 패스(있는 경우), 측정장비의 직선성의 범위, MTT 포르마잔 정량화에 사용된 방법의 설명
- HPLC/UPLC-spectrophotometry의 적격성에 대한 설명(가능한 경우)
- 광원-조사 조건
- 사용된 광원의 선정 근거
- 광원 및 복사계(radiometer)의 제조사와 종류
- 광원의 모든 분광복사조도(spectral irradiance) 관련 특성
- 사용된 필터의 방출 및 흡수 특성
- 복사계(radiometer)의 특성 및 보정에 대한 설명
- 시험계와 광원 간의 거리
- 위의 거리에서 mW/cm^2 로 표기한 UVA 조도
- 조사 노출의 기간
- J/cm^2 로 표기한 UVA 광량(조도×시간)
- 광조사 동안의 세포 배양물 및 이와 동시에 수행되는 빛을 차단한 세포 배양물의 온도

시험절차

- 사용된 시험절차의 세부사항(노출 기간 후 사용된 세척절차 포함)
- 사용된 시험물질 및 대조군 물질의 용량
- 광조사가 있을 때와 없을 때 사용된 시험물질의 농도 선정에 대한 근거
- 부형제의 종류 및 구성

- 노출 및 사후 노출 배양의 기간 및 온도
- 직접적인 MTT 환원제 및/또는 발색 시험물질에 사용된 대조군 표시(해당하는 경우)
- 시험물질 및 대조군(해당하는 경우 양성, 부형제(음성)대조군)NSMTT, NSCliving)별로 사용된 조직 반복군(replicate)의 개수
- 사용된 RhE 모델을 기반으로 적용된 결정기준/예측모델에 대한 설명
- 시험절차의 모든 변경사항에 대한 설명(세척 절차 포함)

반복시험(run) 및 시험 인정기준

- 양성대조군과 부형제(음성)대조군의 조직 반복군 간 변동성의 인정기준
- 부형제(음성)대조군 OD 값의 인정기준
- 광을 조사하지 않은 조건과 비교하여 광을 조사하였을 때 부형제(음성)대조군의 세포생존율 인정기준
- 양성대조군의 인정기준

결과

- OD 또는 MTT 포르마잔 피크 면적, 세포생존율(%), 평균 조직 세포생존율(%), 조직 간 차이 등 각 시험물질별 반복시험(run)과 반복군(replicate)의 측정값 데이터의 도표
- 해당하는 경우, MTT 환원제 및/또는 발색 물질에 사용된 대조군의 결과(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 면적, %NSMTT, %NSCliving, 보정된 최종 상대적 세포생존율)
- 정해진 반복시험(run) 및 시험 인정기준과 관련하여 시험물질 및 대조군 물질로 얻은 결과
- 관찰된 기타 영향에 대한 설명
- 사용된 예측모델 또는 결정기준을 참고하여 산출한 화학물질 등급

II

번역문(OECD TG498)

생체의 광독성: 인체피부모델을 이용한 광독성시험법**In vitro Phototoxicity: Reconstructed Human Epidermis**
Phototoxicity test method**서론**

1. 광독성(광자극: photoirritation)은 인체의 국소 또는 전신에 적용된 광반응성물질(photoreactive chemicals)이 자연광(environmental light)에 노출되면서 유발되는 급성독성반응이다. 피부가 광독성 물질(phototoxic chemicals)에 노출될 경우, 광독성 반응은 광반응성물질에 의한 급성피부노출 이후 추가적인 빛 노출에 의해 유발된다. 본 시험법에서는 피부에 면역 매개 반응을 유발할 수 있는 광반응성물질, 즉 광감작성물질은 다루지 않는다.
2. 본 시험가이드라인(test guideline, TG)은 광독성의 인체 건강 평가항목, 특히 광독성 물질에 대한 피부의 국소 노출에 대해 다룬다. *In vitro* 인체피부모델을 이용한 광독성시험법(reconstructed human epidermis phototoxicity test, RhE PT)은 인체피부모델에 시험물질을 국소 적용한 후 인공태양광의 유무에 따른 해당 시험물질의 광독성 유발 가능성을 식별하기 위해 사용된다(인공태양광의 정의는 37단락~38단락 참조). 광독성 유발 가능성은 인공태양광이 없을 때와 비교하여 인공태양광이 있을 때 시험물질에 노출된 세포생존율의 상대적 감소율로 평가한다. 본 시험에서 양성으로 판정되는 시험물질은 피부, 눈 등 기타 상피(epithelia)에 국소적으로 적용한 후 외부 빛에 노출되면 생체내(*in vivo*)에서 광독성을 일으킬 수 있다.
3. 본 시험가이드라인은 인체피부의 최상층부(outermost layer)인 표피(epidermis)의 생화학적 및 생리학적 특성을 매우 유사하게 모방하여 재구성한 인체피부모델(RhE)의 생체외(*in vitro*) 시험계를 기반으로 한다. RhE 시험계는 전형적인 조직구조(histology) 및 세포구성(cytoarchitecture)을 가진 표피 모델을 재현하기 위해 인체유래의 각질세포(keratinocyte)를

세포원으로 사용한다. 본 시험법은 ‘*In vitro* 피부자극시험: 인체피부모델을 이용한 시험법 (OECD TG439)(1)’에 기술된 시험물질의 노출 및 세포생존을 측정방법과 ‘*In vitro* 3T3 NRU 광독성시험법(OECD TG432)(2)’에 기술된 표준조사(irradiation) 방법을 조합하여 사용한다. 본 시험가이드라인에서는 광조사 시간 동안 활성광독성종(reactive phototoxic species)의 생성을 유발할 수 있는 조직모델 내부의 가장 가까운 표적세포까지 시험물질을 확산시키기에 충분한 시간을 확보하기 위해 TG439에 기술된 노출시간보다 훨씬 더 긴 시간을 이용한다.

4. 전반적인 수행능력은 민감도 86.7% 및 특이도 93.3%(Phase III, 3개 실험실에서 총 10종의 시험물질을 두 번 시험)로 평가되는데, 이는 1999년에 보고된 초기 시험법을 이용한 사전검증보고서(4)를 포함한 개별 인용문헌들(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)에 대한 사후평가(*ad hoc* evaluation)를 근거로 한다. 이러한 데이터는 1999년 COLIPA 광독성 전담그룹 (task-force)에게 공개되었다. COLIPA 광독성 전담그룹은 3차원 RhE 피부모델이 시험물질의 생체이용률 (bioavailability)을 다루는 유용한 도구가 될 수 있다고 결론 내렸다. 급성 광독성의 예측값이 경계값을 나타내는 경우, 본 시험법을 3T3 NRU PT의 보충 시험으로 조합하여 사용한다면 분명한 판정 결과를 도출할 수 있다. 또한, 3차원 RhE 피부 모델 시험은 광독성 유발능 (phototoxic potency)에 대한 평가를 도울 수 있는 것으로 평가되었다. 2003년부터 2006년까지 수행된 광독성 유발능에 대한 후속연구는 ECVAM의 지원을 받았다(12).
5. 신규 OECD 광독성 가이드라인의 개발을 지원하기 위해 OECD 광독성 전문가그룹은 3차원 인체피부모델(RhE)을 이용하는 *in vitro* 급성 광독성 평가 방법의 예측력에 대한 사전검증연구 결과와 기타 문헌의 사후평가를 실시하였다. 문헌 검토에서 EpiDerm™ 피부모델로 평가된 60개 이상의 시험물질 데이터베이스를 확보하였다. 총 데이터세트는 사전검증연구에서 산출된 값보다 높은 특이도와 민감도를 보였는데(4), 이는 이전 민감도 값이 부형제 사용에 대한 잘못된 지시사항의 영향을 받았기 때문이다(10). 초기 사전검증연구 이후에 수행된 다른 연구는 동일한 SOP를 사용하였지만 공식적인 검증연구로써 수행된 것은 아니다.
6. 본 시험가이드라인에 사용된 용어에 대한 정의는 부록 1에서 제공한다.

초기 고려사항 및 제한점

7. 다양한 종류의 화학물질이 광독성을 유발하는 것으로 보고되었다(13)(14)(15)(16). 이들 물질의 공통적인 특징은 태양빛 방출 스펙트럼 내에서 빛 에너지를 흡수할 수 있다는 것이다. 광반응성은 충분한 광양자(light quanta) 흡수를 필요로 한다. 그러므로 시험 전에 「UV-VIS Absorption Spectra에 대한 OECD TG101」에 따라 시험물질의 UV/가시광선 흡수 스펙트럼을 결정하여야 한다(17). 몰 흡광계수(molar extinction/absorption coefficient, MEC)가 $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 미만인 물질은 광반응을 일으킬 가능성이 낮다(18)(19). 이러한 물질은 광독성 반응을 확인하기 위해 *in vitro* RhE PT 또는 기타 생물학적 시험을 통한 추가시험이 필요하지 않을 수 있다(3)(20). 일반적으로 이러한 원칙은 모든 시험물질에 적용되지만 화학물질의 사용용도 또는 잠재적인 노출 조건에 따라 더 구체적인 가이드라인이 적용될 수 있다. RhE PT 시험은 단독 시험법으로 사용될 수 있으며, 구체적 가이드라인(예: ICH S10 for pharmaceuticals)에 따른 국소 적용 물질의 경우 단계적 시험전략으로도 사용될 수 있다. 본 시험가이드라인에서 ‘시험물질(test chemical)’이라는 용어는 시험에 사용되는 물질을 지칭하기 위해 사용되며 물질 및/또는 혼합물의 시험에 대한 RhE PT의 적용 가능성과는 관련이 없다. 현재 조성이 알려진 혼합물에 대한 RhE PT의 적용 가능성 및 수행능력 관련 정보는 제한적이다. 혼합물, 시험하기 어려운 물질(예: 불안정한 물질) 또는 본 시험가이드라인에 기술된 적용 가능 범위에 포함되는지 명확하지 않은 물질 등을 시험하려 한다면 이러한 시험의 결과가 과학적으로 유의미할지를 먼저 고려해보아야 한다.
8. *In vitro* RhE PT의 신뢰성(reliability) 및 적합성(relevance)은 다수의 연구에서 평가되었다(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10). 본 시험가이드라인에 제시된 절차 및 예측모델은 광독성 물질과 비광독성 물질을 구별하기 위해 설계되었다. 그러나 국소적으로 적용되는 물질 및 혼합물의 광독성 유발능을 다루기 위한 구체적인 절차와 예측모델이 문헌에 존재한다. 본 시험가이드라인은 화학물질과 빛의 복합작용으로 일어날 수 있는 기타 부작용을 예측하기 위해 설계되지는 않았다(예: 광유전독성, 광알레르기 또는 광발암성 등을 다루지 않음). 나아가 본 시험가이드라인은 광독성을 유발하는 간접적 메커니즘, 시험물질의 대사산물 영향, 또는 혼합물 내 개별 화학물질의 광독성 가능성을 평가하기 위해 설계되지는 않았다.

9. 비록 RhE 조직의 대사활성이 제한적이기는 하지만 *in vitro* RhE PT는 대사활성계와 함께 수행될 필요는 없다(21). 현시점에서 대사활성계가 없다고 하여 광독성 화합물을 검출하지 못한다는 증거는 없다(22).
10. MTT 포르마잔과 동일한 파장에서 빛을 흡수하는 시험물질(유색물질) 또는 생체염료 MTT를 MTT 포르마잔으로 직접 환원할 수 있는 시험물질의 경우 세포생존을 평가 시 시험계에 잔존해 있다면 세포생존을 측정을 간접할 수 있기 때문에 'MTT 환원물질 및 색간섭의 보정' 섹션에서와 같이 이러한 간섭을 보정하기 위해 변형된 대조군을 사용해야 할 수 있다(59단락~66단락 참조). 또 다른 대안으로 MTT 포르마잔을 측정하기 위해 HPLC/UPLC-spectrophotometry가 사용될 수 있다(65단락~66단락 참조).
11. RhE PT로 수행된 연구의 대부분이 태양 스펙트럼의 UVA/가시광선 영역을 활용하였지만 일부 연구는 RhE 조직이 통제된 조건하에서 UVB 노출도 견딜 수 있다는 것을 확인하였다(5)(23)(24). 이는 태양 스펙트럼의 UVB 영역을 견디지 못하는 대부분의 세포주 기반 시험법(2)과 비교하여 장점으로 작용한다(25).
12. 분류가 명백한 경우 하나의 시험물질에 한 번의 시험(run)만으로 충분하다. 그러나 반복군(replicate) 조직으로부터 얻어진 결과가 불일치 하는 등 경계선 결과를 나타낼 경우 두 번째 반복시험이 고려되어야 하며 처음 두 번의 반복시험 결과가 서로 불일치 하는 경우 세 번째 반복시험이 수행되어야 한다. 두 번째 및 세 번째 반복시험을 수행할 때 시험물질의 농도는 경계선 또는 모호한 농도에서의 반응 범위를 더 잘 확인하기 위해 수정될 수 있다('결과 및 예측모델 해석의 세부사항' 참조).
13. 시험물질의 광독성 유발 가능성은 인공태양광을 조사할 때와 조사하지 않을 때 RhE 조직에 다양한 농도를 시험하여 결정된다. 일반적으로 유효한 예측을 하기 위해서는 최소 하나의 시험물질 농도에서 인정 가능한 시험결과를 확보할 수 있도록 3개~5개 농도별 두 개의 반복군(replicate)을 시험하는 것이 적절하다. 구체적인 시험결과에 대한 인정기준은 예측모델에서 제시된다.

시험법의 원칙

14. RhE PT에서 광독성 유발 가능성은 세포독성이 없는 양의 인공태양광을 조사할 때 시험물질에 노출된 RhE 조직의 세포생존율의 상대적 감소를 인공태양광이 없을 때와 비교하여 평가한다.
15. 시험물질은 다층의 고도로 분화된 인체표피모형을 형성하도록 배양된 인체유래 표피 각질세포로 이루어진 3차원 RhE 조직에 국소 적용한다. 3차원 RhE 조직은 체계적인 기저층(basal layer), 유극층(spinous layer), 과립층(granular layer)과 체내에 존재하는 주요 지질류와 유사한 세포간 판상형 지방층(intercellular lamellar lipid layer)을 포함하는 다층의 각질층(*stratum corneum*)으로 이루어져 있다. 따라서 RhE 조직은 실제 피부에서의 화학물질의 노출을 직접적으로 모방하기에 적합하며 시험물질을 희석하지 않고 화학물질 및 혼합물의 피부자극 및 피부부식 유해성을 예측하기 위해 검증되어 왔다(1)(26).
16. 요약하면, 부형제에 조제된 여러 농도의 시험물질을 RhE 조직에 국소적으로 적용하고 표준 배양조건($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{ CO}_2$, $90\% \pm 10\% \text{ RH}$)에서 18시간~24시간 동안 배양하여 생체조직에 침투시킨다. 일반적으로 3개~5개 농도의 시험물질군과 양성대조군 및 적합한 부형제대조군 또한 RhE 조직에 국소 적용하고 병행하여 시험한다. 각 물질처리 그룹 내 조직의 절반은 6 J/cm^2 의 인공태양광으로 조사하고(+Irr), 나머지 절반은 빛을 차단하여 실온에 둔다(-Irr)(세부사항은 37단락~38단락 참조). 18시간~24시간 동안의 사후 노출 배양 후 효소에 의해 청색 포르마잔염으로 전환된 생체염료 MTT(3-[4,5 dimethylthiazol 2 yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue(CAS 번호 298-93-1))를 조직에서 추출한 뒤 흡광도를 측정하여 광조사 그룹(+Irr)과 광조사를 하지 않은 그룹(-Irr)에서 상대적 세포생존율을 판정한다.
17. 광독성 유발 가능성은 물질처리 후 광조사를 하지 않은 그룹에 대한 광조사 그룹 세포생존율의 상대적 감소를 비교하여 결정한다.
18. 시험 설계는 ZEBET에서 수행한 사전검증연구(4)(27) 및 본 프로토콜로 수행된 후속연구에 기반한다. 후속연구에서 시험의 재현성과 민감도를 향상시키는 약간의 수정사항이 제안되었으며 개정된 프로토콜은 2017년 발간되었다(10). 본 시험가이드라인에 기술된 절차는 개정된 프로토콜을 기반으로 한다.

19. 본 시험법은 광독성을 다루는 단독 시험법으로 사용될 수 있는데, 특히 시험물질의 용해도가 제한적이거나 광독성을 위한 OECD TG432(2)와 OECD TG495 ROS Assay의 평가항목(종말점, endpoint)으로 광독성을 판정할 수 없을 때 사용할 수 있다. 또한 본 시험법은 OECD TG432 및/또는 OECD TG495와 조합하여 단계적 시험전략에서 사용될 수 있다(8)(11)(22)(29).

숙련도 시험

20. 본 시험법을 본격적으로 사용하기 전 실험실은 표 1에 제시된 6가지 숙련도 물질을 올바르게 분류하여 기술적 숙련도를 입증해야 한다. 제시된 물질이 이용 가능하지 않거나 기타 합당한 사유로 사용할 수 없는 경우 표 1에 기술된 것과 동일한 선정 기준이 적용되었다는 전제하에 충분한 *in vivo* 및 *in vitro* 데이터가 있는 다른 물질을 사용할 수 있다. 제시된 것과 다른 숙련도 물질을 사용하는 경우 타당한 이유가 있어야 한다.
21. 시험시설 내 실험자들이 RhE 모델을 처음 사용하는 경우 실험자는 생산자가 명시한 방법에 따라 RhE 모델의 장벽기능을 확인할 필요가 있다. 이는 조직이 장거리 또는 장시간에 걸쳐 배송되는 경우 특히 중요하다. 그러나, 시험법을 성공적으로 확립하고 시험법 사용에 대한 숙련도를 입증한 경우 이러한 확인절차를 정기적으로 할 필요는 없다.

표 1. 숙련도 물질¹

	숙련도 물질	CAS RN	<i>In vivo</i> ²	부형제 ³	일반적인 광독성 범위 [% w/v 또는 % v/v] (참고문헌)
광독성 물질					
1	Chlorpromazine-HCl	69-09-0	PT	물	0.003%~0.01% (4)
2	Anthracene	120-12-7	PT	에탄올 ⁴ 또는 아세톤:올리브 오일(4:1)	0.01%~0.03% (5)(30)
3	Bergamot oil ⁶	8007-75-8	PT	오일 ⁵	0.0316%~3.16% (4)(8)
비 광독성 물질					
4	Sodium Dodecyl Sulphate	151-21-3	NPT	물	시험된 최고농도까지 비 광독성(1%)(4)
5	Octyl salicylate	118-60-5	NPT	오일 ⁵	시험된 최고농도까지 비 광독성(10%)(4)
6	4-Aminobenzoic acid(PABA)	150-13-0	NPT	오일 또는 에탄올	시험된 최고농도까지 비 광독성(10%)(27)(30)

Note: ¹ 숙련도 물질은 사전검증과 후속 연구에 사용된 물질의 일부(subset)이며 다음의 기준에 근거하여 선정되었다. (i) 상업적으로 이용 가능할 것, (ii) 광독성 영향의 전체 범위(비 광독성부터 강한 광독성까지)를 나타낼 것, (iii) 잘 정의된 화학구조를 가질 것, (iv) 검증과정에 사용된 화학적 기능(chemical functionality)을 나타낼 것, (v) 다수의 시험과 실험실에서 재현 가능한 *in vitro* 결과를 제공할 것, (vi) *in vitro*에서 올바르게 예측될 것, (vii) 극심한 독성 프로파일(예: 생식계에 발암성 또는 독성을 가짐)이나 과도한 폐기 비용이 없을 것, (viii) 선정된 물질에 대한 결과 및 프로토콜 세부사항이 문헌에 있을 것.

² PT-Phototoxic, NPT-Non-Phototoxic(note: *in vivo* 분류는 3T3 NRU PT test(OECD TG432)의 검증연구에서 도출되었으며, 해당 평가항목(endpoint)에 대해 검증된 *in vivo* 시험법이 없기 때문에 대부분 임상데이터에 근거한다).

³ 부형제는 사전검증연구와 후속 연구를 기반으로 제안된다.

⁴ 에탄올-EtOH(Ethanol)

⁵ 오일-참기름(sesame oil)

⁶ 광독성 반응의 변동성은 불순물에 영향을 받으므로 특히 이러한 이유 때문에 상업적으로 이용 가능한 비정제한 베르가모트 오일(Bergamot oil)을 사용할 것을 권장한다. 정제하지 않은 Bergamot oil은 태양 스펙트럼의 UVA와 UVB 영역에서 상당한 흡광도를 가진다(8).

절차

22. 다음은 광독성시험을 위한 RhE 시험법의 구성요소 및 절차에 대한 기술이다. 본 시험가이드라인을 준수하는 RhE 기반 시험법의 표준작업지침서(SOP)가 이용 가능하다(27). 약간의 기술적 향상, 용해도에 대한 지침, 부형제 권장사항 및 EpiDerm™ 프로토콜로 시험한 물질에 대한 자세한 정보를 담은 표준작업지침서(SOP)는 2017년 발간되었다(10). 본 시험가이드라인을 준수하는 RhE 기반 시험의 SOP는 실험실에서 본 시험법을 적용 및 활용할 때 사용되어야 한다.

일반적인 시험계 특성 규명(General Test System Characterisation)

23. 상피조직(epithelium)을 재구성(reconstruct)하기 위해서는 인체 각질세포가 사용되어야 한다. 다층의 살아있는 상피세포(기저층, 유극층, 과립층)가 제 기능을 하는(functional) 각질층 아래에 존재해야 한다. 각질층은 세포독성을 가진 기준물질(benchmark chemicals) (계면활성제인 sodium dodecyl sulphate(SDS)와 Triton®-X-100이 장벽기능을 시험하는데 주로 사용됨)의 빠른 침투를 견딜 수 있는 견고한(robustness) 기능적 장벽을 생산하기 위한 필수 지질성분이 포함된 다층의 구조여야 한다. RhE 조직은 박테리아, 바이러스, 세균 및 곰팡이에 오염되지 않아야 한다.

기능적인 조건(Functional conditions)

생존율(Viability)

24. 세포생존율 정량화에는 MTT 시험법이 사용된다(31). RhE 조직의 살아있는 세포들은 생체염료 MTT를 청색 MTT 포르마잔 침전물로 환원할 수 있고, 이 침전물을 이소프로판올 (또는 이와 유사한 부형제)을 사용하여 조직으로부터 추출한다. 추출 부형제 자체의 흡광도(OD)는 충분히 낮아야 한다($OD < 0.1$). 추출된 MTT 포르마잔은 흡광도(OD) 측정 또는 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 이용하여 정량화할 수 있다(32). RhE 모델 개발자 또는 공급업자는 각각의 RhE 모델 배치(batch)가 음성대조군에 대한 정해진 품질관리기준을 충족하는지 확인해야 한다. 음성대조군 OD값(56 단락에 제시되어 있는 조건 참조)의 인정기준(상한 및 하한 값)은 RhE 모델 개발자 및 공급업자에 의해 확립되었으며 표 2에 제시되어 있다. RhE 모델 사용자는 부형제대조군(음성대조군)의 결과가 시험법 인정기준을 충족하는지 확인해야 한다. HPLC/UPLC-spectrophotometry 사용자는 표 2에 제시된 음성대조군 OD 범위를 부형제대조군(음성대조군)의 인정기준으로 사용해야 한다.

표 2. 본 시험가이드라인에 포함된 MTT 시험법의 부형제(즉, 음성) 대조군 OD 값 인정 범위

	인정 하한값	인정 상한값
EpiDerm™(EPI-200)	0.8	2.8

장벽기능(Barrier function)

25. RhE 모델 개발자 또는 공급업자는 각 RhE 모델 배치가 장벽기능에 대한 정해진 품질관리기준을 충족하는지 확인해야 한다. 장벽기능은 정해진 노출시간을 적용한 후, 기준물질[예: sodium dodecyl sulphate(SDS) 또는 Triton®-X-100]이 조직의 세포생존율을 50% 감소시키는 농도(IC₅₀)를 측정하거나, 구체적으로 정해진 농도의 기준물질을 적용한 후 세포생존율이 50% 감소하는데 필요한 노출시간(ET₅₀)을 측정하여 평가할 수 있다. 본 시험가이드라인에 포함된 시험법의 인정범위는 표 3에 제시되어 있다.

표 3. 본 시험가이드라인에 포함된 RhE 모델의 장벽기능에 대한 QC 배치 출하 기준

	인정 하한값	인정 상한값
EpiDerm™(EPI-200)	ET ₅₀ = 4.00 h	ET ₅₀ = 8.72 h

형태학적 특성(Morphology)

26. 형태학적 특성이 RhE 모델 개발자 또는 공급업자의 QC 출하 프로그램에 사용되는 경우 인체 표피와 유사한 구조(다층의 각질층 포함)임을 입증하기 위해 RhE 모델의 조직학적 검사가 제공될 수 있다.

재현성(Reproducibility)

27. RhE 모델 개발자 또는 공급업자는 시간 경과에 따른 재현성을 점검하기 위해 세포생존율 및 장벽기능 시험 등 QC 출하 시험 결과의 데이터베이스를 보유해야 한다. RhE 모델 사용자는 시험법 실행 후부터의 재현성을 점검하기 위해 광독성시험법 양성 및 부형제(음성)대조군 결과의 데이터베이스를 보유할 것을 권장한다.

품질관리(Quality control)

28. RhE 모델 개발자 또는 공급업자에서 RhE 모델의 각 배치가 정해진 생산품 출하 기준을 충족한다는 것을 증명한 경우에만 사용되어야 한다. 세포생존율(24단락), 장벽기능(25단락), 형태학적 특성(26단락) 등이 가장 대표적인 출하 기준이다. 시험법 사용자에게 해당 QC 데이터를 제공하여 시험보고서에 이와 같은 내용을 포함시킬 수 있도록 해야 한다. 품질관리 기준을 충족하는 조직을 이용하여 생산된 광독성시험결과만 신뢰할 수 있는 광독성 예측 결과로 인정될 수 있다.

시험물질 및 대조군 준비

29. 시험물질은 보관 시 안정성을 증명하는 데이터가 있는 경우를 제외하고 시험 당일 조제해야 한다. 시험물질 관리 및 조직의 초기 처리 과정은 광조사 전 시험물질이 광활성화되거나 분해되지 않는 조건에서 수행되어야 한다. 시험물질이 UV를 흡수하여 UV 필터와 같은 역할을 할 수 있으므로 시험물질의 최대 권장 농도는 10%를 초과해서는 안 된다(10)(27).

30. 시험결과의 광독성 유발 가능성 평가 요건을 충족하기 위해 최소 한 개의 시험물질 농도에서 인정 가능한 시험 결과를 얻을 수 있도록 부형제에 용해한 시험물질 3개~5개 농도를 시험하는 것이 적절하다(69단락~71단락 참조). 원칙적으로 시험물질 농도는 광조사가 없는 조건에서 세포독성에 대한 용량 반응을 일으키도록 선정되어야 한다. 적절한 농도 범위 선정을 위한 지침은 표준작업지침서(SOPs)에 제공된다(10)(27).

31. 수용성 시험물질은 초순수(ultra-pure water) 또는 완충용액(예: DPBS 또는 페놀레드가 포함되어 있지 않은 HBSS)으로 조제한다. 사용되는 완충용액은 광조사 과정에서 간섭이 일어나지 않도록 단백질 성분 및 광흡수 성분(예: 페놀레드 등의 pH 지시약 또는 비타민)이 없어야 한다.

32. 지용성 시험물질은 참기름(sesame oil) 또는 기타 적합한 오일(UV 흡수가 낮으면서 RhE 조직에 사용 가능성이 입증된 미네랄 오일 등)에 조제한다. 물과 오일에서 용해도가 낮은 시험물질의 경우 순수 에탄올 또는 아세톤:올리브 오일 혼합액(4:1 v:v)을 사용할 수 있다.

33. 다른 부형제의 사용을 고려할 수 있지만, RhE 조직과의 호환성, 시험물질과의 반응성, 광독성 유발가능성, 광독성 영향의 차단 가능성(potential for quenching of the phototoxic effect), 라디칼 소거 특성(radical scavenging properties), 및/또는 부형제 내 화학물질의 안정성 등을 포함한 구체적 특성이 사용 전에 평가되어야 한다(33). 다른 부형제를 사용하는 경우 부형제의 안정성과 시험제와의 호환성 확인을 위해 선정된 부형제로 사전시험을 수행할 것을 권장한다(부록 3 참조).
34. 시험물질의 안정성을 해치지 않는 수준에서 용해를 돕기 위해 볼텍스 혼합, 초음파 및/또는 적절한 온도로 가온하는 등의 방법이 사용될 수 있다. 시험물질 처리 용액의 조제에 사용된 절차는 문서로 기록하여야 한다.
35. 살아있는 인체피부모델에 시험을 수행하기 전 측정되는 평가항목(MTT 분석법)을 사용하여 시험물질의 간섭을 평가할 것을 권장한다. 이러한 절차는 표준작업지침서(SOPs)에 자세히 기술되어 있다. 시험물질의 MTT 분석법에 대한 간섭 가능성이 확인되는 경우 “MTT 환원물질 및 유색 물질의 보정” 섹션에 기술된 것과 같이 변형된 대조군의 적용을 권장한다.
36. 부형제대조군(음성대조군) 및 양성대조군(PC)은 각 반복시험(run)에서 동시에 시험되어야 한다. 추천되는 부형제대조군은 초순수(수용성 물질 부형제) 또는 참기름(지용성 물질 부형제) 및/또는 기타 시험물질 용해에 사용되는 부형제이다. 추천되는 양성대조군은 초순수(또는 DPBS 및 페놀레드가 포함되어 있지 않은 HBSS)에 최종 농도 0.01%~0.02%가 되도록 용해한 염산클로르프로마진(Chlorpromazine-HCl)이다. 숙련도 입증을 위한 시험 확립에 앞서 염산클로르프로마진의 용량반응평가를 위해 추가적인 농도를 시험할 수 있다.

광조사 조건

37. 광원: 적절한 광원(예: 인공태양광 조사기) 및 필터의 선택은 광독성시험에서 중요한 요소이다. UVA 및 가시광선 영역의 빛은 보통 *in vivo* 광독성 반응과 관련있는 반면 UVB는 일반적으로 광독성 반응과 관련이 없지만 세포독성이 높다. 파장이 313 nm에서 280 nm로 바뀌면 세포독성은 1,000배 증가한다(28). 인정 가능한 광원은 전체 태양 스펙트럼을 방출해야 한다(290 nm~700 nm). UVB를 약화시키면서 UVA와 가시광선을 투과시키기 위해 필터를 사용하여 스펙트럼을 조정할 수 있다(부록 2 참조). 나아가 파장, 사용되는 광 조사량, 광원

장비(예: 개방형 또는 폐쇄형 시스템)가 시험계에 부적절한 해로운 영향을 주어서는 안 된다(예: 적외선 영역에서 열/파장 방출로 인한 영향).

38. 인공태양광 조사기로 태양광을 모방하는 것을 바람직한 인공 광원으로 간주한다. 필터를 장착한 인공태양광 조사기의 분광 조사강도(spectral irradiance)는 야외 일광과 유사해야 한다. 제논 아크(xenon arc)와 수은 메탈 할라이드 아크[(doped) mercury metal halide arc] 두 가지 모두가 인공태양광 조사기로 사용된다. 수은 메탈 할라이드 아크는 열을 덜 방출하면서 가격이 저렴하다는 장점이 있지만 태양광과의 유사성은 제논 아크보다 낮다. 모든 인공태양광 조사기는 상당한 양의 UVB를 방출하며 UVB 파장을 약화시키도록 필터가 장착되어 있어야 한다(부록 2). 세포 배양용 플라스틱 기구는 UV 안정화제(stabilizer)를 함유하고 있기 때문에 방출되는 스펙트럼은 시험법에서 사용되는 것과 동일한 종류의 플라스틱 덮개를 통해 측정되어야 한다. 필터를 장착하거나 기기 자체의 필터 효과로 스펙트럼의 일부 영역을 약화시키는 방법과는 별개로 이러한 필터를 통과한 뒤에 측정되는 스펙트럼은 표준 야외 일광에서 벗어나지 않아야 한다(34). 야외 일광 방출량에 대한 국제 표준인 D65는 ISO DIS 18909:2006에서 제공된다. EpiDerm™모델을 이용한 사전검증과 후속 연구에서 사용된 필터 장착 인공태양광 조사기의 분광 조사 분포의 예시는 (10)(30)(23)에서 제공된다. 또한, 부록 2의 그림 1을 참조한다.
39. 선량측정(dosimetry): 광도(조도)는 각 광독성시험을 수행하기 전 보정된 적절한 광대역 UVA미터를 사용하여 정기적으로 점검해야 한다. 조도는 시험법에 사용되는 것과 동일한 종류의 플라스틱 덮개를 통해 측정되어야 한다.
40. 대략 6 J/cm^2 의 광량(UVA 영역에서 측정)이 RhE 조직에 세포독성이 없으면서 광독성 반응을 일으키도록 화학물질을 들뜬상태(excite)로 전환시키기에 충분한 양으로 판정되었다(4)(10)(30). 60분 내에 6 J/cm^2 를 달성하기 위해 광세기는 1.7 mW/cm^2 의 UVA/가시광선으로 조정되었다(부록 2 그림 2 참조). 또 다른 대안으로, 아래의 공식을 활용하여 6 J/cm^2 달성을 위한 다른 노출시간 및/또는 광 세기 값이 사용될 수 있다.

$$t(\text{min}) = \frac{\text{광량}(\text{J/cm}^2) \times 1000}{\text{광세기}(\text{mW/cm}^2) \times 60} \quad (1\text{J} = 1\text{Wsec})$$

41. RhE 모델은 UVB 조사를 견딜 수 있으며(5)(23)(24), 어떤 경우(시험물질의 흡광도가 UVB 파장 영역에서 높은 경우 등)에는 UVB 조사를 포함시키는 것이 적절할 수 있다. 스펙트럼에서 UVB 영역이 있는지 점검하고 조도의 변화와 함께 최종보고서에 기록해야 한다.
42. 마찬가지로 만약 다른 광원이 사용된다면 세포에는 유해하지 않으면서 표준 광독성 물질을 들뜬상태로 전환시키기에 충분한 광량을 선정할 수 있도록 광조사를 보정해야 한다. 표 1과 그림 2의 숙련도 물질 시험을 통해 기능 점검을 수행해야 한다.
43. 세포의 광조사 민감도: UVA 민감도 실험은 본 시험법을 해당 실험실에서 처음 실시하고자 할 때 1회 수행하여야 한다. 시험법에 대한 간략한 내용과 예상 결과는 SOP에 제공된다. 6 J/cm^2 에 노출된 조직의 세포생존율은 비조사군과 비교하여 80% 이상(\geq)이어야 한다.

시험절차

44. 조직 순화(tissue conditioning): RhE 조직을 수령하면 모든 키트 구성품의 무결성을 점검한다. 멸균 상태에서 well 당 0.9 mL 배지가 들어 있는 6-well 플레이트로 조직을 옮긴다. 플레이트를 표준배양조건($37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \pm 1\% \text{ CO}_2$, $90\% \pm 10\% \text{ RH}$) 배양기에 최소 60분간 둔다. 전배양은 하룻밤 동안 가능하지만 배지는 처음 60분이 지나면 교체해야 한다.
45. 최소 60분의 전배양 후 6-well 플레이트의 조직을 배양기에서 꺼내고 조직 아래 배지를 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 로 가온한 새 배지로 교체한다. 그런 다음 바로 조직에 물질을 적용하며, 그렇지 않은 경우 물질 적용 전까지 배양기에 넣어 놓는다. 각 처리 조건 및 처리 그룹별로 4개 조직을 처리하는데, 두 개는 시험법의 세포독성 부분(조사 없이 물질만 적용)에 사용되며 두 개는 시험법의 광독성 부분(광조사 + 물질 적용)에 사용된다.
46. 물질 적용: RhE 조직에 물질을 국소 적용한다. 초순수 또는 수용성 완충액에 용해한 용액의 경우 적용 용액 50 μL 를 RhE 조직에 국소 적용하고 가볍게 퍼주는데, 필요한 경우 멸균한 둥근 헤드 파스퇴르 피펫(한쪽 끝을 불로 녹여 둥글게 만든 파스퇴르 피펫) 또는 유사한 장비를 사용한다. 오일에 용해한 용액의 경우 적용 용액 25 μL 를 RhE 조직에 국소 적용하고 가볍게 퍼주는데, 필요한 경우 멸균한 둥근 헤드 파스퇴르 피펫을 사용한다. 퍼주는 것이 용이하지 않다면 멸균한 나일론 메쉬(둥근 형태)를 추가적인 도포 도구로 조직에 국소적으로

사용할 수 있다[모세관 현상(capillary action)으로 조직 표면을 덮는 역할]. 피부에 자극이 갈 수 있는 부형제의 경우 처리 용량은 부형제에 의한 세포독성을 피할 수 있는 범위 이내로 제한되어야 한다. 예컨대, 에탄올 또는 아세톤:올리브 오일 혼합액(4:1)에 용해한 적용 용액은 20 μL ~25 μL 를 넘지 않아야 하는데, 이보다 높은 용량은 세포독성을 일으킬 수 있기 때문이다.

47. 물질을 처리한 후 조직을 배양기에 넣고 표준 배양조건에서 하룻밤(18시간~24시간) 동안 배양한다.
48. 다음 날 완충용액(예: DPBS 또는 페놀레드가 포함되어 있지 않은 HBSS) 0.9 mL를 채운 6-well 플레이트 또는 완충용액 0.3 mL를 채운 24-well 플레이트로 조직을 옮긴다. 세포배양 배지에 대한 광조사로 인해 변동성이 일어나거나 또는 세포독성 광 생성물(photo-products)이 생길 수 있으므로 페놀레드가 포함되어 있지 않은 염류 완충액의 사용을 권장한다(35).
49. 광조사: 인공태양광량 6 J/cm^2 달성을 위해 실온에서 60분간 1.7 mW/cm^2 (또는 그 상당)로 +Irr 플레이트(덮개로 덮음)를 조사한다. 광원이 과도한 열을 생산하여 플레이트 덮개 아래 물방울이 생기는 경우 팬을 사용하여 플레이트를 환기시킨다. -Irr 플레이트를 실온에서 빛을 차단한 채 두는데(예: 박스 안) UVA를 조사하는 조직과 동일한 노출 공간에 두는 것이 좋다. 물질 적용에 나일론 메쉬가 사용되었다면 광조사 또는 빛 차단 전에 이를 조심스럽게 제거해야 한다(미세 포셉 등을 이용). 각 well 당 가온(37 $^{\circ}\text{C}$)한 새 시험 배지 0.9 mL를 채운 6-well 플레이트를 준비한다.
50. 광조사가 완료되면 멸균 CMF-DPBS가 들어있는 세척병으로 각 조직을 세척한다. 조직 표면에서 물질을 효과적으로 제거하기 위해 약 20회의 세척이 필요하다. 조직에 적용된 현탁액을 제거하는데 사용된 절차는 문서로 기록하고 최종보고서에 포함시켜야 한다. 모든 세척한 인서트를 새 배지가 든 새 플레이트로 옮긴다. 각 조직의 표면은 멸균 면봉의 끝부분으로 조심스럽게 물기를 제거한다.
51. 시험물질의 특성이 광조사를 방해하거나 막는 경우(예: 짙은 유색 또는 불투명한 물질) 광조사 유무에 따른 시험 전 적용했던 시험물질 용액을 제거해야 한다. 시험 조건하에서 18시간~24시간의 노출 기간 동안 RhE 조직으로 침투하는 시험물질은 광조사 처리 과정 동안 조직 내부에서 생물학적으로 이용 가능(bioavailable)하다. 광조사 전 시험물질 노출시간인

18시간~24시간은 TG439 피부자극시험(1)에 적용되는 노출시간보다 현저히 길며, 광조사 동안 조직 내부에서 활성광독성종(reactive phototoxic species)을 유발하는 조직모델 내부의 가장 가까운 표적세포까지 시험물질을 확산시키기에 충분한 시간을 보장한다. UVA/가시광선에 노출하거나 빛을 차단하기 전 시험물질을 제거하기 위해 세척 배지(예: DPBS without Ca^{++} & Mg^{++} (CMF-DPBS))에 적신 멸균 면봉을 사용할 수 있다. 광조사 전 적용된 시험물질을 세척하는 타당한 이유를 시험보고서에 제시해야 한다.

52. 표준배양조건에서 조직을 하룻밤(18시간~24시간) 배양한다.
53. MTT 세포생존율 시험: 1 mg/mL MTT 용액을 준비하여 37 °C로 가온하고 라벨을 붙인 24-well 플레이트의 적합한 well에 피펫을 이용하여 300 μL 씩 넣는다. 18시간~24시간 배양 후 조직 인서트를 6-well 플레이트에서 꺼낸 다음 인서트 바닥을 멸균 거즈 또는 종이타올로 짚어 물기를 제거하고 라벨을 붙인 24-well MTT 플레이트의 해당 well로 옮긴다. 24-well 플레이트를 표준 배양 조건에서 3시간 동안 배양한다.
54. MTT 배양이 끝나면 인서트를 24-well 플레이트에서 꺼낸 다음 인서트 바닥을 멸균 거즈 또는 종이 타올로 짚어 물기를 제거하고 라벨을 붙인 새로운 24-well MTT 플레이트의 해당 well로 옮긴다. 이소프로판올(추출 용액) 2 mL로 조직을 추출한다. 24-well 플레이트를 밀봉(예. 파라필름 이용)하고 실온에서 최소 2시간 동안 플레이트 교반기를 이용하여 부드럽게 흔들어 포르마잔을 추출한다. 또 다른 방법으로 하룻밤 동안 추출하는 것도 가능하다. 위에 설명한 대로 플레이트를 밀봉한 다음 흔들지 않고 실온에서 빛을 차단한 채 추출하고, 추출액을 취하기 전에 플레이트 교반기에서 최소 15분간 흔들어 준다.
55. 추출이 끝나면 조직 인서트를 well에서 꺼낸 후 조직 인서트 내의 추출 용액을 인서트가 있던 well에 따라주거나, 조직에 구멍을 뚫어(20 게이지 주사바늘 사용) 추출 용액이 인서트가 있던 well 내로 흘러내리도록 한다(인서트는 폐기 가능). 추출 용액이 균일해질 때까지 피펫으로 추출 용액을 최소 3회 위아래로 피펫팅하여 혼합해 준다. 각 조직별로 추출 용액을 200 μL 씩 분취하고 라벨을 붙인 96-well flat bottom microtiter 플레이트에 피펫으로 옮겨 준다. 끝으로 이소프로판올 200 μL 를 blank well에 담아준다.

56. 96-well 플레이트의 흡광도(OD)는 540 nm~595 nm 파장에서 microtiter-plate 분광광도계를 사용하여 판정하는데, 최대 ± 30 nm 필터 밴드 패스에서 570 nm 파장을 사용하는 것이 좋다. 참조 필터(reference filter) 판독은 필요하지 않다. 또 다른 방법으로 포르마잔 추출물 샘플의 흡광도를 HPLC/UPLC-spectrophotometry로 측정할 수 있다(32).

세포생존율

57. 세포생존율 계산: 각 시험물질별로 측정된 OD 값은 부형제대조군(세포생존율 100%로 설정) 대비 세포생존율(%)을 계산하는데 사용된다. HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용한 경우 조직 세포생존율(%)은 동일 부형제를 사용한 부형제대조군(음성대조군)에서 얻은 MTT 포르마잔 피크 면적 대비 시험물질에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 MTT 포르마잔 피크 면적 비율(%)로 계산된다.
58. 각 시험물질 또는 양성대조군 처리 조직(+Irr)의 상대적 세포생존율(또는 대조군 대비 %)은 해당하는 부형제대조군(음성대조군) 처리 조직(+Irr)의 평균과 비교하여 계산된다. 마찬가지로, 각 시험물질 또는 양성대조군 처리 조직(-Irr)의 상대적 세포생존율(또는 대조군의 세포생존율(%)은 해당하는 부형제대조군(음성대조군) 처리 조직(-Irr)의 평균과 비교하여 계산된다. 대조군의 개별 세포생존율(%)을 평균하여 각각의 +Irr과 -Irr 농도 별 평균 대조군 세포생존율(%)을 구한다. 공식은 다음과 같다.

$$\text{대조군 세포생존율(\%)} = \frac{\text{각 시험물질 또는 양성대조군 처리 조직의 보정한 OD}}{\text{음성/용매대조군의 보정한 OD}} \times 100$$

MTT 환원물질 및 유색 물질 보정

59. 시험물질의 광학적 특성 또는 MTT에 대한 화학적 반응(색 발현을 유발할 뿐만 아니라 이를 막거나 복귀시키기도 함)은 시험을 간섭하여 세포생존율을 잘못 측정하게 한다. 이런 현상은 특정 시험물질이 세척을 통해 조직에서 완전히 제거되지 않거나 시험물질이 표피에 침투하였을 때 발생한다. 시험물질이 MTT에 직접적으로 작용하고(예: MTT 환원제), 원래 색을 띠고 있으면서 조직 처리동안 발색 된다면 시험물질의 세포생존율 측정 간섭을 감지하고 보정하기 위해 추가적인 대조군이 사용되어야 한다. 직접적인 MTT 환원 및 유색 시약으로

인한 간섭을 보정하는 방법에 대한 자세한 설명은 피부/안자극 및 부식에 대한 OECD 검증 시험법 표준작업지침서(SOPs)를 참조한다(5)(25).

60. 직접적인 MTT 환원제를 식별하기 위해 각 시험물질의 최고 농도를 새로 준비한 MTT 용액에 넣는다. 시험물질을 포함한 MTT 혼합액이 청색/자색으로 변하면 해당 시험물질은 직접적으로 MTT를 환원하는 것으로 간주하며, 흡광도(OD) 측정 또는 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용하는 것과는 별개로 비활성 RhE 조직을 이용한 추가적인 기능 점검이 수행되어야 한다. 이러한 추가 기능 점검은 잔여 대사활성만을 가지지만 살아있는 조직과 유사한 방식으로 시험물질을 흡수하는 죽은 조직을 이용한다. 각 MTT 환원 시험물질을 최소 2개의 죽은 조직 반복군(광조사군과 비조사군 각 한 개씩)에 최고 농도로 적용한 다음, 비특이적 MTT 환원성(NSMTT)을 판단하기 위해 전체 시험절차를 진행한다.
61. 수행된 시험/반복시험(run)의 횟수와는 별개로 시험물질 한 개당 하나의 NSMTT 대조군이면 충분하다. 그런 다음 MTT 환원제에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 세포생존율(%)에서 동일한 MTT 환원제에 노출된 죽은 조직에서 얻은 비특이적 MTT 환원값을 빼서 실제 조직 세포생존율을 계산하는데, 보정되는 시험과 동시에 수행된 부형제대조군(음성대조군)과 비교하여 계산한다(%NSMTT).
62. 유색 시험물질 또는 초순수/이소프로판올과 만났을 때 때 발색되는 시험물질로 인한 간섭 가능성을 식별하고, 추가적인 대조군의 필요성을 결정하기 위해 물(노출 시 환경) 및/또는 이소프로판올(추출 용액)에 용해된 시험물질을 분석해야 한다. 초순수 및/또는 이소프로판올에 용해된 시험물질이 570 nm \pm 30 nm 범위에서 빛을 흡수하는 경우 추가적인 발색 대조군이 사용되어야 한다. 그렇지 않은 경우 HPLC/UPLC-spectrophotometry가 사용되어야 한다.
63. 흡광도(OD)를 측정할 때에는 각각의 색간섭 시험물질을 최소 두 개의 살아있는 조직(광조사군과 비조사군 각 한 개씩)에 최고 시험농도로 적용하고 전체 시험절차를 적용하되 비특이적 색상(NSCliving) 대조군을 설정하기 위해 MTT 배양 단계에서 MTT 용액 대신 배지로 배양한다. NSCliving 대조군은 유색 시험물질의 시험과 동시에 수행되어야 하며, 다수의 시험을 수행하는 경우 살아있는 조직 고유의 생물학적 변동성으로 인해 각 반복시험(run)의 개별 시험별로 NSCliving 대조군이 수행되어야 한다. 그런 다음 색간섭

시험물질에 노출되고 MTT 용액에 배양된 살아있는 조직에서 얻은 세포생존율에서 색간섭 시험물질에 노출되고 MTT 없이 배지로만 배양된 살아있는 조직에서 얻은 비특이적 색상(%)을 빼서 실제 조직 세포생존율을 계산하는데, 이는 보정되는 시험(%NSCliving)과 동시에 수행된다.

64. 비특이적 MTT 환원과 비특이적 색간섭은 분광광도계의 직선성의 범위 이상으로 조직 추출물의 판독 값을 향상시킬 수 있다. 이를 기반으로 각 실험실은 규제적 목적으로 시험물질에 대한 시험을 시작하기에 앞서 시판되는 MTT 포르마잔(CAS # 57360-69-7)을 사용하여 분광광도계의 직선성의 범위를 결정해야 한다. 직접적인 MTT 환원 및/또는 색간섭을 보정하지 않은 시험물질로 얻은 조직 추출물의 흡광도(OD)가 분광광도계의 직선성의 범위 내에 있는 경우, 분광광도계를 사용한 흡광도(OD) 측정이 직접적 MTT 환원제와 색간섭 시험물질을 평가하기에 적절하다.
65. MTT 시험을 강하게 간섭하여 표준 흡광도(OD)를 측정할 수 없는 유색 시험물질의 경우 MTT 포르마잔 측정을 위한 대안으로 HPLC/UPLC-spectrophotometry가 사용될 수 있다. HPLC/UPLC-spectrophotometry는 MTT 포르마잔을 정량하기 전에 시험물질로부터 MTT 포르마잔을 분리할 수 있다(32). 이러한 이유로 시험에 사용되는 물질과 상관없이 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용할 때에는 NSCliving 또는 NSCKilled 대조군이 필요하지 않다. 그러나 시험물질이 직접적으로 MTT를 환원하거나 직접적 MTT 환원능의 평가를 방해하는 색깔을 지닌 경우 NSMTT 대조군이 사용되어야 한다. MTT 포르마잔을 측정하는 HPLC/UPLC-spectrophotometry를 사용할 때에는 시험물질과 동시에 수행된 부형제(음성) 대조군에서 얻은 MTT 포르마잔 피크 면적 대비 시험물질에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 MTT 포르마잔 피크 면적의 비율로 조직 세포생존율(%)을 계산한다. MTT를 직접적으로 환원할 수 있는 시험물질의 경우 실제 조직 세포생존율은 시험물질에 노출된 살아있는 조직에서 얻은 세포생존율(%)에서 %NSMTT를 빼서 계산한다. 마지막으로 직접적인 MTT 환원제이면서 처리 후 조직에 잔존하며 매우 강하게 MTT를 환원하여 시험되는 조직 추출물의 흡광도(OD)(표준 OD 측정 이용) 또는 피크 면적(HPLC/UPLC-spectrophotometry 이용)을 분광광도계 직선성의 범위를 벗어나게 하는 색간섭 물질은 이 시험법을 적용할 수 없지만, 이는 극히 일부의 경우에 해당한다.

66. HPLC/UPLC-spectrophotometry는 MTT 포르마잔 측정을 위해 모든 종류의 시험물질(유색, 무색, MTT 환원제, 비환원제)에 사용될 수 있다. HPLC/UPLC-spectrophotometry는 다양하므로 조직 추출물의 MTT 포르마잔 정량에 사용하기 전 미국 FDA의 생체분석법 검증 산업계 지침에 근거한 일련의 표준 적격성 매개변수(standard qualification parameters)의 인정기준을 충족함으로써 HPLC/UPLC-spectrophotometry의 적격성을 증명해야 한다.

시험의 인정기준

67. 유효한 반복시험(run)은 아래의 인정기준을 충족해야 한다.
- 부형제(음성) 또는 양성대조군으로 처리한 두 개의 반복 조직 간에 상대적 세포생존율 차이는 20%를 초과하지 않아야 한다.
 - 광조사를 하지 않고 시험된 부형제대조군(음성대조군)의 세포생존율은 표 2에 제시된 인정 범위 내에 있어야 한다.
 - 광조사 상태에서 시험된 부형제대조군(음성대조군)의 세포생존율은 광조사를 하지 않고 시험된 부형제대조군(음성대조군)과 비교하여 80% 이상(≥)이어야 한다. 이러한 대조군은 43단락에 기술된 것과 같이 세포에 과도한 방사선민감성(radiation sensitivity)이 없음을 보여준다.
 - 양성대조군은 양성 예측 결과가 나와야 한다.
68. 광독성 가능성 평가에 사용되는 각 시험물질 처리 그룹은 아래의 기준을 충족해야 한다.
- 광조사를 하지 않은 시험물질 처리 조직의 세포생존율은 최대 권장 농도인 10%[또는 세포독성으로 최대 농도가 제한적인 경우 최대허용용량(maximum tolerated dose)]에서 광독성과 비광독성 예측이 모두 가능할 만큼 충분히 높아야 한다(예: 세포생존율 > 35%).

결과 해석 및 예측 모델

69. 광조사 상태에서 처리한 하나 이상의 시험농도의 상대적 세포생존율이 광을 조사하지 않고 처리한 동일 농도의 상대적 세포생존율과 비교하여 30% 이상(≥) 줄어든 물질은 광독성(또는 광독성 가능성)이 있는 것으로 예측된다.

70. 광조사 상태에서 처리한 모든 시험농도의 상대적 세포생존율이 광을 조사하지 않고 처리한 동일 농도의 상대적 세포생존율과 비교하여 30% 이상(\geq) 줄어들지 않은 물질은 광독성(또는 광독성 가능성)이 없는 것으로 예측된다.
71. 모든 농도가 광독성이 없는 것으로 예측되고, 최소 하나의 농도가 절사값(cut-off)인 5% 이하이며(또는 이거나), 반복군(replicate)에서 얻은 결과가 불일치 하는 경우 두 번째 반복시험(run)을 수행해야 한다. 두 번의 반복시험 결과가 불일치하는 경우 세 번째 반복시험을 수행해야 한다. 이러한 경우 광독성 가능성이 있다면 광독성이 나타날 것으로 예상되는 농도 범위로 시험할 것을 권장한다.

데이터 및 보고서 작성

데이터

72. 데이터의 품질 및 양: 데이터의 유의미한 분석을 위해 광조사를 할 때와 하지 않을 때 농도 반응을 포착하는 적절한 농도를 선정해야 한다. 모호하거나, 경계선에 있거나 불확실한 결과는 추가시험을 통해 명확히 해야 한다. 이 경우 실험 조건(예: 시험되는 농도)의 변경이 고려되어야 한다.
73. 각 반복시험(run)별로 연속실험(repeat experiments)으로 얻은 데이터 등을 포함한 각각의 조직 반복군(replicate)에서 얻은 데이터(예: OD 값, 물질 분류를 포함한 각 시험물질의 세포생존율(%))을 계산한 데이터를 보고서에 기입해야 한다. 나아가 '세포생존율 평균 \pm 각 반복시험의 조직 반복군 간 차이'를 보고서에 기입해야 한다. MTT 시약과 유색 시험물질 간에 상관관계가 관찰되는 경우 시험물질별로 보고서에 기입해야 한다.

시험보고서

74. 시험보고서는 다음의 정보를 포함해야 한다.

시험물질 및 대조군(양성대조군 및 부형제대조군)

- 단일성분 물질: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 순도, 불순물의 화학적 정보(가능한 수준까지) 등의 화학물질 식별정보

- 다성분 물질, UVCB 및 혼합물: 가능한 많은 화학적 정보(위의 내용 참조)를 통한 화학물질 특성, 구성성분의 정량적 형태 및 관련 물리화학적 특성
- 물리적 성상, 수용성 및 추가적인 모든 물리화학적 특성
- 공급원, 로트 번호(있는 경우)
- 시험 전 시험물질/대조군 물질의 준비 방법(예: 가온, 분쇄)
- 시험물질의 안정성, 유통기한, 재분석을 위한 데이터(알고있는 경우)
- 부형제(부형제 선정의 타당성, 부형제에서 시험물질의 용해도)

사용된 RhE 모델 및 프로토콜(가능하면 선정의 근거 포함)

- 사용된 RhE 모델(배치 번호 포함)
- 수행능력을 포함한 사용된 특정 RhE 모델에 대한 모든 근거 자료. 이 자료는 조직 개발사/공급사가 『분석증명서』 또는 『QC 출하 보고서』의 형태로 제공해야 하며 다음의 정보를 포함해야 한다(단, 이에 국한되지는 않음).
 - i) 세포생존율
 - ii) 장벽기능
 - iii) 형태학적 특징
 - iv) 해당 모델의 품질관리(QC)
- 사용되는 모델의 과거 데이터에 대한 참고자료. 이 자료는 과거 배치 데이터에 대한 참고자료와 함께 QC 데이터의 인정가능성을 포함해야 한다(단, 이에 국한되지 않음).
- 숙련도 물질의 시험을 통한 시험법 수행의 숙련도에 대한 기술

시험 조건

- 측정장비(예: 분광광도계)의 보정 정보, MTT 포르마잔 정량화에 사용된 파장 및 밴드 패스(있는 경우), 측정장비의 직선성의 범위, MTT 포르마잔 정량화에 사용된 방법의 설명
- HPLC/UPLC-spectrophotometry의 적격성에 대한 설명(가능한 경우)
- 광원-조사 조건
 - 사용된 광원의 선정 근거
 - 광원 및 복사계(radiometer)의 제조사와 종류

- 광원의 모든 분광복사조도(spectral irradiance) 관련 특성
- 사용된 필터의 방출 및 흡수 특성
- 복사계(radiometer)의 특성 및 보정에 대한 설명
- 시험계와 광원 간의 거리
- 위의 거리에서 mW/cm^2 로 표기한 UVA 조도
- 조사 노출의 기간
- J/cm^2 로 표기한 UVA 광량(조도 × 시간)
- 광조사 동안의 세포 배양물 및 이와 동시에 수행되는 빛을 차단한 세포 배양물의 온도

시험절차

- 사용된 시험절차의 세부사항(노출 기간 후 사용된 세척절차 포함)
- 사용된 시험물질 및 대조군 물질의 용량
- 광조사가 있을 때와 없을 때 사용된 시험물질의 농도 선정에 대한 근거
- 부형제의 종류 및 구성
- 노출 및 사후 노출 배양의 기간 및 온도
- 직접적인 MTT 환원제 및/또는 발색 시험물질에 사용된 대조군 표시(해당하는 경우)
- 시험물질 및 대조군(해당하는 경우 양성, 부형제(음성)대조군)NSMTT, NSCliving)별로 사용된 조직 반복군(replicate)의 개수
- 사용된 RhE 모델을 기반으로 적용된 결정기준/예측모델에 대한 설명
- 시험절차의 모든 변경사항에 대한 설명(세척 절차 포함)

반복시험(run) 및 시험 인정기준

- 양성대조군과 부형제(음성)대조군의 조직 반복군 간 변동성의 인정기준
- 부형제(음성)대조군 OD 값의 인정기준
- 광을 조사하지 않은 조건과 비교하여 광을 조사하였을 때 부형제(음성)대조군의 세포생존율 인정기준
- 양성대조군의 인정기준

결과

- OD 또는 MTT 포르마잔 피크 면적, 세포생존율(%), 평균 조직 세포생존율(%), 조직 간 차이 등 각 시험물질별 반복시험(run)과 반복군(replicate)의 측정값 데이터의 도표
- 해당하는 경우, MTT 환원제 및/또는 발색 물질에 사용된 대조군의 결과(OD 또는 MTT 포르마잔 피크 면적, %NSMTT, %NSCliving, 보정된 최종 상대적 세포생존율)
- 정해진 반복시험(run) 및 시험 인정기준과 관련하여 시험물질 및 대조군 물질로 얻은 결과
- 관찰된 기타 영향에 대한 설명
- 사용된 예측모델/결정기준을 참고하여 산출한 화학물질 등급

참고문헌

- 1) OECD. (2020). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 439): In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>
- 2) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 432): *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071162-en-189228>
- 3) Liebsch, M., Barrabas, C., Traue, D. and Spielmann, H. (1997) Development of a new *in vitro* test for dermal phototoxicity using a model of reconstituted human epidermis (EpiDerm™) [Article in German], ALTEX - Alternatives to animal experimentation, 14(4), pp. 165-174. doi: 10.14573/altex.1997.4.165.
- 4) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Gerberick, G.F., Cruse, L., Diembeck, W., Pfannenbecker, U., Spieker, J., Holzhütter, H.G., Brantom, P., Aspin, P., and Southee, J. (1999). In Alternatives to Animal Testing II: Proceedings of the second international scientific conference organised by the European Cosmetic Industry, Brussels, Belgium (ed. D. Clark, S. Lisansky & R. Macmillan), pp. 160-166. Newbury, UK: CPL Press
- 5) Jones, P., King, A., Lovell, W., and Earl, L. (1999) Phototoxicity testing using 3-D reconstructed human skin models. In: Clark D, Lisansky S, Macmillan R, editors. Alternatives to animal testing II: proceedings of the second international scientific conference organised by the European cosmetic Industry, Brussels, Belgium. Newbury, UK: CPL Press; 1999. p. 138-41.
- 6) Jirová D, Kejlová K, Bendová H, Ditrichová D, Mezulániková M (2005) Phototoxicity of bituminous tars-correspondence between results of 3T3 NRU PT, 3D skin model and experimental human data. Toxicology *in Vitro* : an International Journal Published in Association with BIBRA. 19(7):931-934. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.013.
- 7) Kandarova, H. (2006). Evaluation and Validation of Reconstructed Human Skin Models as Alternatives to Animal Tests in Regulatory Toxicology - PhD Thesis. http://edocs.fuberlin.de /diss/receive/FUDISS_thesis_000000002248

- 8) Kejlová, K., Jírová, D., Bendová, H., Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Kolářová, H., and Liebsch, M. (2007). Phototoxicity of Bergamot oil assessed by *in vitro* techniques in combination with human patch tests. *Toxic. in Vitro* 21, p. 1298-1303
- 9) Kejlová K, Jírová D, Bendová H, Gajdoš P, Kolářová H. (2010) Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. *Toxicol In Vitro*. 24(8):2084-9. doi: 10.1016/j.tiv.2010.07.025. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20688147.
- 10) Kandárová,H., and Liebsch, M. (2017) The EpiDerm™ Phototoxicity Test (EpiDerm™ H3DPT). Book Chapter In: Alternatives for Dermal Toxicity Testing, Editors: Chantra Eskes, Erwin van Vliet, Howard I. Maibach. Springer. 483-503.
- 11) Pape, Wolfgang & Balls, Michael & M., Csato & O., De & J., Dupuis & Gerberick, Frank & W.W., Lovell & Liebsch, Manfred & Pfannenbecker, Uwe & M., Potthast & Spielmann, Horst & Steiling, Winfried. (1999). A Proposed Strategy for Testing Phototoxicity by Stepwise Use of Validated *In Vitro* Methodologies: The COLIPA Task Force on Phototoxicity *In Vitro*. COLIPA Symposium on Alternative methods 24-25 March 1999. Brussels, Belgim. Page 15-16.
- 12) Liebsch M. (2006) A feasibility study on whether the prevalidated human 3-D Epidermis model *in vitro* phototoxicity test (EpiDerm-PT), could successfully be used for phototoxic potency testing. Interm Report. Contract No. 19868-31 pages. Available at: https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test_method/tm1997-02
- 13) Lovell, W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxic. In Vitro* 7: 95-102.
- 14) 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.
- 15) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Saporá, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA*, 22, 314-348.
- 16) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

- 17) OECD (1981). OECD Test Guideline for the Testing of Chemicals (No. 101): UV-VIS Absorption Spectra. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. [https://doi.org/ 10.1787/9789264069503-en](https://doi.org/10.1787/9789264069503-en)
- 18) Bauer, D., Averett, L.A., De Smedt, A., Kleinman, M.H., Muster, W., Pettersen, B.A., and Robles, C. (2014). Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 68: 70-75.
- 19) ICH S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Guidance for Industry. January 2015. <https://www.fda.gov/media/85076/download>
- 20) 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
- 21) Oesch, F., Fabian, E., Guth, K., and Landsiedel, R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Arch Toxicol*. 2014; 88(12):2135-2190. doi:10.1007/s00204-014-1382-8
- 22) Ceridono, M., Tellner, Par, Bauer, D., Barroso, J., Alépée, N., Corvi, R., De Smedt, A., Fellows, M.D., Gibbs, N.K., Heisler, E., Jacobs, A., Jirova, D., Jones, D., Kandárová, H., Kasper, P., Akunda, J.K., Krul, C., Learn, D., Liebsch, M., Lynch, A.M., Muster, W., Nakamura, K., Nash, J.F., Pfannenbecker, U., Phillips, G., Robles, C., Rogiers, V., Van De Water, F., Liminga, U.W., Vohr, H.W., Wattrelos, O., Woods, J., Zuang, V., Kreysa, J., and 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.
- 23) Jones, P.A., Lovell, W.W., King, A.V., Earl, L.K (2001) *In vitro* testing for phototoxic potential using the EpiDerm™ 3-D reconstructed human skin model. *Toxicology Methods* 11, 1-19.
- 24) Jones, P.A, King, A.V., Earl, L.K., Lawrence, R.S (2003) An assessment of the phototoxic hazard of a personal product ingredient using *in vitro* assays. *Toxicology in Vitro* 17 (2003) 471-480.

- 25) 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.
- 26) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431): In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>
- 27) Liebsch M.(1997). Standard Operation Procedure. EpiDerm™ Phototoxicity Assay (model: Epi-200). Final version. 5 Novemb. 97. 28 p Annex 3 to the Final Report. Available via <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm1997-02>
- 28) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 495): ROS (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/915e00ac-en>
- 29) EMA, (2015). ICH Guidance S10 on Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/752211/2012 Committee for Human Medicinal Products. Available at https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-5_en.pdf
- 30) Líšková, A., Letašiová, S., Jantová, S., Brezová, V., and Kandárová, H. (2020) "Evaluation of phototoxic and cytotoxic potential of TiO₂ nanosheets in a 3D reconstructed human skin model", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 37(3), pp. 441-450. doi: 10.14573/altex.1910012.
- 31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55- 63.
- 32) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. (2015) Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxic. In vitro.* 29(4), 741-761.

- 33) Kandarova, H and Liebsch, M (2017) 'The EpiDerm™ Phototoxicity Test (EpiDerm™ H3DPT, Chapter 35), C, Eskes., E. van Vliet., H.I., H.I. Maibach (Eds), Alternative for Dermal Toxicity Testing, Springer International Publishing, Page 483 - 503
- 34) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints -Methods for measuring image stability.
- 35) Stoen, JD, and Wang, RJ. Effect of near-ultraviolet and visible light on mammalian cells in culture II. Formation of toxic photoproducts in tissue culture medium by blacklight. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974;71(10):3961-3965. doi:10.1073/pnas.71.10.3961
- 36) FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May2001. Available at URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- 37) Spielmann, H., Blla, M., Dupuis, J., Pape, W.J., 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., 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. Toxicology *in Vitro* 12 (1998) 305 - 327
- 38) Liebsch M.(1998). Prevalidation of the "EpiDerm™ Phototoxicity Test" - FINAL REPORT (Phases I, II,III). Available via <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm1997-02>

부록 1. 용어 정의

혼합물(Mixture): 서로 반응하지 않는 두 가지 이상의 물질로 구성된 복합물질 또는 용액(14)

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 × 시간)으로 표면적 당 줄(Joule = $W \times s$)로 표현됨(예: J/m^2 또는 J/cm^2)

UV 광 파장대(UV light waveband): CIE(Commission Internationale de L'Eclairage)가 권장하는 파장대는 UVA(315 nm~400 nm) UVB(280 nm~315 nm) 및 UVC(100 nm~280 nm)이다. 이 외의 파장대도 사용될 수 있다. UVB와 UVA는 보통 320 nm를 경계로 나뉘며, UVA는 대략 340 nm를 기준으로 UV-A1 과 UV-A2로 나뉠 수 있다.

상대적 조직 세포생존율(relative tissue viability): 전체 시험절차(+Irr 또는 -Irr 중 하나)를 거치지만 시험물질 처리를 하지 않은 부형제(음성)대조군과 비교하여 표시한 조직 세포생존율

MEC(Molar Extinction/Absorption Coefficient): 특정한 일련의 조건(예: 부형제, 온도, 파장 등)에서 주어진 분자의 상수이며 분자가 광자(photon)를 흡수할 수 있는 효율(efficiency)을 나타낸다(주로 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ 로 표시).

광독성(phototoxicity): 화학물질이 피부에 적용되거나 전신투여 된 후 피부가 빛에 노출되었을 때 나타나는 급성 독성 반응

정확도(Accuracy): 시험 결과와 허용된 참고치의 일치 정도. 시험수행에 대한 평가 척도이고 상관성(relevance)의 한 측면이다. 정확하게 맞춘 시험결과의 비율을 의미하는 “일치성(concordance)”과 “정확도(Accuracy)”는 같은 의미로 쓰인다(20).

세포생존율(Cell viability): 세포 미토콘드리아 탈수소효소가 생체염료 MTT(3-(4,5- Dimethylthiazol -2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue)를 환원시키는 능력 등과 같이

세포 군집의 총 활성도를 측정하는 지표로, 측정된 평가 변수 및 시험 설계에 따라 살아있는 세포의 총 숫자 및/또는 활성도에서 상관관계가 나타난다.

화학물질(Chemical): 단일 물질 또는 복합물질을 의미한다.

일치성(Concordance): 시험법의 수행도에 대한 척도로 각 카테고리에 해당하는 결과를 제공하며 상관성의 한 측면이다. 이 용어는 정확도와 교차 사용이 가능하며, 양성 또는 음성으로 정확하게 분류되는 모든 시험물질의 비율로 정의된다. 일치성은 시험물질 유형에서 양성 비율에 따라 크게 달라진다(20).

HPLC(High Performance Liquid Chromatography): 고성능액체크로마토그래피

IATA: 통합독성평가(Integrated Approach on Testing and Assessment)

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue tetrazolium bromide.

음성대조군: 부형제대조군 참조

NSKilled(non-Specific Colour in killed tissue): 죽은 조직의 비특이적 색상

NSCliving(non-Specific Colour in living tissue): 살아있는 조직의 비특이적 색상

NSMTT(Non-Specific MTT reduction): 비특이적 MTT 환원

유사시험법평가기준(Performance standards, PS): 검증된 시험법을 기반으로 기전적 및 기능적으로 유사하게 제시된 시험법의 비교 가능성을 평가하는 기준. 여기에는 (i) 필수 시험법 구성요소, (ii) 검증된 시험법의 허용 가능한 수행도를 입증하는 데 사용된 화학물질 중에 선택된 참고 화학물질의 최소 목록, (iii) 검증된 시험법에서 얻은 값을 기반으로 한 정확도 및 신뢰도의 유사성(참고 화학물질의 최소 목록을 사용하여 평가할 때 제시된 시험방법이 입증되어야 함)이 포함된다(20).

양성대조군(Positive Control, PC): 시험 시스템의 모든 구성요소를 포함한 복제군으로 양성반응을 유발한다고 알려진 화학물질로 처리된다. 양성대조군의 변동성을 보장하기 위해 시간별 반응이 평가될 수 있도록 양성 반응 정도가 과하지 않아야 한다.

상관성(Relevance): 시험과 관심 효과의 관련성 및 시험이 특정 목적에 의미 있고 유용한지에 대한 설명. 상관성은 시험이 얼마나 관심 생물학적 효과를 정확하게 측정하고 예측하는지 나타내며, 시험법의 정확도(일치성)를 내포한다(20).

신뢰도(Reliability): 동일한 시험방법에 따라 반복 시행하였을 때 동일 실험실과 다른 실험실에서 시험 결과를 재현할 수 있는 정도. 신뢰도는 실험실 내·실험실 간 재현성(reproducibility)으로 평가된다(20).

대체 시험(Replacement test): 유해성 식별 및/또는 위험 평가를 위해 일반적으로 사용 및 승인된 시험을 대체하도록 설계된 시험, 모든 가능한 시험 상황 및 화학물질에 대해 승인된 시험과 비교하여 인체 또는 동물의 건강, 환경을 이에 상응하거나 더 좋은 방법으로 보호할 수 있다고 확인된 경우(9)

반복시험(Run): 부형제(음성)대조군 및 양성대조군과 함께 하나 이상의 시험물질로 구성된 시험

민감도(Sensitivity): 시험에 의해 올바르게 분류된 양성/활성 시험물질의 비율. 카테고리적 결과를 나타내는 시험법 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 주요 고려사항이다(20).

부형제대조군: 시험물질을 제외한 시험계의 모든 구성성분을 포함하지만 사용되는 부형제는 포함하는 반복군. 동일 부형제에 용해된 시험물질로 처리한 시료의 기저반응을 확립하는데 사용되며 본 시험법에서는 데이터 분석의 음성대조군으로 사용된다. 부형제대조군은 시험물질을 처리한 시료 및 기타 대조군 시료와 함께 처리한다.

특이도(Specificity): 시험에 의해 올바르게 분류된 음성/비활성 시험물질의 비율. 카테고리적 결과를 나타내는 시험법 정확도의 척도이며 시험법의 상관성을 평가하는 주요 고려사항이다(20).

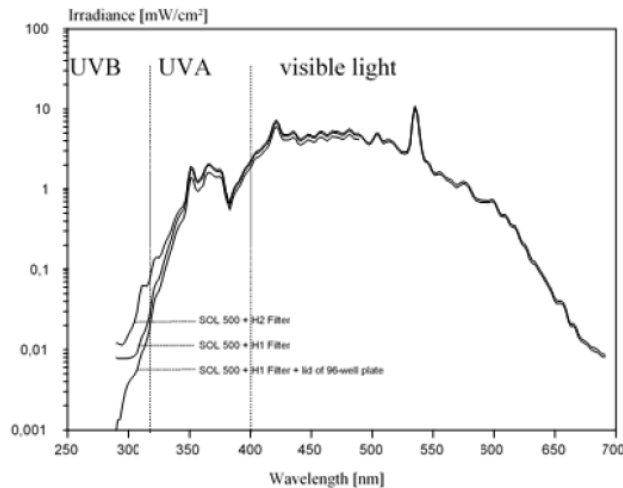
시험물질(Test chemical): 시험 대상 물질

UPLC(Ultra-High Performance Liquid Chromatography): 초고성능액체크로마토그래피

UVCB: 조성이 알려져 있지 않거나 다양한 조성으로 이루어진 화합물, 복잡한 반응산물 또는 생물학적 물질

부록 2. 광원의 분광분포(spectral power distribution)의 예시 및 RhE의 조사 민감도

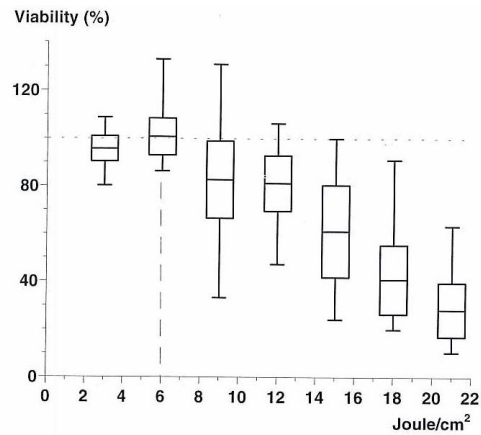
그림 1. 필터가 장착된 인공태양광 조사기의 분광분포



출처: Spielmann, H. et al (1998)(37)

그림 1은 필터가 장착된 인공태양광 조사기의 인정가능한 분광분포 예시를 제공한다. 이는 3T3 NRU PT의 검증시험과 EpidermTM 광독성시험의 사전검증 및 대부분의 후속연구에서 사용된 수은 메탈 할라이드 아크[(doped) mercury metal halide arc]에서 유래하였다. 위 그림은 두 가지 다른 필터의 영향 및 96-well 세포배양 플레이트의 덮개로 인한 추가적인 필터 효과를 보여준다. H2필터는 더 높은 양의 UVB를 전달 수 있는 시험계에만 사용되었다[피부모델 시험 및 적혈구 광용혈(photohemolysis)]. 3T3 NRU-PT에서는 H1 필터가 사용되었다. 위 그림은 플레이트 덮개로 인한 추가적인 필터 효과가 주로 UVB 범위에서 관찰되지만, 조도 스펙트럼(irradiation spectrum)에서 Amiodarone과 같이 UVB 범위를 주로 흡수하는 물질을 들뜬상태(excite)로 전환시키기에 충분한 UVB가 남아 있음을 보여준다.

그림 2. RhE의 조사 민감도(UVA 영역에서 측정)



Liebsch et al(1998)(38)에 제시된 위 그림은 광조사를 하지 않은 조직과 비교하여 UVA 광조사의 농도가 점차 증가했을 때 조직의 반응을 보여준다. 상대적 세포생존율은 MTT 전환 assay로 판정되었다. 각 네모상자는 4회의 실험을 통해 평가된 12개 조직의 평균을 나타낸다. 사용된 조직은 과도한 세포독성 영향 없이 6 J/cm^2 의 조사량을 견디는 것으로 나타났다. 조사량은 1.7 mW/cm^2 (UVA)였으며, 10분간 조사했을 때 결과는 1 J이었다.

부록 3. 시험물질 부형제 선정의 고려사항

부형제

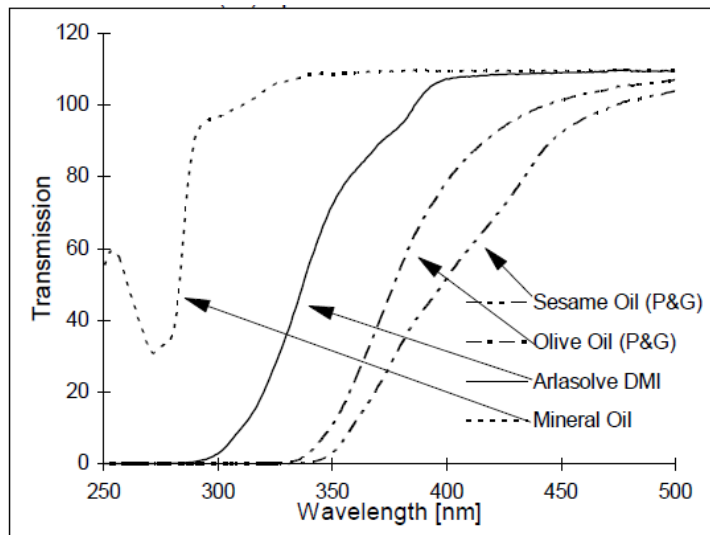
개발과 사전검증연구 과정에서(3)(38) 참기름(sesame oil)이 물에 충분히 용해되지 않는 물질의 부형제로 선정되었다. 사전검증연구 참여실험실에서 몇몇 다른 부형제를 실험하였지만(그림 3) 참기름이 최종 실험에서 선정되었다. 오일성 부형제와 더불어 에탄올 및 아세톤:올리브 오일의 혼합액이 물이나 오일에 제대로 용해되지 않는 물질의 부형제로 제안되었다(5)(30).

인공태양광의 전체 스펙트럼을 충분히 전달할 수 있는 부형제를 선정하는 것이 중요하다(즉, 부형제가 인공태양광 스펙트럼 내에서 뚜렷한 흡수를 보여서는 안 됨). 더불어 권장 용량인 50 μ l를 초과해서는 안 되는데 조직 표면에 과도한 부형제를 적용할 경우 광보호막(photo-protective layer)이 형성될 수 있기 때문이다.

나아가 대안으로 사용되는 부형제에 대한 3D 조직의 생물학적 반응을 평가해야 한다. 대안으로 사용되는 부형제는 조직의 세포생존율을 물을 처리한 조직의 70 % 미만으로 낮추지 않아야 한다.

화학물질의 광역가(photopotency)(즉, 광독성 강도)는 오일 및 수용성 용액에 용해한 염산클로르프로마진(Chlorpromazine-HCl)(3) 또는 오일 및 에탄올 용액에서 시험한 안트라센(Anthracene)(3)(30)으로 얻은 실험에서 나타난 바와 같이 부형제에 의해 바뀔 수 있다.

그림 3. 세 가지 오일류 및 DMI의 흡수/방출(%) 스펙트럼



Source: Liebsch, M., (1998) (38)

OCDE/OECD

498

Adopted

14 June 2021

Corrected: 4 July 2023

*OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS***In vitro Phototoxicity: Reconstructed Human Epidermis Phototoxicity test method****INTRODUCTION**

1. Phototoxicity (photoirritation) is defined as an acute toxic response elicited by topically or systemically administered photoreactive chemicals after the exposure of the body to environmental light. Within the context of skin exposures to phototoxic chemicals, phototoxic responses are elicited after an acute exposure of skin to photoactive chemicals and subsequent exposure to light. The test method does not address photosensitizers, which are photoactive chemicals that can induce an immunologically-mediated response in exposed skin.

2. This Test Guideline (TG) addresses the human health endpoint of phototoxicity, specifically as it relates to topical skin exposures to phototoxic chemicals. The *in vitro* reconstructed human epidermis phototoxicity test (RhE PT) is used to identify the phototoxic potential of a test chemical after topical application in reconstructed human epidermis (RhE) tissues in the presence and absence of simulated sunlight (see paragraphs 37-38 for the characterization of simulated sunlight). Phototoxicity potential is evaluated by the relative reduction in viability of cells exposed to the test chemical in the presence as compared to the absence of simulated sunlight. Chemicals identified as positive in this test may be phototoxic *in vivo* following topical application to the skin, eyes, and other external light-exposed epithelia.

3. This TG is based on the *in vitro* test system of the reconstructed human epidermis (RhE), which closely mimics the biochemical and physiological properties of the outermost layers of the human skin, i.e., the epidermis. The RhE test system uses human-derived keratinocytes as a cell source to reconstruct an epidermal model with representative histology and cytoarchitecture. The test method combines the basic test chemical exposure and viability assessment methodologies described in the OECD TG 439 on *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test (1) with the standardized irradiation procedures described in the OECD TG 432 on *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test (2). Exposure times in this TG are notably longer than those described in TG 439 to ensure sufficient time for chemical ingredients to diffuse into the tissue model nearest the target cells where reactive phototoxic species may be induced at the time of irradiation.

4. An assessment of the general performance was based on an *ad hoc* evaluation of individual literature citations (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10) including an initial test method pre-validation reported in 1999 (4) with a sensitivity of 86.7% and specificity of 93.3% (Phase III, set of 10 chemicals tested twice independently in three laboratories). The data were presented to the

© OECD, (2023)

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

OECD/OCDE

498

COLIPA Phototoxicity task-force in 1999 (11). The task-force concluded that 3D RhE skin model could be a useful tool to address bioavailability of a test chemical. When used in combination with the 3T3 NRU PT as a complementary test, it will allow a clear decision in the case of borderline predictions of acute phototoxicity. The 3D RhE skin model test was also regarded as advantageous in helping to assess the phototoxic potency. A follow-up study on phototoxic potency was supported by ECVAM during 2003-2006 (12).

5. To support the development of the new OECD phototoxicity guideline, the OECD phototoxicity expert group conducted an *ad hoc* evaluation of the pre-validation data, together with other literature, on the ability of the 3D RhE skin models to predict acute phototoxic potential *in vitro*. From the literature review, a database of over 60 test chemicals evaluated in the EpiDerm™ skin model was derived. The aggregate datasets provided specificity and sensitivity values higher than those obtained in the pre-validation study (4), as previously sensitivity values were compromised by erroneous instructions on the vehicle use (10). It should be noted that other studies performed after the initial pre-validation study, whilst using the same SOP, were not conducted as formal validation studies.

6. Definitions used in this TG are provided in ANNEX 1

INITIAL CONSIDERATIONS AND LIMITATIONS

7. Many types of chemicals have been reported to induce phototoxic effects (13)(14)(15)(16). Their common feature is their ability to absorb light energy within the sunlight emission spectrum. Photoreactions require sufficient absorption of light quanta. Thus, before testing is considered, a UV/visible absorption spectrum of the test chemical should be determined according to OECD TG 101 on UV-VIS Absorption Spectra (17). It has been reported that if the molar extinction/absorption coefficient (MEC) is less than $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, the chemical is unlikely to be photoreactive (18)(19). Such chemicals may not need additional testing with the *in vitro* RhE PT or any other biological test for adverse photochemical effects (3)(20). In general, this principle applies to all test chemicals, however, more specific guidelines may apply depending on the intended use of the chemical or potential exposure conditions. The RhE PT test can be used as a stand-alone method, and also in a tiered testing strategy for topically applied substances following specific guidelines (such as ICH S10 for pharmaceuticals). The term "test chemical" is used in this TG to refer to what is being tested and is not related to the applicability of the RhE PT to the testing of substances and/or chemical mixtures. Limited information is currently available on the applicability and performance of the RhE PT to mixtures of known composition. When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this TG, it should be first considered if the results of such testing will be scientifically meaningful.

8. The reliability and relevance of the *in vitro* RhE PT was evaluated in multiple studies (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10). The procedures and prediction model presented in this TG are designed to distinguish between phototoxic and non-phototoxic chemicals. However, specific procedures and prediction models exist in the literature to address phototoxic potency for topically applied chemicals and mixtures. This TG is not designed to predict other adverse effects that may arise from the combined action of a chemical and light (e.g., it does not address photo-genotoxicity, photoallergy, or photocarcinogenicity). Furthermore, the TG has not been designed to address indirect mechanisms of phototoxicity, effects of metabolites of the test chemical, or evaluate the phototoxicity potential of individual chemicals in mixtures.

OECD/OCDE

498

9. The *in vitro* RhE PT does not need to be performed with a metabolic activation system, although the RhE tissues have limited metabolic activity (21). There is no evidence at this time that any phototoxic compound would be missed in the absence of metabolic activation (22).

10. Test chemicals absorbing light in the same range as MTT formazan (colored chemicals), or test chemicals able to directly reduce the vital dye MTT (to MTT formazan) may interfere with the cell viability measurements if those chemicals persist in or on the test system at the time of the viability assessment, and may need to use adapted controls to correct for the interference (see paragraphs 59-66) in section “*Corrections for MTT-reducing Materials and Colorants*”. Alternatively, the HPLC/UPLC spectrophotometry procedure to measure MTT formazan can be used (see paragraphs 65-66).

11. Although most of the studies performed with RhE PT utilized the UVA/visible light part of the solar spectrum, some studies confirm that the RhE tissues can also tolerate UVB exposure (5) (23)(24) under controlled conditions. This is an advantage compared to most of the cell-line based assays (2) that do not tolerate the UVB part of the spectrum well (25).

12. A single testing run should be sufficient for a test chemical when the classification is unequivocal. However, in cases of borderline results, such as non-concordant results from replicate tissues, a second run should be considered, as well as a third one in case of discordant results between the first two runs. In the repeated runs, the concentrations of the test chemical may be adjusted to better capture the range of responses around the borderline or equivocal concentration(s) (see Interpretation of Results and Prediction Model for details).

13. The phototoxicity potential of a test chemical is determined by testing multiple concentrations in RhE tissues in the presence and absence of simulated sunlight. The testing of three to five concentrations in two replicates is generally sufficient to ensure obtaining acceptable test results from at least one concentration of the test chemical to make a valid prediction. Specific criteria for acceptable test results are presented with the prediction model.

PRINCIPLE OF THE TEST

14. Phototoxicity potential in the RhE PT is evaluated by the relative reduction in viability in RhE tissues exposed to the test chemical in the presence as compared to the absence of a non-cytotoxic dose of simulated sunlight.

15. The test chemical is applied topically to a three-dimensional RhE tissue, composed of human-derived epidermal keratinocytes that have been cultured to form a multilayered, highly differentiated model of the human epidermis. It consists of organized basal, spinous and granular layers, and a multilayered *stratum corneum* containing intercellular lamellar lipid layers representing main lipid classes analogous to those found *in vivo*. Accordingly, RhE tissues are ideally suited for directly modeling exposures of chemicals on native skin *in vivo* and have been validated to predict the skin irritation and corrosion hazards of chemicals and mixtures without the need for test chemical dilution (1)(26).

16. In brief, several concentrations of test chemical prepared in a vehicle are applied topically to RhE tissues and incubated at standard culture conditions (37 ± 1 °C, $5 \pm 1\%$ CO₂, $90 \pm 10\%$ RH) for 18 to 24 hours to allow penetration into the living tissue. In general, three to five concentrations are tested to ensure obtaining results from at least one concentration that meets the criteria for a valid test. A positive control and appropriate vehicle controls are also applied

OECD/OCDE

498

topically to RhE tissues and tested in parallel. Half of the tissues in each treatment group are irradiated with 6 J/cm² of simulated sunlight (+Irr) while the remaining half are held at room temperature in the dark (-Irr) (see paragraph 37 & 38 for details). After a post-exposure incubation period of 18 to 24 hours, relative viability is determined in both the irradiated (+Irr) and non-irradiated (-Irr) treatment groups by measuring the enzymatic conversion of the vital dye MTT (3-[4,5 dimethylthiazol 2 yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue (CAS number 298-93-1) into a blue formazan salt that is measured photometrically after extraction from the tissues.

17. Phototoxicity potential is determined by comparing the relative reduction in viability in each irradiated treatment group to that of the equivalent non-irradiated treatment group.

18. The experimental design is based on the pre-validation study performed by ZEBET (4)(27) and follow up-studies conducted with this protocol. The follow-up studies suggested some minor modifications that led to better reproducibility and sensitivity of the test. The updated protocol was published in 2017 (10). The procedure described in this TG is based on the updated protocol.

19. This test method can be used as a stand-alone test method to address phototoxicity, especially in cases of limited test material solubility or endpoint-compatibility issues with OECD TG 432 (2) and OECD TG 495 on ROS Assay for Photoreactivity (28). This test method can also be used in a tiered testing strategy in combination with the OECD TG 432 and/or OECD TG 495 (8)(11)(22)(29).

DEMONSTRATION OF PROFICIENCY

20. Prior to the routine use of the test method, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly classifying the six Proficiency Substances listed in **Table 1**. In situations where a listed chemical is unavailable or cannot be used for other justified reasons, another chemical for which adequate *in vivo* and *in vitro* reference data are available may be used (e.g., from the list of reference chemicals (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)) provided that the same selection criteria as described in Table 1 are applied. Using an alternative proficiency substance should be justified.

21. As part of the proficiency testing, if users are naïve to utilizing the RhE model within the testing facility, it is recommended that users verify the barrier properties of the tissues after receipt as specified by the RhE model producer. This is particularly important if tissues are shipped over long distance/time periods. However, once a test method has been successfully established and proficiency in its use has been demonstrated, such verification will not be necessary on a routine basis.

OECD/OCDE

498

Table 1. Proficiency Substances¹

Substance	CAS RN	In vivo ²	Vehicle ³	Typical phototoxicity ranges [% w/v or % v/v] (references)	
PHOTOTOXIC SUBSTANCES					
1	Chlorpromazine	69-09-0	PT	Water	0.003% – 0.01% (4)
2	Anthracene	120-12-7	PT	EtOH ⁴ or Acetone: Olive Oil (4:1)	0.01% – 0.03% (5)(30)
3	Bergamot oil ⁶	8007-75-8	PT	Oil ⁵	0.0316% – 3.16% (4)(8)
NON-PHOTOTOXIC SUBSTANCES					
4	Sodium Dodecyl Sulphate	151-21-3	NPT	Water	Non-phototoxic up to highest conc. tested (1%) (4)
5	Octyl salicylate	118-60-5	NPT	Oil ⁵	Non-phototoxic up to highest conc. tested (10%) (4)
6	4- Aminobenzoic acid (PABA)	150-13-0	NPT	Oil or EtOH	Non-phototoxic up to highest con. Tested (10%).(27)(30)

Notes: ¹ The Proficiency Substances are a subset of the substances used in the pre-validation and follow up studies and the selection is based on the following criteria; (i), the substances are commercially available; (ii), they are representative of the full range of phototoxic effects (from non-phototoxic to strong photoirritants); (iii), they have a well-defined chemical structure; (iv), they are representative of the chemical functionality used in the validation process; (v) they provided reproducible *in vitro* results across multiple testing and multiple laboratories; (vi) they were correctly predicted *in vitro*, and (vii) they are not associated with an extremely toxic profile (e.g., carcinogenic or toxic to the reproductive system) and they are not associated with prohibitive disposal costs, and (viii) results for the selected materials and protocol details are available in the literature.

² PT – Phototoxic; NPT – Non-Phototoxic (Note: In vivo classifications were derived from the validation studies of 3T: NRU PT test (OECD TG 432) and were mostly based on clinical human data as no validated *in vivo* method is available for this endpoint.)

³ Vehicles are suggested, based upon the pre-validation and follow-up study references

⁴ EtOH – Ethanol

⁵ Oil – Sesame seed oil

⁶ Variability in phototoxic response is influenced by the content of impurities, therefore we advise to use a non-purified Bergamot oil, commercially available, specifically for this reason. Non purified Bergamot oils do have significant absorption in UVA and UVB part of the spectra (8).

PROCEDURE

22. The following is a description of the components and procedures of a RhE test method for phototoxicity testing. Standard Operating Procedure (SOP) for the RhE-based tests complying with this TG is available (27). The SOP with minor technical improvements, guidance on solubility, vehicles recommendations and with information on the chemicals tested in the EpiDerm protocol has been published in detail in 2017 (10). The SOP for the RhE-based tests

OECD/OCDE

498

complying with this TG should be employed when implementing and using the test method in a laboratory.

General Test System Characterisation

23. Human keratinocytes should be used to reconstruct the epithelium. Multiple layers of viable epithelial cells (basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum) should be present under a functional *stratum corneum*. The *stratum corneum* should be multi-layered containing the essential lipid profile to produce a functional barrier with robustness to resist rapid penetration of cytotoxic benchmark chemicals (e.g., the surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and Triton®-X-100 are typically used to test barrier function). The containment properties of the RhE model should prevent the passage of material around the *stratum corneum* to the viable tissue, which would lead to poor modelling of skin exposure. The RhE tissue should be free of contamination by bacteria, viruses, mycoplasma, or fungi.

Functional Conditions

Viability

24. The assay used for quantifying viability is the MTT-assay (31). The viable cells of the RhE tissue can reduce the vital dye MTT into a blue MTT formazan precipitate which is then extracted from the tissue using isopropanol (or a similar vehicle). The optical density (OD) of the extraction vehicle alone should be sufficiently small, i.e. $OD < 0.1$. The extracted MTT formazan may be quantified using either a standard absorbance (OD) measurement or an HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure (32). The RhE model developer/supplier should ensure that each batch of the RhE model meets defined quality control criteria for the negative controls. Acceptability ranges (upper and lower limit) for the negative control OD values (in conditions described in paragraph 56) are established by the RhE model developer/suppliers and presented in **Table 2**. The RhE model user should ensure that the results of the vehicle (i.e. negative) controls meet the specific test method acceptance criteria. An HPLC/UPLC Spectrophotometry user should use the negative control OD ranges provided in **Table 2** as the acceptance criterion for the vehicle (i.e. negative) control.

Table 2. Acceptability ranges for vehicle (i.e. negative) control OD values in the MTT assay of the test methods included in this TG

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiDerm™ (EPI-200)	0.8	2.8

OECD/OCDE

498

Barrier function

25. The RhE model developer/supplier should ensure that each batch of the RhE model meets defined quality control criteria for barrier function. The barrier function may be assessed either by determination of the concentration at which a benchmark chemical (e.g., sodium dodecyl sulphate (SDS) or Triton®-X-100) reduces the viability of the tissues by 50% (IC₅₀) after a fixed exposure time, or by determination of the exposure time required to reduce cell viability by 50% (ET₅₀) upon application of the benchmark chemical at a specified, fixed concentration. The acceptability ranges for the test methods included in this TG are given in **Table 3**.

Table 3. Barrier Function QC batch release criteria of the RhE models included in this TG

	Lower acceptance limit	Upper acceptance limit
EpiDerm™ (EPI-200)	ET ₅₀ = 4.00 h	ET ₅₀ = 8.72 h

Morphology

26. Histological examination of the RhE model may be provided by the RhE model developer/supplier demonstrating human epidermis-like structure (including multilayered *stratum corneum*) if this parameter is used in the RhE model developer/supplier's QC release program.

Reproducibility

27. The RhE model developer/supplier should maintain a database of the QC release test results of the viability and barrier function tests to monitor reproducibility over time. It is recommended that the RhE model user maintain a database of the phototoxicity test method positive and vehicle (i.e. negative) control results to monitor reproducibility of test method execution over time.

Quality control (QC)

28. The RhE model should only be used if the developer/supplier demonstrates that each batch of the RhE model meets defined production release criteria, among which those for viability (paragraph 24), barrier function (paragraph 25) and morphology (paragraph 26), if applicable, are the most relevant. The relevant QC data should be provided to the test method users, so that they are able to include this information in the test report. Only phototoxicity test results produced with qualified tissues can be accepted for reliable prediction of phototoxicity.

Preparation of Test Chemical and Control Substances

29. 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 tissues be performed under conditions that would avoid photoactivation or degradation of the test chemical prior to irradiation. The maximum recommended concentration of a test chemical should not exceed 10% since test chemicals may absorb UV and act as a UV filter (10)(27).

30. The testing of three to five concentrations of a test chemical in a vehicle is generally sufficient to ensure obtaining acceptable test results from at least one concentration of the test

OECD/OCDE

498

chemical to fulfill requirements to evaluate the test results for phototoxicity potential (see paragraphs 69-71). Ideally, the concentrations of the test chemical should be selected to ensure a cytotoxicity dose response in the absence of irradiation. Guidance for selection of appropriate concentration ranges is given in the SOPs (10)(27).

31. Water soluble test chemicals are prepared in ultra-pure water or if appropriate in buffered salt solutions (e.g., Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) or Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) without phenol red). The buffer used 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.

32. Oil soluble test chemicals are prepared in sesame seed oil or other appropriate oil (e.g., mineral oil that has low UV absorption and is demonstrated to be compatible with the RhE tissues). For test chemicals of limited solubility in water and oils, pure ethanol, or a mixture of acetone:olive oil (4:1 v:v) may be used (10).

33. Other vehicles may be considered but should be evaluated prior to use for specific properties including compatibility with the RhE tissues, its ability to react with the test chemical, ability to induce phototoxicity, potential for quenching of the phototoxic effect, radical-scavenging properties and/or chemical stability in the vehicle (33). When other vehicles are used, it is recommended that a pre-testing with the selected vehicle be conducted to ensure vehicle stability and compatibility with the test system (see ANNEX 3 additional guidance).

34. Vortex mixing, sonication, and/or warming to appropriate temperatures may be used to aid solubilisation, unless the stability of the test chemical is compromised. The procedures used to prepare the test chemical dosing solutions should be documented.

35. Before any testing on the viable reconstructed human tissues is performed, it is recommended to perform the evaluation of the test substance for interference with the measured endpoint (MTT assay). These procedures are described in detail in the SOPs. If potential interference by the test substance on the MTT assay has been determined, the application of adaptive controls is recommended as described in the section "*Corrections for MTT-reducing Materials and Colorants.*"

36. A vehicle control (used as a negative control) and positive control (PC) should be tested concurrently in each run. The suggested vehicle control is either water (vehicle for water soluble materials) or sesame seed oil (vehicle for oil soluble materials), and/or other vehicles used to solubilize the test material. The suggested PC is a solution of chlorpromazine-HCl at a final concentration of 0.01% to 0.02% in water (or other aqueous buffered salt solutions such as DPBS or HBSS without phenol red). Additional concentrations can be tested to evaluate dose responses of the chlorpromazine-HCl prior to establishing the test to demonstrate proficiency (4)(10)(27).

Irradiation Conditions

37. *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* (15)(28), 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 (28). 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 2:). Furthermore, the wavelengths, irradiance

OECD/OCDE

498

doses employed, and light source equipment (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).

38. The simulation of sunlight with solar simulators is considered the preferable artificial light source. The spectral irradiance of the filtered solar simulator should be close to that of outdoor daylight (34). Both xenon arcs and (doped) mercury-metal halide arcs are used as solar simulators (30). 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 UVB wavelengths (Annex 2). Because cell culture plastic materials contain UV stabilisers, the transmitted spectrum should be measured through the same type of 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 (34). 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 pre-validation and follow-up studies with the EpiDerm™ model is given in (10)(30)(23). See also ANNEX 2: Figure 1.

39. *Dosimetry*: The intensity of light (irradiance) should be regularly checked before each phototoxicity test using a suitable calibrated broadband UVA-meter. Irradiance should be measured through the same type of plate lid as will be used in the assay.

40. An irradiance dose of approximately 6 J/cm² (as measured in the UVA range) was determined to be non-cytotoxic in the RhE tissues and sufficiently potent to excite chemicals to elicit phototoxic reactions (4)(10)(30). To achieve 6 J/cm² within a time period of 60 minutes, irradiance was adjusted to 1.7 mW/cm² of UVA/visible light (see ANNEX 2: Figure 2). Alternate exposure times and/or irradiance values may be used to achieve 6 J/cm² using the formula:

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

41. The RhE tissue model is tolerant to UVB irradiation (5)(23)(24) and inclusion of UVB irradiation may be appropriate in some cases (e.g., when absorption for the test chemical of interest is exclusively in the UVB wavelength region). The presence of the UVB portion of the spectra should be monitored and reported in the final report along with any changes in irradiance.

42. Similarly, if 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. A functional check should be performed by testing the proficiency chemicals described in Table 1 and also presented in Figure 2.

43. *Radiation sensitivity of the cells*: A UVA-sensitivity experiment should be performed once the test is newly set up in a laboratory. A brief description of the method and expected outcome is given in the SOPs. The viability of the irradiated tissues exposed to 6 J/cm² should be ≥ 80% relative to the tissues that were not irradiated.

OECD/OCDE

498

Test procedure

44. *Tissue conditioning:* Upon receipt of the RhE tissues, examine all kit components for integrity. Under sterile conditions, transfer tissues to 6-well plates containing 0.9 mL medium/well. Place the plates into the incubator at standard culture conditions (37 ± 1 °C, $5 \pm 1\%$ CO₂, $90 \pm 10\%$ RH) for minimum of 60 minutes. Pre-incubation can be extended overnight, however the medium should be exchanged after the first 60 minutes.
45. After a minimum of 60 minutes pre-incubation, the tissues in the 6-well plates will be removed from the incubator and the medium under the tissues will be exchanged with warmed (37 °C) fresh assay medium. The tissues may be dosed immediately, or placed back into the incubator until dosing is initiated. For each treatment condition or treatment group, four tissues will be treated such that two tissues are used in the cytotoxicity part of the assay (treated in the absence of irradiation) and two are used in the phototoxicity part of the assay (treated in the presence of irradiation).
46. *Dose Application:* The RhE tissues are treated topically. For solutions in water or aqueous buffer, 50 µL of dosing solutions are applied topically on the RhE tissue and gently spread, if necessary, with a sterile bulb-headed Pasteur pipette (a Pasteur pipette which has been flame-melted to create a small round bulb at one end), or similar device. For solutions in oil, 25 µL of dosing solutions are applied topically on the RhE tissue and gently spread, if necessary, with a sterile bulb-headed Pasteur pipette. If the spreading is not sufficient, consider applying a sterile nylon mesh (circular shape) topically on the tissue as an additional spreading tool (which acts by capillary action to cover the tissue surface). For vehicles that may be irritating to skin, the dosing volume should be limited to avoid vehicle cytotoxicity. For example, dosing solutions in ethanol, or acetone – olive oil mixture (4:1) should not exceed 20 to 25 µL, since higher volumes may lead to cytotoxicity.
47. Once dosed, tissues are placed back into the incubator and incubated overnight (18 to 24 hours) at standard culture conditions.
48. On the following day, transfer the tissues into new 6-well plates pre-filled with 0.9 mL of buffered solution (e.g., DPBS or HBSS without phenol red) or 24-well plates pre-filled with 0.3 mL of buffered solution. The use of a phenol-red-free buffered salt solution is recommended since irradiation in cell culture medium may lead to increased variability and production of cytotoxic photo-products (35).
49. *Irradiation:* Irradiate the +Irr plates (covered with lids) for 60 minutes with 1.7 mW/cm² (or equivalent) at room temperature to achieve 6 J/cm² of simulated sunlight. If the light source generates excess heat and induces condensation under the plate lids, ventilate the plates with a fan. Place the -Irr plates in the dark (e.g., in a box) at room temperature, preferably in the same exposure room as for the tissues being irradiated. If a mesh was used during dosing, the mesh should be carefully removed (for example using fine forceps) prior to the irradiation/dark exposures. Prepare new 6-well plates containing 0.9 mL of warmed (37 °C) fresh assay medium per well.
50. After the irradiation is completed, use a wash bottle with sterile CMF-DPBS and rinse each tissue. About 20 washes are needed to effectively remove the materials from the tissue surface. The procedures used to remove the dosing dilutions should be documented and presented in the final report. Transfer all washed inserts to the new plates containing fresh media. The surface of each tissue should be carefully dried using a sterile cotton tipped swab.

OECD/OCDE

498

51. In cases where the test material characteristics may impede or block the irradiation (e.g., dark colored or opaque materials), the dosing dilutions should be removed prior to the irradiation or dark exposure conditions. Under the test conditions, test chemical that permeates into the RhE tissue during the 18 to 24-hour exposure period is bioavailable within the tissue at the time of irradiation. The 18 to 24 hour exposure time prior to irradiation is notably longer than the exposure times applied in TG 439 for Skin Irritation Test (1) and accordingly ensures sufficient time for test chemical to diffuse into the tissue model nearest the target cells where reactive phototoxic species may be induced at the time of irradiation. Sterile cotton swabs soaked in a rinse medium (e.g., DPBS without Ca^{++} & Mg^{++} (CMF-DPBS)) may be used to remove the test chemical prior to the UVA/visible light or dark exposure conditions. Justification for removing the test material doses prior to irradiation should be presented in the study report.

52. Incubate the tissues overnight (18 to 24 hours) at standard culture conditions.

53. *MTT Viability Assay*: A 1 mg/mL MTT solution will be prepared, warmed at 37 °C, and 300 µL pipetted into the appropriate wells of a labeled 24-well plate. After the 18 to 24-hour incubation, the tissue inserts are removed from the 6-well plates, the bottom of the inserts blotted on sterile gauze or paper towels, and transferred into the appropriate wells of the labeled 24-well MTT plates. The 24-well plates are incubated at standard culture conditions for 3 hours.

54. After the MTT incubation, the inserts are removed from the 24-well plates, the bottom of the inserts blotted on sterile gauze or paper towels, and transferred into the appropriate wells of new labeled 24-well plates. The tissues are extracted in 2 mL of isopropanol (extraction solution). The 24-well plates will be sealed (e.g., with Parafilm) and the formazan extracted for at least 2 hours at room temperature with gentle shaking on a plate shaker. Alternatively, overnight extraction is also possible. The plates are sealed as described above and extracted at room temperature in the dark, without shaking. Before sampling the extracts, shake for at least 15 minutes on a plate shaker.

55. After the extraction is completed, the tissue inserts may either be lifted out of the well and the extraction solution decanted into the well from which the insert was taken, or the tissues may be pierced (e.g., with a 20 gauge injection needle) and the extraction allowed to drain into the well from which the insert was taken (the insert can be discarded). The extract will be mixed by pipetting “up and down” at least 3 times until the extraction solution is homogenous. For each tissue, 200 µL aliquots of the extraction solution are pipetted into a labeled 96-well flat bottom microtiter plate. Finally, 200 µL aliquots of isopropanol will be added to the wells designated for the blanks.

56. The optical density (OD) of the 96-well plate will be determined using a microtiter-plate spectrophotometer using a wavelength between 540 and 595 nm, preferably at 570 nm (with a filter band pass of maximum \pm 30 nm). No reference filter reading is required. Alternatively, the absorbance of the formazan extraction samples can be determined using an HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure (32).

Cell Viability Calculations

57. *Viability Calculation*. The OD values obtained with each test chemical can be used to calculate the percentage of viability relative to the vehicle (i.e. negative) control, which is set to 100%. In case HPLC/UPLC-spectrophotometry is used, the percent tissue viability is calculated as percent MTT formazan peak area obtained with living tissues exposed to the test chemical relative to the MTT formazan peak obtained with the concurrent vehicle (i.e. negative) control.

OECD/OCDE

498

58. The relative viability (or % of Control) of each of the test chemical or positive control-treated tissues (+Irr) will be calculated relative to the mean of the appropriate vehicle (i.e., negative) control-treated tissues (+Irr). Similarly, the relative viability (or % of Control) of the test article or positive control-treated tissues (-Irr) will be calculated relative to the mean of the appropriate vehicle (i.e. negative) control-treated tissues (-Irr). The individual % of Control values are averaged to calculate the mean % of Control (viability) per concentration for each of the +Irr and -Irr exposures. The following equation will be used:

$$\% \text{ of Control} = \frac{\text{Corrected OD of each Test Chemical or Positive Control Treated}}{\text{Corrected OD of Negative/Solvent Control}} \times 100$$

Corrections for MTT-reducing Materials and Colorants

59. Optical properties of the test chemical or its chemical action on MTT (e.g., chemicals may prevent or reverse the colour generation as well as cause it) may interfere with the assay leading to a false estimate of viability. This may occur when a specific test chemical is not completely removed from the tissue by rinsing or when it penetrates the epidermis. If a test chemical acts directly on the MTT (e.g., MTT-reducer), is naturally coloured, or becomes coloured during tissue treatment, additional controls should be used to detect and correct for test chemical interference with the viability measurement. Detailed description of how to correct direct MTT reduction and interferences by colouring agents is available in the SOPs for the OECD Validated test methods on skin and eye irritation and corrosion (5)(25).

60. To identify direct MTT reducers, each test chemical, at the highest test concentration, should be added to freshly prepared MTT solution. If the MTT mixture containing the test chemical turns blue/purple, the test chemical is presumed to directly reduce MTT and a further functional check on non-viable RhE tissues should be performed, independently of using the standard absorbance (OD) measurement or an HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure. This additional functional check employs killed tissues that possess only residual metabolic activity but absorb the test chemical in a similar way as viable tissues. Each MTT reducing test chemical is applied on at least two killed tissue replicates (e.g., one tissue to be irradiated and one tissue exposed under the dark conditions) at the highest test concentration, which undergo the entire testing procedure to generate a non-specific MTT reduction (NSMTT).

61. A single NSMTT control is sufficient per test chemical regardless of the number of independent tests/runs performed. The true tissue viability is then calculated as the percent tissue viability obtained with living tissues exposed to the MTT reducer minus the percent non-specific MTT reduction obtained with the killed tissues exposed to the same MTT reducer, calculated relative to the vehicle (i.e. negative) control run concurrently to the test being corrected (%NSMTT).

62. To identify potential interference by coloured test chemicals or test chemicals that become coloured when in contact with water or isopropanol, and to determine the need for additional controls, analysis of the test chemical in water (environment during exposure) and/or isopropanol (extracting solution) should be performed. If the test chemical in water and/or isopropanol absorbs light in the range of 570 ± 30 nm, additional colorant controls should be used. Alternatively, an HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure should be used in which case these controls are not required.

OECD/OCDE

498

63. When performing the standard absorbance (OD) measurement, each interfering coloured test chemical is applied on at least two viable tissues (e.g., one tissue to be irradiated and one tissue exposed under the dark conditions) at the highest test concentration, which undergoes the entire testing procedure but is incubated with medium instead of MTT solution during the MTT incubation step to generate a non-specific colour (NSCliving) control. The NSCliving control needs to be performed concurrently to the testing of the coloured test chemical and in case of multiple testing, an independent NSCliving control needs to be conducted with each test performed (in each run) due to the inherent biological variability of living tissues. The true tissue viability is then calculated as the percent tissue viability obtained with living tissues exposed to the interfering test chemical and incubated with MTT solution minus the percent non-specific colour obtained with living tissues exposed to the interfering test chemical and incubated with medium without MTT, run concurrently to the test being corrected (%NSCliving).

64. It is important to note that non-specific MTT reduction and non-specific colour interferences may increase the readouts of the tissue extract above the linearity range of the spectrophotometer. On this basis, each laboratory should determine the linearity range of their spectrophotometer with MTT formazan (CAS # 57360-69-7) from a commercial source before initiating the testing of test chemicals for regulatory purposes. The standard absorbance (OD) measurement using a spectrophotometer is appropriate to assess direct MTT-reducers and colour interfering test chemicals when the ODs of the tissue extracts obtained with the test chemical without any correction for direct MTT reduction and/or colour interference are within the linear range of the spectrophotometer.

65. For coloured test chemicals which are not compatible with the standard absorbance (OD) measurement due to strong interference with the MTT assay, the alternative HPLC/UPLC-spectrophotometry procedure to measure MTT formazan may be employed. The HPLC/UPLC-spectrophotometry system allows for the separation of the MTT formazan from the test chemical before its quantification (32). For this reason, NSCliving or NSCKilled controls are never required when using HPLC/UPLC spectrophotometry, independently of the chemical being tested. NSMTT controls should nevertheless be used if the test chemical is suspected to directly reduce MTT or has a colour that impedes the assessment of the capacity to directly reduce MTT. When using HPLC/UPLC-spectrophotometry to measure MTT formazan, the percent tissue viability is calculated as percent MTT formazan peak area obtained with living tissues exposed to the test chemical relative to the MTT formazan peak obtained with the concurrent vehicle (i.e. negative) control. For test chemicals able to directly reduce MTT, true tissue viability is calculated as the percent tissue viability obtained with living tissues exposed to the test chemical minus %NSMTT. Finally, it should be noted that direct MTT-reducers that may also be colour interfering, which are retained in the tissues after treatment and reduce MTT so strongly that they lead to ODs (using standard OD measurement) or peak areas (using UPLC/HPLC-spectrophotometry) of the tested tissue extracts that fall outside of the linearity range of the spectrophotometer cannot be assessed, although these are expected to occur in only very rare situations.

66. HPLC/UPLC-spectrophotometry may be used also with all types of test chemicals (coloured, non-coloured, MTT-reducers and non-MTT reducers) for measurement of MTT formazan. Due to the diversity of HPLC/UPLC-spectrophotometry systems, qualification of the HPLC/UPLC-spectrophotometry system should be demonstrated before its use to quantify MTT formazan from tissue extracts by meeting the acceptance criteria for a set of standard qualification parameters based on those described in the U.S. Food and Drug Administration guidance for industry on bio-analytical method validation (36).

OECD/OCDE

498

Criteria for a Valid Test

67. The following acceptance criteria should be met for a valid test run:
- The difference in the relative viability values between the two replicate tissues treated with the vehicle (i.e. negative) or positive controls should not exceed 20 %.
 - The viability of the vehicle (i.e. negative) controls tested in the absence of irradiation should fall within the acceptance range presented in **Table 2**.
 - The viability of the vehicle (i.e. negative) controls tested in the presence of irradiation should result in a viability of $\geq 80\%$ when compared to the vehicle (i.e. negative) controls tested in the absence of irradiation; this control demonstrates absence of excessive radiation sensitivity of the cells, as described in paragraph 43.
 - The positive control should result in a positive prediction.
68. The following criteria should be met for each of the test substance treatment groups to be evaluable for phototoxicity potential:
- The viability of the test substance-treated tissues in the absence of irradiation should be sufficiently high (for example, $>35\%$ viability) to ensure ability to make both phototoxic and not phototoxic predictions at the maximum recommended concentration of 10% (100 mg/mL), or when the maximum concentrations are limited by cytotoxicity, at the highest tolerated dose(s).

Interpretation of Results and Prediction Model

69. A chemical is predicted to be **phototoxic** (or to have phototoxicity potential) if the relative viability values for one or more test concentrations treated in the presence of irradiation result in a decrease in viability $\geq 30\%$ when compared to the relative viability values for the same concentrations treated in the absence of irradiation.
70. A chemical is predicted to be **not phototoxic** (or to not have phototoxicity potential) if none of the relative viability values for the test concentrations treated in the presence of irradiation result in a decrease in viability $\geq 30\%$ when compared to the relative viability values for the same concentrations treated in the absence of irradiation.
71. If none of the test concentrations result in a phototoxic prediction and at least one of the concentrations falls within 5% of the cutoff value, and/or non-concordant results from replicate tissues are obtained, a second run should be considered, as well as a third one in case of discordant predictions between the first two runs. In this case, it is recommended to consider a concentration range that is closer to the concentration in which the potentially phototoxic outcome was observed.

OECD/OCDE

498

DATA AND REPORTING:

Data

72. *Quality and quantity of data.* Appropriate concentrations which capture the concentration-responses in the presence and absence of irradiation should be selected to allow meaningful analysis of the data. Equivocal, borderline, or unclear results should be clarified by further testing. In such cases, modification of experimental conditions (e.g., concentrations tested) should be considered.

73. For each run, data from individual replicate tissues (e.g., OD values and calculated percentage cell viability data for each test chemical, including classification) should be reported, including data from repeat experiments, as appropriate. In addition, Viability means \pm Difference between the duplicate tissues for each run should be reported. Observed interactions with MTT reagent and coloured test chemicals should be reported for each tested chemical.

Test Report

74. The test report should include the following information:

Test Chemical and Control Substances:

- Mono-constituent substance: chemical identification, such as IUPAC or CAS name, CAS number, SMILES or InChI code, structural formula, purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc.;
- Multi-constituent substance, UVCB and mixture: characterised as far as possible by chemical identity (see above), quantitative occurrence and relevant physicochemical properties of the constituents;
- Physical appearance, water solubility, and any additional relevant physicochemical properties;
- Source, lot number if available;
- Preparation of the test chemical/control substance prior to testing, if applicable (e.g., warming, grinding);
- Stability of the test chemical, expiration date, or date for re-analysis if known;
- Storage conditions;
- Vehicle (justification for the choice of vehicle; solubility of the test chemical in vehicle)

RhE model and protocol used (and rationale for the choice, if applicable):

- RhE model used (including batch number);
- Complete supporting information for the specific RhE model used including its performance. This should be provided as a Certificate of Analysis or QC release report by the tissue developer/supplier and may include, but is not limited to;
 - i) Viability;
 - ii) Barrier function;
 - iii) Morphology;
 - iv) Quality controls (QC) of the model

OECD/OCDE

498

- Reference to historical data of the model. This should include, but is not limited to acceptability of the QC data with reference to historical batch data;
- Statement of proficiency in performing the test method by testing of the proficiency substances.

Test Conditions:

- Calibration information for measuring device (e.g., spectrophotometer), wavelength and band pass (if applicable) used for quantifying MTT formazan, and linearity range of measuring device; Description of the method used to quantify MTT formazan;
- Description of the qualification of the HPLC/UPLC-spectrophotometry system, if applicable;
- Light source – irradiation conditions:
 - rationale for selection of the light source used;
 - manufacturer and type of light source and radiometer;
 - full 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/cm^2 ;
 - duration of the irradiation exposure;
 - UVA dose (irradiance x time), expressed in J/cm^2 ;
 - temperature of cell cultures during irradiation and cell cultures concurrently kept in the dark.

Test Procedure:

- Details of the test procedure used (including washing procedures used after exposure period);
- Doses of test chemical and control substances used;
- Rationale for selection of concentrations of the test chemical used in the presence and in the absence of irradiation;
- Type and composition of vehicle/vehicle;
- Duration and temperature of exposure and post-exposure incubation period;
- Indication of controls used for direct MTT-reducers and/or colouring test chemicals, if applicable;
- Number of tissue replicates used per test chemical and controls (PC, vehicle (i.e. negative) control, and NSMTT, and NSCliving, if applicable);
- Description of decision criteria/prediction model applied based on the RhE model used;
- Description of any modifications to the test procedure (including washing procedures).

Run and Test Acceptance Criteria:

- Acceptance criteria for variability between tissue replicates for positive and vehicle (i.e. negative) controls;
- Acceptance criteria for vehicle (i.e. negative) control OD values;

OECD/OCDE

498

- Acceptance criteria for the viability of the vehicle (i.e. negative) controls in the presence of irradiation relative to those in the absence of irradiation;
- Acceptance criteria for the positive control.

Results:

- Tabulation of data for individual test chemical for each run and each replicate measurement including OD or MTT formazan peak area, percent tissue viability, mean percent tissue viability and difference between tissues;
- If applicable, results of controls used for direct MTT-reducers and/or colouring test chemicals including OD or MTT formazan peak area, %NSMTT, %NSCliving, final corrected relative viability;
- Results obtained with the test chemical(s) and control substances in relation to the defined run and test acceptance criteria;
- Description of other effects observed;
- The derived classification with reference to the prediction model/decision criteria used

*Discussion of the results.**Conclusions.*

OECD/OCDE

498

LITERATURE

- 1) OECD. (2020). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 439): In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>
- 2) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 432): In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071162-en-189228>
- 3) Liebsch, M., Barrabas, C., Traue, D. and Spielmann, H. (1997) Development of a new in vitro test for dermal phototoxicity using a model of reconstituted human epidermis (EpiDerm™)] [Article in German], *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 14(4), pp. 165-174. doi: 10.14573/altex.1997.4.165.
- 4) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Gerberick, G.F., Cruse, L., Diembeck, W., Pfannenbecker, U., Spieker, J., Holzhütter, H.G., Brantom, P., Aspin, P., and Southee, J. (1999). In *Alternatives to Animal Testing II: Proceedings of the second international scientific conference organised by the European Cosmetic Industry*, Brussels, Belgium (ed. D. Clark, S. Lisansky & R. Macmillan), pp. 160–166. Newbury, UK: CPL Press
- 5) Jones, P., King, A., Lovell, W., and Earl, L. (1999) Phototoxicity testing using 3-D reconstructed human skin models. In: Clark D, Lisansky S, Macmillan R, editors. *Alternatives to animal testing II: proceedings of the second international scientific conference organised by the European cosmetic Industry*, Brussels, Belgium. Newbury, UK: CPL Press; 1999. p. 138–41.
- 6) Jirová D, Kejlová K, Bendová H, Ditrichová D, Mezulániková M (2005) Phototoxicity of bituminous tars-correspondence between results of 3T3 NRU PT, 3D skin model and experimental human data. *Toxicology in Vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA*. 19(7):931-934. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.013.
- 7) Kandarova, H. (2006). *Evaluation and Validation of Reconstructed Human Skin Models as Alternatives to Animal Tests in Regulatory Toxicology* - PhD Thesis. http://edocs.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000002248
- 8) Kejlová, K., Jirová, D., Bendová, H., Kandárová, H., Weidenhoffer, Z., Kolářová, H., and Liebsch, M. (2007). Phototoxicity of Bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. *Toxic. in Vitro* 21, p. 1298–1303
- 9) Kejlová K, Jirová D, Bendová H, Gajdoš P, Kolářová H. (2010) Phototoxicity of essential oils intended for cosmetic use. *Toxicol In Vitro*. 24(8):2084-9. doi: 10.1016/j.tiv.2010.07.025. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20688147.
- 10) Kandárová, H., and Liebsch, M. (2017) The EpiDerm™ Phototoxicity Test (EpiDerm™ H3D-PT). Book Chapter In: *Alternatives for Dermal Toxicity Testing*, Editors: Chantra Eskes, Erwin van Vliet, Howard I. Maibach. Springer. 483-503.
- 11) Pape, Wolfgang & Balls, Michael & M., Csato & O., De & J., Dupuis & Gerberick, Frank & W.W., Lovell & Liebsch, Manfred & Pfannenbecker, Uwe & M., Potthast & Spielmann, Horst &

© OECD, (2023)

OECD/OCDE

498

Steiling, Winfried. (1999). A Proposed Strategy for Testing Phototoxicity by Stepwise Use of Validated In Vitro Methodologies: The COLIPA Task Force on Phototoxicity In Vitro. COLIPA Symposium on Alternative methods 24-25 March 1999. Brussels, Belgium. Page 15-16.

12) Liebsch M. (2006) A feasibility study on whether the prevalidated human 3-D Epidermis model in vitro phototoxicity test (EpiDerm-PT), could successfully be used for phototoxic potency testing. Interm Report. Contract No. 19868-31 pages. Available at: <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm1997-02>

13) Lovell, W.W. (1993). A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.

14) 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.

15) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Saporá, O., and Sladowski, D. (1994). In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop. ATLA, 22, 314-348.

16) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

17) OECD (1981). OECD Test Guideline for the Testing of Chemicals (No. 101): UV-VIS Absorption Spectra. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264069503-en>

18) Bauer, D., Averett, L.A., De Smedt, A., Kleinman, M.H., Muster, W., Pettersen, B.A., and Robles, C. (2014). Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. Regul Toxicol Pharmacol, 68: 70-75.

19) ICH S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Guidance for Industry. January 2015. <https://www.fda.gov/media/85076/download>

20) 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

21) Oesch, F., Fabian, E., Guth, K., and Landsiedel, R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. Arch Toxicol. 2014; 88(12):2135–2190. doi:10.1007/s00204-014-1382-8

22) Ceridono, M., Tellner, Par, Bauer, D., Barroso, J., Alépée, N., Corvi, R., De Smedt, A., Fellows, M.D., Gibbs, N.K., Heisler, E., Jacobs, A., Jirova, D., Jones, D., Kandárová, H., Kasper, P., Akunda, J.K., Krul, C., Learn, D., Liebsch, M., Lynch, A.M., Muster, W., Nakamura, K., Nash, J.F., Pfannenbecker, U., Phillips, G., Robles, C., Rogiers, V., Van De Water, F., Liminga, U.W., Vohr, H.W., Wattrelos, O., Woods, J., Zuang, V., Kreysa, J., and 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.

OECD/OCDE

498

23) Jones, P.A., Lovell, W.W., King, A.V., Earl, L.K (2001) In vitro testing for phototoxic potential using the EpiDerm™ 3-D reconstructed human skin model. *Toxicology Methods* 11, 1–19.

24) Jones, P.A, King, A.V., Earl, L.K., Lawrence, R.S (2003) An assessment of the phototoxic hazard of a personal product ingredient using in vitro assays. *Toxicology in Vitro* 17 (2003) 471–480.

25) 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., Pothast, 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.

26) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 431): In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>

27) Liebsch M.(1997). Standard Operation Procedure. EpiDerm™ Phototoxicity Assay (model: Epi-200). Final version. 5 Novemb. 97. 28 p Annex 3 to the Final Report. Available via <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm1997-02>

28) OECD (2019). OECD Guideline for the Testing of Chemicals (No. 495): ROS (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/915e00ac-en>

29) EMA, (2015). ICH Guidance S10 on Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/752211/2012 Committee for Human Medicinal Products. Available at https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-5_en.pdf

30) Lišková, A., Letašiová, S., Jantová, S., Brezová, V., and Kandarová, H. (2020) "Evaluation of phototoxic and cytotoxic potential of TiO₂ nanosheets in a 3D reconstructed human skin model", *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*, 37(3), pp. 441-450. doi: 10.14573/altex.1910012.

31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55- 63.

32) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. (2015) Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxic. In vitro.* 29(4), 741-761.

33) Kandarova, H and Liebsch, M (2017) 'The EpiDerm™ Phototoxicity Test (EpiDerm™ H3D-PT, Chapter 35), C, Eskes., E. van Vliet., H.I., H.I. Maibach (Eds), *Alternative for Dermal Toxicity Testing*, Springer International Publishing, Page 483 – 503

OECD/OCDE**498**

- 34) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.
- 35) Stoen, JD, and Wang, RJ. Effect of near-ultraviolet and visible light on mammalian cells in culture II. Formation of toxic photoproducts in tissue culture medium by blacklight. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974;71(10):3961-3965. doi:10.1073/pnas.71.10.3961
- 36) FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May2001. Available at URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- 37) Spielmann, H., Billa, M., Dupuis, J., Pape, W.J., 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., 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. Toxicology in Vitro 12 (1998) 305 - 327
- 38) Liebsch M.(1998). Prevalidation of the "EpiDerm™ Phototoxicity Test" - FINAL REPORT (Phases I, II,III). Available via <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm1997-02>

OECD/OCDE

498

ANNEX 1: Definitions

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more chemicals in which they do not react (14).

Irradiance: the intensity of ultraviolet (UV) or visible light incident on a surface, measured in W/m² or mW/cm².

Dose of light: the quantity (= intensity x time) of ultraviolet (UV) or visible radiation incident on a surface, expressed in Joules (= W x s) per surface area, e.g., J/m² or J/cm².

UV light wavebands: the designations recommended by the CIE (Commission Internationale de L'Éclairage) 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.

Relative tissue viability: tissue viability expressed in relation to vehicle (i.e. 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., vehicle, temperature, and wavelength) and reflects the efficiency with which a molecule can absorb a photon (typically expressed as L·mol⁻¹·cm⁻¹).

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.

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with “concordance” to mean the proportion of correct outcomes of a test method (20).

Cell viability: Parameter measuring total activity of a cell population e.g., as ability of cellular mitochondrial dehydrogenases to reduce the vital dye MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue), which depending on the endpoint measured and the test design used, correlates with the total number and/or vitality of living cells.

Chemical: means a substance or a mixture.

Concordance: This is a measure of test method performance for test methods that give a categorical result, and is one aspect of relevance. The term is sometimes used interchangeably with accuracy, and is defined as the proportion of all chemicals tested that are correctly classified as positive or vehicle (i.e. negative). Concordance is highly dependent on the prevalence of positives in the types of test chemical being examined (20).

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

IATA: Integrated Approach on Testing and Assessment

OECD/OCDE

498

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue tetrazolium bromide.

Negative Control: see Vehicle Control

NSKilled: Non-Specific Colour in killed tissues.

NSCliving: Non-Specific Colour in living tissues.

NSMTT: Non-Specific MTT reduction.

Performance standards (PS): Standards, based on a validated test method, that provide a basis for evaluating the comparability of a proposed test method that is mechanically and functionally similar. Included are; (i) essential test method components; (ii) a minimum list of Reference Chemicals selected from among the chemicals used to demonstrate the acceptable performance of the validated test method; and (iii) the comparable levels of accuracy and reliability, based on what was obtained for the validated test method, that the proposed test method should demonstrate when evaluated using the minimum list of Reference Chemicals (20).

Positive Control (PC): a replicate containing all components of a test system and treated with a substance known to induce a positive response. To ensure that variability in the positive control response across time can be assessed, the magnitude of the positive response should not be excessive.

Relevance: Description of relationship of the test to the effect of interest and whether it is meaningful and useful for a particular purpose. It is the extent to which the test correctly measures or predicts the biological effect of interest. Relevance incorporates consideration of the accuracy (concordance) of a test method (20).

Reliability: Measures of the extent that a test method can be performed reproducibly within and between laboratories over time, when performed using the same protocol. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility (20).

Replacement test: A test which is designed to substitute for a test that is in routine use and accepted for hazard identification and/or risk assessment, and which has been determined to provide equivalent or improved protection of human or animal health or the environment, as applicable, compared to the accepted test, for all possible testing situations and chemicals (20).

Run: A run consists of one or more test chemicals tested concurrently with a vehicle (i.e. negative) control and with a PC.

Sensitivity: The proportion of all positive/active test chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results, and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (20).

Vehicle Control: A replicate containing all components of a test system except for the test chemical, but including the vehicle that is used. It is used to establish the baseline response for the samples treated with the test chemical dissolved in the same vehicle, and in this Test

OECD/OCDE

498

Method is used as a negative control in the data analyses. This sample is processed with test chemical-treated samples and other control samples.

Specificity: The proportion of all negative/inactive test chemicals that are correctly classified by the test. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (20).

Test chemical: is the term “test chemical” is used to refer to what is being tested.

UPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography.

UVCB: substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials

OECD/OCDE

498

ANNEX 2: An example of spectral power distribution of the light source and the irradiation sensitivity of RhE

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

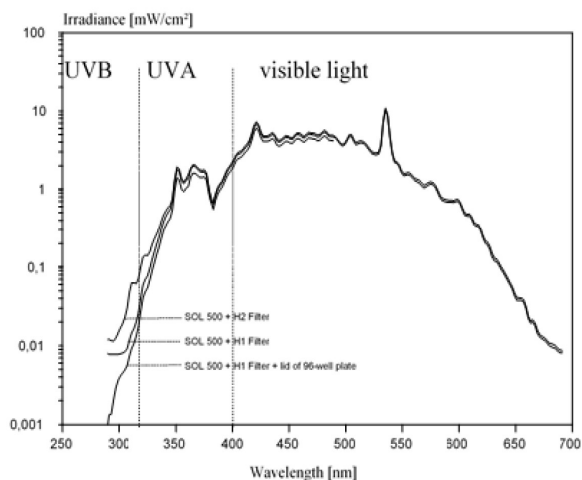
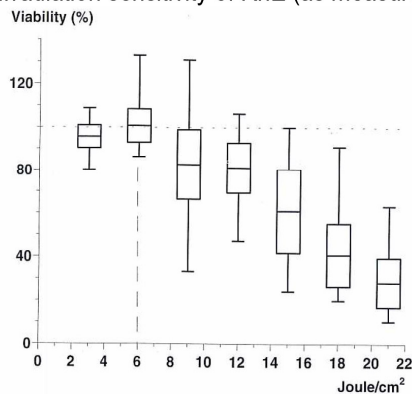
Source: Spielmann, H. *et al* (1998) (37)

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 as well as pre-validation of the EpiDerm Phototoxicity test and in most of the follow-up studies. 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 photohemolysis 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.

Figure 2. Irradiation sensitivity of RhE (as measured in the UVA range)



© OECD, (2023)

OECD/OCDE

498

Source: Liebsch *et al* (1998) (38)

This figure presented in Liebsch *et al* (1998) (38) shows the responses of tissues exposed to increasing concentrations of UVA irradiation relative to non-irradiated tissues. Relative viability was determined using the MTT conversion assay. Each box represents the mean of 12 tissues evaluated over four independent experiments. The tissues tolerated a dose of 6 J/cm^2 without excess cytotoxic effects. The dose is 1.7 mW/cm^2 (of the UVA), and with an irradiation time of 10 min is resulting to in 1J.

OECD/OCDE

498

ANNEX 3: Considerations in the selection of test chemical vehicles

Vehicles / vehicles:

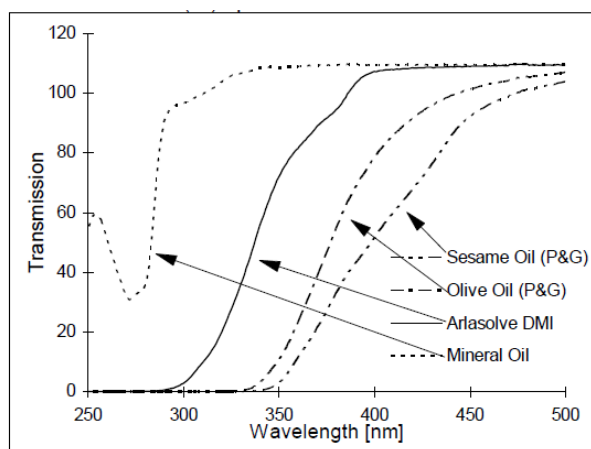
During the development and pre-validation study (3)(38), sesame seed oil was chosen as a vehicle and vehicle for chemicals which could not be sufficiently dissolved in water. Several other vehicles were investigated by the other laboratories participating in the pre-validation (Figure 3), but the sesame seed oil was chosen for the final experiments. In addition to oily vehicles, ethanol and a mixture of acetone:olive oil were suggested for materials that could not be readily solubilised in water or oil (5)(30).

It is of importance to select a vehicle that will sufficiently transmit the full spectrum of the simulated sunlight (i.e., the vehicle should not show appreciable absorption within the simulated sunlight spectrum). Furthermore, the recommended dosing volume of 50 μL should not be exceeded, since excessive volumes of vehicle/vehicle on the tissue surface may create a photo-protective layer.

Furthermore, the biological response of the 3D tissues to the alternative vehicle/vehicle should be evaluated. The alternative vehicle/vehicle should not cause decrease of tissue viability below 70% of water treated tissues.

The photopotency (i.e. the phototoxic strength) of chemicals may be modulated by the vehicle/vehicle as demonstrated in experiments obtained for Chlormazine in oily and aqueous solutions (3) or with Anthracene tested in oily and ethanolic solutions (3)(30).

Figure 3. Absorption / transmission (%) spectra of three oils and DMI



Source: Liebsch, M., (1998) (38)

OECD/OCDE

442D

Annex: DEFINITIONS

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of "relevance." The term is often used interchangeably with "concordance", to mean the proportion of correct outcomes of a test method (3).

AOP (Adverse Outcome Pathway): sequence of events from the chemical structure of a target chemical or group of similar chemicals through the molecular initiating event to an in vivo outcome of interest (2).

ARE: Antioxidant response element (also called EpRE, electrophile response element), is a response element found in the upstream promoter region of many cytoprotective and phase II genes. When activated by Nrf2, it mediates the transcriptional induction of these genes.

CV: Cell viability

Coefficient of variation: a measure of variability that is calculated for a group of replicate data by dividing the standard deviation by the mean. It can be multiplied by 100 for expression as a percentage.

CV75: The estimated concentration resulting in 75% cell viability.

EC1.5: Interpolated concentration resulting in a 1.5 fold luciferase induction.

Fold luciferase activity induction: Represents the ratio of luminescence of treated cells (minus blank) over the luminescence of the cells exposed to the concurrent solvent/vehicle control (minus blank).

IC30: Concentration effecting a reduction of cellular viability by 30%.

IC50: Concentration effecting a reduction of cellular viability by 50%.

Hazard: Inherent property of an agent or situation having the potential to cause adverse effects when an organism, system or (sub) population is exposed to that agent.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): A structured approach used for hazard identification (potential), hazard characterisation (potency) and/or safety assessment (potential/potency and exposure) of a chemical or group of chemicals, which strategically integrates and weights all relevant data to inform regulatory decision regarding potential hazard and/or risk and/or the need for further targeted and therefore minimal testing.

Imax: Maximal induction factor of luciferase activity compared to the solvent (negative) control measured at any test chemical concentration.

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, is a sensor protein that can regulate the Nrf2 activity. Under un-induced conditions the Keap1 sensor protein targets the Nrf2 transcription factor for ubiquitinylation and proteolytic degradation in the proteasome. Covalent modification of the reactive cysteine residues of Keap 1 by small molecules can lead to dissociation of Nrf2 from Keap1 (4) (5) (6).

Mixture: A mixture or a solution composed of two or more substances in which they do not react (1).

“화장품 등 광독성 동물대체시험법
(인체피부모델을 이용한 광독성시험법)
가이드라인(민원인 안내서)”

발행일 2024년 3월
발행인 식품의약품안전평가원장
편집위원장 독성평가연구부장 오재호
편집위원 이종권, 김주환, 강남희, 길가애, 차민희
문의처 Tel : 043-719-5502, 5506
주소 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, 신분보호조치** 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