OECD/OCDE

2023/07/04

試験ガイドライン No.498

In vitro 皮膚吸収試験法

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません**。本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。
本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。
This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2021), Test No. 498: In vitro Phototoxicity: Reconstructed Human Epidermis Phototoxicity test method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-498-2021.pdf.

©OECD(2023)

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

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

OCDE/OECD 498

採択
2021 年 6 月 14 日
改訂：2023 年 7 月 4 日

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

In vitro 光毒性：再構築ヒト表皮光毒性試験法

はじめに

1. 光毒性（光刺激性）は、環境光に身体を曝露した後に局所的または全身的に投与された光反応性化学物質によって誘発される急性毒性反応と定義する。光毒性化学物質への皮膚曝露において、光活性化学物質への皮膚の急性曝露およびその後の光曝露後に光毒性反応が誘発される。本試験法では光感作物質（曝露した皮膚に免疫介在反応を誘発する可能性がある光活性化学物質）は扱わない。

2. 本試験ガイドラインでは、特に光毒性化学物質への局所皮膚曝露に関するものとして、ヒトの健康に関する光毒性のエンドポイントを取り上げる。*In vitro* 再構築ヒト表皮光毒性試験（RhE PT）を用いて、模擬太陽光の存在下および非存在下における再構築ヒト表皮（RhE）組織への局所適用後の被験化学物質の光毒性の可能性を特定する（模擬太陽光の特性については第 37～38 段落を参照）。光毒性の可能性は、模擬太陽光の非存在下と比較した、模擬太陽光存在下で被験化学物質に曝露した細胞生存率の相対的な減少により評価する。本試験で陽性と確認された化学物質は、皮膚、眼、その他の外部の光曝露上皮への局所適用後、*in vivo* で光毒性を示す可能性がある。

3. 本試験ガイドラインは、ヒトの皮膚の最上層すなわち表皮の生化学的および生理学的特性を厳密に模倣した、再構築ヒト表皮（RhE）の *in vitro* 試験系に基づいている。RhE 試験系では、細胞源としてヒト由来の角化細胞を用いて、代表的な組織構造および細胞構造を有する表皮モデルを再構築する。試験法は、OECD TG 439 *in vitro* 皮膚刺激性：再構築ヒト表皮試験（1）に記載されている基本的な被験化学物質曝露および生存率評価法と、OECD TG 432 in vitro 3T3 NRU 光毒性試験（2）に記載されている標準化された照射手順を組み合わせたものである。本試験ガイドラインにおける曝露時間は TG 439 に示された曝露時間より著しく長く、照射時に反応性光毒性種が誘発される可能性のある標的細胞に最も近い組織モデルに化学成分が拡散するのに十分な時間を確保することができる。

4. 一般性能の評価は、1999 年に報告された最初の試験法の事前バリデーション（4）（感度 86.7%、特異度 93.3%）を含む、個々の文献引用（3）（4）（5）（6）（7）（8）（9）（10）の特別評価に基づいて行った（第 III 相、3 つの試験施設において独立して 2 回試験した 10 の化学物質のセット）。

© OECD, (2023)
本資料は、http://www.oecd.org/termsandconditions/に掲載されている諸条件に従って自由に使用することができる。

データは 1999 年に COLIPA 光毒性タスクフォースに発表された（11）。タスクフォースは、3D RhE 皮膚モデルは被験化学物質の生物学的利用能を評価するのに有用なツールである可能性があると結論した。補足的試験として 3T3 NRU PT と併用した場合、急性光毒性の境界域での予測において明らかな判断が可能となる。3D RhE 皮膚モデル試験も、光毒性効力の評価に役立つと考えられた。光毒性効力に関する追跡試験は、2003～2006 年に ECVAM の支援を受けた（12）。

5. 新たな OECD 光毒性ガイドラインの策定を支援するため、OECD 光毒性専門家グループは、その他の文献とともに、*in vitro* における急性光毒性の可能性を予測する 3D RhE 皮膚モデルの能力に関して、事前バリデーションデータの特別評価を実施した。文献レビューから、EpiDerm™ 皮膚モデルで評価した 60 を超える被験化学物質のデータベースが得られた。集約データセットでは、以前に溶媒使用に関する誤った指示によって感度が損なわれていたため（10）、事前バリデーション試験（4）で得られたものより高い特異度および感度を示した。最初の事前バリデーション試験後に同じ SOP を使用して実施した他の試験は、正式なバリデーション試験として実施されなかったことに留意する必要がある。

6. 本試験ガイドラインで使用される定義は、補遺 1 に記載されている。

最初に考慮すべき事項および限界

7. 多くの種類の化学物質は光毒性作用を誘発することが報告されている（13）（14）（15）（16）。これらの化学物質には、太陽光波長領域で光エネルギーを吸収する特徴がある。光反応には、十分な光量子の吸収が必要である。そのため、試験を検討する前に、OECD TG 101 UV-VIS 吸収スペクトル（17）に従い、被験化学物質の UV/可視光線吸収スペクトルを測定する必要がある。モル吸光係数（MEC）が 1000 L mol^{-1} cm^{-1} 未満の場合、化学物質は光反応性がないと考えられることが報告されている（18）（19）。このような化学物質は、*in vitro* RhE PT または光有害作用を検討する他の生物学的試験による追加試験を必要としない可能性がある（3）（20）。一般に、この原則はすべての被験化学物質に適用されるが、化学物質の使用目的や潜在的な曝露条件によっては、より具体的なガイドラインが適用される場合がある。RhE PT 試験は、単独の試験法として使用するほか、特定のガイドライン（医薬品に関する ICH S10 など）に従い、局所適用物質の段階的試験戦略として使用することもできる。本試験ガイドラインにおいて「被験化学物質」とは、試験対象物のことであり、物質および/または化学混合物の試験に対する RhE PT の適用可能性に関連するものではない。現在入手可能な、既知の組成の混合物への RhE PT の適用可能性および性能に関する情報は限定的である。混合物、試験が困難な化学物質（不安定である等）、あるいは本試験ガイドラインに記載の適用範囲内であるかが明確でない化学物質の試験にあたっては、試験の結果が科学的に意味を持つかどうかを最初に考慮すべきである。

8. 複数の試験（3）（4）（5）（6）（7）（8）（9）（10）において *in vitro* RhE PT の信頼性および妥当性を評価した。本試験ガイドラインに示される手順および予測モデルは、光毒性の化学物質と非光毒性の化学物質を区別するよう設計されている。しかし、文献には局所塗布した化学物質および混合物の光毒性効力を検討するための特定の手順および予測モデルがある。本試験ガイドラインは、化学物質と光の複合的な作用から生じる他の有害作用を予測するために設計されていない（たとえば、光遺伝毒性、光アレルギー、光発がん性を評価するものではない）。さらに、本試験ガイドラインは、光毒性の間接的な機序、被験化学物質の代謝物の作用、あるいは混合物中の個々の化学物質の光毒性を検討するために設計されていない。

© OECD, (2023)

9. RhE 組織は限定的な代謝活性を有するが、代謝活性化系を用いて *in vitro* RhE PT を実施する必要はない（21）。現時点では、代謝活性化がない場合に光毒性化合物が見落とされることを示す証拠は存在しない（22）。

10. MTT ホルマザン（有色化学物質）と同じ範囲の光を吸収する被験化学物質、または生体染色色素 MTT を直接（MTT ホルマザンに）還元可能な化学物質は、生存率評価の時点で試験系中または試験系上に残留する場合、細胞生存率の測定に干渉するおそれがあり、「MTT 還元物質および着色剤の補正」の項の、補正用の適合対照を用いる必要がある（第 59～66 段落を参照）。あるいは、MTT ホルマザンを測定するために HPLC/UPLC 分光光度法を用いることもできる（第 65～66 段落を参照）。

11. RhE PT を用いて実施された試験のほとんどは太陽スペクトルの UVA/可視光線領域を利用していたが、一部の試験は、RhE 組織が制御条件下で UVB 曝露（5）（23）（24）にも耐えられることを確認している。これは、スペクトルの UVB 領域に耐性のないほとんどの細胞株ベースの試験（2）と比較して利点である（25）。

12. 分類が明確である場合、1 つの被験化学物質について 1 回の試験実施で十分である。しかし、複製組織の結果が一致しないなど、結果が境界域の場合は 2 回目の測定を検討し、最初の 2 回の測定間で結果が一致しない場合は 3 回目の測定を検討する。反復測定では、境界域あるいは結果が不確かな濃度付近の反応の範囲をより適切に捉えるために、被験化学物質の濃度を調節してもよい（詳細は結果の解釈および予測モデルを参照）。

13. 被験化学物質の光毒性の可能性は、模擬太陽光の存在下および非存在下で RhE 組織において複数の濃度を試験することによって判定する。被験化学物質の有効な予測を行うために、少なくとも 1 つの濃度から許容可能な結果を確実に得られるためには、一般的に 2 つの複製における 3～5 濃度の試験で十分である。許容可能な結果の具体的な基準を予測モデルとともに示す。

試験の原理

14. RhE PT における光毒性の可能性は、非細胞毒性量の模擬太陽光の非存在下と比較した、疑似太陽光存在下で被験化学物質に曝露した RhE 組織の生存率の相対的な減少によって評価する。

15. 培養して多層の高分化ヒト表皮モデルを形成したヒト由来表皮角化細胞からなる 3 次元 RhE 組織に、被験化学物質を局所適用する。本モデルは、組織化された基底層、有棘層および顆粒層、ならびに *in vivo* で認められるものと類似した主要な脂質クラスを代表する細胞間層状脂質層を含む多層の*角質層*からなる。したがって、RhE 組織は *in vivo* の生体皮膚上における化学物質の曝露を直接モデリングするのに理想的であり、被験物質の希釈を必要とせずに化学物質および混合物の皮膚刺激性および腐食ハザードを予測できることが実証されている（1）（26）。

16. 要約すると、溶媒で調製した複数濃度の被験化学物質を RhE 組織に局所適用し、生存組織に浸透させるために標準的な培養条件（37 ± 1°C, 5 ± 1% CO_2, 90 ± 10% RH）で 18～24 時

© OECD, (2023)

間培養する。一般に、有効な試験の基準を満たす少なくとも 1 つの濃度から結果を得るために、3〜5 濃度を試験する。陽性対照および適切な溶媒対照も、RhE 組織に局所適用し、並行して試験する。各処理群の組織の半数に模擬太陽光 6 J/cm^2 を照射し（+Irr）、残りの半数は室温で暗所に保存する（-Irr）（詳細は第 37 段落および第 38 段落を参照）。曝露後 18〜24 時間の培養期間後、生体染色色素 MTT（3-［4,5-ジメチルチアゾール -2-イル］2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド, チアゾリルブルー（CAS 番号 298-93-1）から青色ホルマザン塩に酵素的に変換することにより測定（組織から抽出後に測光法で測定）し、照射（+Irr）および非照射（-Irr）処理群の相対生存率を求める。

17. 光毒性の可能性は、各照射処理群の生存率の相対的な低下を、同等の非照射処理群と比較することによって判定する。

18. 実験計画は、ZEBET が実施した事前バリデーション試験（4）（27）および本プロトコルで実施した追跡試験に基づいている。追跡試験では、試験の再現性および感度を改善する軽微な修正が示唆された。更新されたプロトコルは 2017 年に公表された（10）。本試験ガイドラインに記載された手順は、更新されたプロトコルに基づく。

19. 本試験法は、光毒性を取り扱う単独の試験法として使用することができ、特に被験化学物質の溶解性が限られている場合、あるいは OECD TG 432（2）および OECD TG 495 の光反応性 ROS 試験（28）におけるエンドポイントの適合性の問題がある場合に用いることができる。本試験法は、OECD TG 432 および/または OECD TG 495（8）（11）（22）（29）と組み合わせた段階的試験戦略にも使用することができる。

習熟度の実証

20. 試験法を定常的に用いる前に、試験施設は、**表 1** に示す 6 つの習熟度確認物質を正確に分類することにより、技術的習熟度を実証すること。記載された化学物質が入手できない、あるいは他の正当な理由で使用できない場合、表 1 に記載したものと同じ選択基準が適用されるのであれば、適切な *in vivo* および *in vitro* の参照データが入手可能な別の化学物質を使用してもよい（参照化学物質のリスト（3）（4）（5）（6）（7）（8）（9）（10）から等）。代わりの習熟度確認物質を使用する場合は、その妥当性を示すこと。

21. 習熟度試験の一環として、使用者が試験施設において RhE モデルを使用することに慣れていない場合、RhE モデル製造者の指定に従って受領後に組織のバリア特性を確認することを推奨する。組織の輸送が長距離／長時間に及ぶ場合に特に重要である。ただし、試験法が確立され、使用に関する習熟度が実証された後は、このような検証は定常的に行う必要はない。

© OECD, (2023)

表 1.習熟度確認物質 [1]

	物質名	CAS RN	In vivo[2]	溶媒 [3]	代表的な光毒性範囲 [% w/v または% v/v]（参考文献）
			光毒性物質		
1	クロルプロマジン	69-09-0	PT	水	0.003% – 0.01% (4)
2	アントラセン	120-12-7	PT	EtOH[4] またはアセトンオリーブ油（4:1）	0.01% – 0.03% (5)(30)
3	ベルガモット油 [6]	8007-75-8	PT	油 [5]	0.0316% – 3.16% (4)(8)
			非光毒性物質		
4	ドデシル硫酸ナトリウム	151-21-3	NPT	水	最高試験濃度（1%）まで光毒性なし (4)
5	サリチル酸オクチル	118-60-5	NPT	油 [5]	最高試験濃度（10%）まで光毒性なし (4)
6	4-アミノ安息香酸（PABA）	150-13-0	NPT	油または EtOH	最高試験濃度（10%）まで光毒性なし （27）（30）

注： [1] 習熟度確認物質は、事前バリデーションおよび追跡試験で使用した物質の一部であり、以下の基準に基づいて選択する。（i）市販されている物質である。（ii）幅広い光毒性作用を代表するもの（非光毒性から強い光刺激物質まで）である。（iii）明確に定義された化学構造を有する。（iv）バリデーションプロセスで使用される化学物質分類を代表する物質である。（v）複数の試験および複数の試験施設において再現可能な *in vitro* の結果を提供した物質である。（vi）*in vitro* で正しく予測された物質である。（vii）極めて有毒なプロファイル（例：発がん性または生殖器系に対する毒性）を示さず、高額の廃棄費用を伴わない物質である。（viii）選択した物質の結果およびプロトコルの詳細が文献から入手可能である。

[2] PT - 光毒性、NPT - 非光毒性（注：*in vivo* 分類は、3T3 NRU PT 試験（OECD TG 432）のバリデーション試験から得られており、主に臨床のヒトのデータに基づいている。これは、このエンドポイントについて入手可能な、検証された *in vivo* 法がないためである。

[3] 事前バリデーションおよび追跡試験の参考資料に基づき、溶媒が提案されている。

[4] EtOH - エタノール

[5] 油 – ゴマ油

[6] 光毒性反応の変動は不純物含有量の影響を受けるため、市販の非精製ベルガモット油を使用することを推奨する。非精製ベルガモット油は、スペクトルの UVA および UVB 領域に顕著な吸収を持つ（8）。

手順

22. 以下に、光毒性試験のための RhE 試験法の構成要素および手順を示す。本試験ガイドラインに準拠した RhE ベースの試験については標準作業手順書（SOP）が入手可能である（27）。軽微な技術的改善、溶解性に関するガイダンス、溶媒に関する提言、および EpiDerm プロトコルで試験した化学物質に関する情報を含む詳細な SOP が 2017 に公表されている

© OECD, (2023)

（10）。試験施設での本試験法の実施および使用には、本試験ガイドラインに準拠した RhE ベースの試験の SOP を使用すること。

一般的な試験系の特性

23. 上皮の再構築にはヒト角化細胞を用いる。機能する*角質層*の下には、多層の生存上皮細胞（基底層、有棘層、顆粒層）が存在する。*角質層*は、必須の脂質プロファイルを含有する多層構造で、細胞毒性のベンチマーク化学物質の急速な浸透に耐える頑健性を備えた機能的バリアを形成する必要がある（たとえば、界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）および Triton®-X-100 は、通常バリア機能試験に使用される）。RhE モデルの封じ込め特性により、皮膚曝露モデル不良になると考えられる、*角質層*周囲の物質の生存組織への透過を回避すること。RhE 組織は細菌、ウイルス、マイコプラズマまたは真菌による汚染されていないこと。

機能条件

生存率

24. 生存率の定量には、MTT 試験（31）を用いる。RhE 組織の生存細胞が生体染色色素 MTT を還元して青色の MTT ホルマザン沈殿物を生成する。これはイソプロパノール（または類似の溶媒）を用いて組織から抽出される。抽出溶媒のみの光学密度（OD）は十分な低値、すなわち OD < 0.1 であること。抽出した MTT ホルマザンは、標準吸光度（OD）測定または HPLC/UPLC 分光光度法（32）のいずれかを用いて定量することができる。RhE モデルの開発者/供給者は、RhE モデルの各バッチが陰性対照について規定された品質管理基準を満たすことを保証しなければならない。RhE モデルの開発者/供給者により、陰性対照の（第 56 段落記載条件下での）OD 値の許容範囲（上限および下限）が定められている。これを**表 2** に示す。RhE モデルの使用者は、溶媒（陰性）対照の結果が特定の試験法の判定基準に適合していることを確認しなければならない。HPLC/UPLC 分光光度法の使用者は、溶媒（陰性）対照の判定基準として**表 2** に示す陰性対照の OD 範囲を用いること。

表 2.本試験ガイドラインに含まれる試験法の MTT 試験における溶媒（陰性）対照の OD 値の許容範囲

	許容下限値	許容上限値
EpiDerm™ (EPI-200)	0.8	2.8

© OECD, (2023)

バリア機能

25. RhE モデルの開発者/供給者は、RhE モデルの各バッチのバリア機能について規定された品質*管理基準*を満たすことを保証しなければならない。バリア機能は、一定の曝露時間後にベンチマーク化学物質（ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）または Triton®-X-100 など）が組織の生存率を 50%低下させる濃度（IC_{50}）を測定する、または規定の一定濃度でベンチマーク化学物質を適用した場合に細胞生存率を 50%低下させるのに必要な曝露時間（ET_{50}）を測定することにより評価することができる。本試験ガイドラインに含まれる試験法の許容範囲を**表 3** に示す。

表 3.本試験ガイドラインに含まれる RhE モデルのバリア機能 QC バッチ出荷基準

	許容下限値	許容上限値
EpiDerm™ (EPI-200)	ET_{50} = 4.00 h	ET_{50} = 8.72 h

形態

26. RhE モデル開発者/供給者の QC 出荷プログラムでこのパラメータを使用するのであれば、RhE モデルの組織学的検査は、RhE モデル開発者/供給者によるヒト表皮様構造（多層の*角質層*を含む）の実証によって提供される。

再現性

27. RhE モデルの開発者/供給者は、経時的な再現性をモニターするために、生存率およびバリア機能試験の QC 出荷試験結果のデータベースを保持する必要がある。RhE モデルの使用者は光毒性試験法の陽性対照および溶媒（陰性）対照の結果のデータベースを保持し、試験法実施の経時的な再現性をモニターすることが推奨される。

品質管理（QC）

28. RhCE モデルは、RhCE モデルの各バッチが、定められた製造出荷基準を満たしていることが開発者/供給者によって実証されている場合にのみ使用すること。なお、該当する場合、この基準の中でも重要なのは、生存率（第 24 段落）、バリア機能（第 25 段落）および形態（第 26 段落）である。関連する QC データを試験法の使用者に提供し、試験報告書にこの情報を含めることができるようにする。光毒性について信頼性の高い予測をするためには、適格性が確認された組織を用いて得られた光毒性試験結果のみを受け入れる。

被験化学物質および対照物質の調製

29. 被験化学物質は、保存中の安定性がデータによって実証されない限り、試験日に新たに調製しなければならない。すべての化学物質の取り扱いおよび組織の初回の処理は、照射前に被験化学物質の光活性化または分解を避けるような条件下で行うことが推奨される。被験化学物質は UV を吸収し、UV フィルターとして作用する可能性があるため（10）（27）、被験化学物質の最大推奨濃度は 10%を超えてはならない。

30. 少なくとも 1 濃度の被験化学物質から許容可能な結果を得て、光毒性について試験結果

© OECD, (2023)

を評価するための要件を満たすには、通常、溶媒中の 3〜5 濃度の被験化学物質を試験すれば十分である（第 69〜71 段落を参照）。理想的には、被験化学物質の濃度は、非照射下で細胞毒性用量反応を確認できるように選択すべきである。適切な濃度範囲の選択に関するガイダンスは、SOP（10）（27）に示されている。

31. 水溶性の被験化学物質は、超純水または適切な場合には緩衝塩溶液（フェノールレッドを含まないダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）またはハンクス平衡塩溶液（HBSS）など）で調製する。照射中の干渉を避けるため、使用する緩衝液には蛋白質および光吸収成分（例：フェノールレッドなどの pH 指示薬およびビタミン類）が含まれないようにする。

32. 油溶性の被験化学物質はゴマ油または他の適切な油（UV 吸収が低く、RhE 組織と適合することが証明されている鉱油など）で調製する。水および油に対して溶解性の低い被験化学物質には、純エタノールまたはアセトン:オリーブ油（4:1 v:v）混合物を使用してもよい（10）。

33. その他の溶媒も考えられるが、使用前に溶媒中における RhE 組織との適合性、被験物質と反応性、光毒性誘発能、光毒性抑制作用、ラジカル消去能および/または化学的安定性などの特性について評価すること（33）。他の溶媒を使用する場合は、溶媒の安定性および試験系との適合性を保証するため、選択した溶媒を用いた事前試験を実施することが推奨される（補遺 3 追加ガイダンスを参照）。

34. 被験化学物質の安定性が損なわれない限り、ボルテックス撹拌、超音波処理、および/または適温への加温を用いて可溶化を補助することができる。被験化学物質溶液の調製に用いた手順は文書化すること。

35. 生存再構成ヒト組織に対する試験を実施する前に、測定されたエンドポイントへの干渉について被験物質の評価を実施することが推奨される（MTT 試験）。これらの手順の詳細は SOP に記載されている。被験物質による MTT 試験への干渉の可能性が明らかになった場合、「MTT 還元物質および着色剤の補正」の項に記載したように適合する対照の適用が推奨される。

36. 溶媒対照（陰性対照として使用）および陽性対照（PC）は、各測定で同時に試験すること。提案する溶媒対照は、水（水溶性物質の溶媒）またはゴマ油（油溶性物質の溶媒）および/または被験物質を溶解するために用いる他の溶媒である。提案する PC は、最終濃度 0.01%〜0.02%のクロルプロマジン塩酸塩水溶液（またはフェノールレッドを含まない DPBS または HBSS などの他の水性緩衝塩溶液）である。習熟度を実証するための試験を確立する前に、クロルプロマジン塩酸塩の用量反応を評価するために、追加の濃度を試験することができる（4）（10）（27）。

照射条件

37. 光源：光毒性試験において、適切な光源（例:ソーラーシミュレータ）およびフィルターの選択は、重要な要素である。通常、UVA および可視光線領域の光は *in vivo* における光毒性反応と関連している（15）（28）。一方 UVB は光毒性との関連は少ないが高い細胞毒性を示す。波長が 313 nm から 280 nm に変化すると細胞毒性は 1000 倍増加する（28）。適切な光源は、太陽スペクトル全体を放射するものである（290 nm から 700 nm）。フィルターを用いて UVB を減衰させながら、UVA および可視光線の透過を可能にして、スペクトルを調節すること

© OECD, (2023)

ができる（補遺2：を参照）。さらに、使用した波長、放射照度および光源装置（たとえば、開放系または閉鎖系）は、試験系に対して過度に有害であってはならない（たとえば、熱の放出/赤外線領域の波長）。

38. ソーラーシミュレータによる模擬太陽光は、適切な人工光源と考えられる。フィルタリングしたソーラーシミュレータの放射分布は、屋外の太陽光に近い必要がある（34）。キセノンアークおよび（ドープされた）水銀ハロゲンアークはどちらも、ソーラーシミュレータとして使用されている（30）。水銀は熱の放出が少なく安価であるが、太陽光との適合性はキセノンアークほど良好ではない。すべてのソーラーシミュレータは、多量の UVB を放射するため、UVB 波長を減衰させるために適切にフィルタリングする必要がある（補遺 2）。細胞培養プラスチック材には UV 安定剤が含まれているため、透過スペクトルは試験で使用するものと同種類のプレート蓋を用いて測定すべきである。フィルタリングまたは装置の不可避なフィルター効果によってスペクトルの一部を減衰させた場合にかかわらず、これらのフィルター下で記録されたスペクトルは、標準化された屋外の太陽光（34）から逸脱しないこと。国際的に認められた屋外の太陽光の発光基準である外部光標準 D65 は、ISO DIS 18909:2006 に記載されている。EpiDerm™ モデルを用いた事前バリデーションおよび追跡試験で用いたフィルタリングしたソーラーシミュレータの照射分布の例を（10）（30）（23）に示す。補遺 2：図 1 も参照のこと。

39. *線量測定：*各光毒性試験を実施する前に、校正済みの適切な広域 UVA メーターを用いて、定期的に光強度（放射照度）を確認すること。放射照度は、試験に使用するものと同種類のプレート蓋を用いて測定する。

40. 約 6 J/cm^2 の放射照度（UVA 領域で測定）は、RhE 組織において細胞毒性を示さず、光毒性反応を引き起こすのに化学物質を励起する十分な量であると判定された（4）（10）（30）。60 分以内に 6 J/cm^2 を達成するように UVA/可視光線の放射照度を 1.7 mW/cm^2 に調整した（補遺 2: 図 2 参照）。次式を用いて 6 J/cm^2 を達成するために、別の曝露時間および/または放射照度を使用してもよい。

$$\text{t (分)} = \frac{\text{照射量 (J/cm}^2) \times 1000}{\text{放射照度 (mW/cm}^2) \times 60} \quad (1\text{J} = 1\ \text{Wsec})$$

41. RhE 組織モデルは UVB 照射に耐性があり（5）（23）（24）、UVB 照射を含めるのが適切な場合がある（たとえば、対象の被験化学物質の吸収が UVB 波長領域のみである場合）。スペクトルの UVB 領域の存在をモニタリングし、放射照度の変化と共に最終報告書に報告する必要がある。

42. 同様に、異なる光源を使用する場合は、細胞に悪影響を及ぼさないが、標準的な光毒素を励起するのに十分な量を選択できるように、照射を校正すること。機能チェックは、表 1 および図 2 に記載されている習熟度確認化学物質の試験により実施する。

43. *細胞の照射感度*：試験施設で新たに試験を設定した場合は、UVA 感度試験を実施すること。方法および期待される結果の簡単な説明を SOP に示す。6 J/cm^2 に曝露した照射組織の生存率は、非照射組織の 80%以上でなければならない。

© OECD, (2023)

試験手順

44. *組織の調整* : RhE 組織の受領後、キットの全構成部品の完全性を検査する。無菌条件下で、1 ウェル当たり 0.9 mL の培地を含む 6 ウェルプレートに組織を移す。プレートをインキュベーターに入れ、標準的な培養条件（37 ± 1°C, 5 ± 1% CO_2, 90 ± 10% RH）で 60 分以上培養する。前培養は一晩に延長することができるが、最初の 60 分後に培地を交換する。

45. 60 分間以上の前培養後、6 ウェルプレートの組織をインキュベーターから取り出し、組織下の培地を加温した（37°C）新しいアッセイ培地と交換する。組織に直ちに処理するか、処理開始までインキュベーターに戻してもよい。各処理条件または処理群について、4 つの組織を処理する。このうち 2 つの組織を細胞毒性の試験で使用し（非照射下で処理）、2 つを光毒性の試験で使用する（照射下で処理）。

46. *適用* : RhE 組織を局所的に処理する。水または水性緩衝液に溶解した溶液の場合、50 µL の溶液を RhE 組織に局所的に塗布し、必要に応じて、無菌のバルブ付きパスツールピペット（一端を火炎で溶かして小さい球を作ったパスツールピペット）または同様の器具を用いて静かに広げる。油中の溶液については、25 µL の溶液を RhE 組織に局所的に塗布し、必要に応じて無菌のバルブ付きパスツールピペットで静かに広げる。展膏が不十分な場合は、（毛細管作用で組織表面を覆うように）追加の展膏ツールとして、無菌ナイロンメッシュ（円形）を組織に局所適用することを検討する。皮膚を刺激する可能性のある溶媒については、溶媒による細胞毒性を避けるために量を制限すること。たとえば、量が多いと細胞毒性が生じる可能性があるため、エタノールまたはアセトン/オリーブ油混液（4:1）を溶媒とする溶液は20〜25 µL を超えてはならない。

47. 処理後、組織をインキュベーターに戻し、標準的な培養条件で一晩（18〜24 時間）培養する。

48. 翌日、緩衝液（例:フェノールレッドを含まない DPBS または HBSS）0.9 mL を予め充填した新しい 6 ウェルプレートまたは緩衝液 0.3 mL を予め充填した 24 ウェルプレートに組織を移す。細胞培養培地への照射によりばらつきが増大し、細胞毒性の光産物を産生する可能性があるため、フェノールレッドを含まない緩衝塩溶液の使用が推奨される（35）。

49. *照射* : +Irr プレート（蓋をしたもの）に 1.7 mW/cm^2 を室温で 60 分間（または同等のもの）照射し、模擬太陽光が 6 J/cm^2 となるようにする。光源が過度の熱を発生し、プレートの蓋の下に結露を引き起こす場合は、プレートをファンで換気する。−Irr プレートを室温の暗所（ボックス内など）、好ましくは照射組織と同じ曝露室に置く。処理中にメッシュを使用した場合、照射/暗所曝露前に慎重にメッシュを除去すること（細い鉗子を使用する等）。加温した（37°C）新しいアッセイ培地を 1 ウェル当たり 0.9 mL 加えた新しい 6 ウェルプレートを準備する。

50. 照射終了後、無菌 CMF-DPBS の入った洗浄瓶を用いて各組織を洗浄する。組織表面から物質を効果的に除去するには、約 20 回の洗浄が必要である。希釈液を除去するために用いた手順を文書化し、最終報告書に示すこと。洗浄したすべてのインサートを新しい培地の入った新しいプレートに移す。各組織の表面を滅菌綿棒で慎重に乾燥させる。

© OECD, (2023)

51. 被験物質の特性が照射を妨害または遮断する可能性がある場合（たとえば、暗色または不透明な物質）、照射または暗所曝露条件の前に、希釈液を除去しなければならない。試験条件下において、18 時間から 24 時間の曝露期間中に RhE 組織内に浸透する被験化学物質は、照射時の組織内において生物学的に利用可能である。照射前の 18～24 時間の曝露時間は、皮膚刺激性試験（1）に関する TG 439 で適用された曝露時間より著しく長い。そのため、照射時に反応性光毒性種が誘発される可能性のある標的細胞に最も近い組織モデルに被験化学物質が拡散するのに十分な時間が確保できる。UVA/可視光または暗所曝露条件の前に、リンス培地（例:Ca^{++}および Mg^{++}を含まない DPBS（CMF-DPBS））に浸した無菌の綿棒を使用して、被験化学物質を除去することができる。照射前に被験物質を除去する正当な理由を試験報告書に示さなければならない。

52. 組織を標準的な培養条件で一晩（18～24 時間）培養する。

53. *MTT 生存率試験*：1 mg/mL MTT 溶液を調製して 37°C に加温し、ラベルを貼付した 24 ウェルプレートの適切なウェルに 300 µL 分注する。18～24 時間培養後、組織インサートを 6 ウェルプレートから取り出し、インサートの底部を滅菌ガーゼまたはペーパータオルで吸い取り、ラベル付き 24 ウェル MTT プレートの適切なウェルに移す。24 ウェルプレートを標準培養条件で 3 時間培養する。

54. MTT 培養後、インサートを 24 ウェルプレートから取り出し、インサートの底部を滅菌ガーゼまたはペーパータオルで吸い取り、新しいラベル付き 24 ウェルプレートの適切なウェルに移す。2 mL イソプロパノール（抽出液）で組織を抽出する。24 ウェルプレートを（パラフィルム等で）密封し、プレートシェーカーで穏やかに振とうしながら室温で 2 時間以上かけてホルマザンを抽出する。または、一晩かけて抽出することも可能である。プレートを上述のように密封し、振とうせずに室温の暗所で抽出する。抽出液のサンプリング前に、プレートシェーカーで 15 分間以上振とうする。

55. 抽出が完了したら、組織インサートをウェルから持ち上げて、インサートを取り出したウェルに抽出溶液をデカントする、または（20 ゲージの注射針等で）組織に穴を開け、インサートを取り出したウェルへ抽出液を排出する（インサートは廃棄可能）。抽出液が均一になるまで、3 回以上ピペットで「上下」にして抽出液を混合する。各組織について、ラベルを貼付した 96 ウェル平底マイクロタイタープレートに 200 µL の抽出溶液アリコートを分注する。最後に、200 µL のイソプロパノールのアリコートをブランク用の指定されたウェルに添加する。

56. 96 ウェルプレートの光学密度（OD）を、マイクロタイタープレート分光光度計を用い、540～595 nm の波長、望ましくは 570 nm（最大± 30 nm のフィルターバンドパス）で測定する。参照フィルターの読み取りは必要ない。あるいは、ホルマザン抽出試料の吸光度を、HPLC/UPLC 分光光度法（32）を用いて測定することもできる。

細胞生存率の計算

57. 生存率の計算各被験化学物質で得られた OD 値を用いて、溶媒（陰性）対照（100%に設定）に対する生存率（%）を算出することができる。HPLC/UPLC 分光光度法を用いる場合、組織生存率（%）は、被験化学物質に曝露した生存組織を用いて得た MTT ホルマザンピーク面積の、同時に溶媒（陰性）対照で得た MTT ホルマザンピーク面積に対する百分率として算出する。

© OECD, (2023)

58. 適切な溶媒（陰性）対照で処理した組織（+Irr）の平均値に対する、各被験化学物質または陽性対照で処理した組織（+Irr）の相対生存率（または対照に対する%）を算出する。同様に、適切な溶媒（陰性）対照で処理した組織（-Irr）の平均値に対する、被験物質または陽性対照で処理した組織（-Irr）の相対生存率（または対照に対する%）を算出する。個々の対照に対する%値を平均して、+Irr および-Irr の各曝露について濃度あたりの、対照に対する平均%（生存率）を算出する。以下の式を用いる。

$$\text{対照に対する\%} = \frac{\text{処理した陽性対照の各試験化学物質の補正後 OD}}{\text{陰性/溶媒対照の補正後 OD}} \times 100$$

MTT 還元物質および着色剤の補正

59. 被験化学物質の光学的特性やその MTT に対する化学的作用（化学物質は、色の生成を防止または反転、およびそれを引き起こす可能性がある）が試験に干渉し、生存率の誤った推定につながることがある。特定の被験化学物質が洗浄によって組織から完全に除去されない場合、または表皮に浸透した場合に生じる可能性がある。被験化学物質が MTT に対して直接作用する場合（MTT 還元物質など）、自然に着色している場合、または組織処理中に着色する場合は、生存率の測定に対する被験化学物質の干渉を検出し、補正するために、追加の対照を使用すべきである。直接的な MTT 還元および着色剤による干渉の補正方法に関する詳細な説明は、皮膚および眼の刺激性および腐食性に関する OECD のバリデーション済試験法の SOP から入手できる（5）（25）。

60. 直接的な MTT 還元物質を同定するために、最高試験濃度の各被験化学物質を新たに調製した MTT 溶液に添加する。被験化学物質を含む MTT 混合物が青色/紫色に変化した場合、被験化学物質は MTT を直接還元すると推定されるため、標準吸光度（OD）測定または HPLC/UPLC 分光光度法とは別に、生存不能な RhE 組織の機能検査をさらに実施すべきである。この追加機能検査では、残存する代謝活性のみを有するが、生存組織と同様の方法で被験化学物質を吸収する死亡組織を使用する。各 MTT 還元被験化学物質を最高試験濃度で 2 つ以上の死亡複製組織（例:照射する組織 1 つ、暗所条件で曝露する組織 1 つ）に適用し、全試験手順を経て非特異的な MTT 還元（NSMTT）を得る。

61. 独立した試験/測定の実施回数に関係なく、NSMTT 対照は被験化学物質ごとに 1 つで十分である。MTT 還元物質に曝露した生存細胞組織で得られた組織生存率（%）から、同じ MTT 還元物質に曝露した死亡組織から得られた非特異的 MTT 還元率を減じることで真の組織生存率を算出し、補正中の試験と同時に実施する溶媒（陰性）対照との相対値（%NSMTT）を算出する。

62. 有色の被験化学物質、または、水かイソプロパノールと接触したときに着色する被験化学物質による干渉の可能性を特定し、追加の対照の必要性を判断するために、水（曝露中の環境）および/またはイソプロパノール（抽出溶液）中の被験化学物質の分析を実施すること。水および/またはイソプロパノール中の被験物質が 570 ± 30 nm の範囲の光を吸収する場合は、追加の有色の対照を使用すべきである。あるいは、HPLC/UPLC 分光光度法を用いる必要があるが、その場合、これらの対照は必要ない。

© OECD, (2023)

63. 標準吸光度（OD）測定を行う場合は、干渉する各有色被験化学物質を最高試験濃度で 2 つ以上の生存組織（例：照射する組織 1 つおよび暗所条件で曝露する組織 1 つ）に適用し、全試験工程を実施する。ただし、MTT 培養工程で MTT 溶液の代わりに培地を用いて培養し、非特異的な有色（NSCliving）対照とすること。NSCliving 対照は有色被験化学物質の試験と同時に実施する必要があり、複数の試験を実施する場合は、生存組織には固有の生物学的ばらつきがあるため、実施する各試験（各測定）で独立した NSCliving 対照を実施する必要がある。干渉する被験化学物質に曝露し MTT 溶液と培養した生存細胞で得られた組織生存率（%）から、干渉する被験化学物質に曝露し MTT を含まない培地で培養した生存細胞で得られた非特異的な発色率を減じることで真の組織生存率を算出し、これを補正中の試験と同時に実施する（%NSCliving）。

64. 非特異的な MTT 還元および非特異的な色による干渉により、分光光度計の直線範囲を超える組織抽出物の読み取りが増加する可能性があることに注意することが重要である。これに基づき、各試験施設は、規制を目的とする被験化学物質の試験を開始する前に、市販の MTT ホルマザン（CAS# 57360-69-7）を用いて分光光度計の直線範囲を決定する必要がある。直接的な MTT 還元および/または色による干渉の補正なしで被験化学物質から得られた組織抽出物の OD が、分光光度計の直線範囲内にあるとき、分光光度計を用いた標準吸光度（OD）の測定は、直接的な MTT 還元物質や色による干渉を有する被験化学物質を評価するのに適している。

65. MTT 試験に強い干渉作用があるために、標準吸光度（OD）測定に適合しない有色被験化学物質については、MTT ホルマザンを測定するのに代替 HPLC/UPLC 分光光度法を採用することができる。HPLC/UPLC 分光分析システムにより、被験化学物質を定量する前に MTT ホルマザンを分離することができる（32）。このため、HPLC/UPLC 分光光度法を用いる場合は、被験化学物質に関係なく、NSCliving/NSCkilled 対照を必要とすることはない。しかし、被験化学物質が MTT を直接還元することが疑われる場合や、直接的な MTT 還元能の評価を妨げる色を有する場合には、NSMTT 対照を使用すべきである。HPLC/UPLC 分光光度法を用いて MTT ホルマザンを測定する場合、組織生存率（%）は、同時の溶媒（陰性）対照で得た MTT ホルマザンのピークに対する、被験化学物質に曝露した生存組織を用いて得た MTT ホルマザンピーク面積の割合として算出する。MTT を直接還元できる被験化学物質の場合、真の組織生存率は、被験化学物質に曝露した生存組織で得られた組織生存率（%）から%NSMTT を減じて算出される。最後に、極めてまれな状況でしか生じないと予測されるが、色による干渉も生じ得る直接的な MTT 還元物質は、処理後に組織に残留し、MTT を強力に還元して被験組織抽出物の OD（標準 OD 測定を使用）やピーク面積（UPLC/HPLC 分光光度法を使用）が分光光度計の直線範囲外になり評価できないことに留意されたい。

66. MTT ホルマザンを測定する場合、HPLC/UPLC 分光光度法は、あらゆる種類の被験化学物質（有色、無色、MTT 還元物質および非 MTT 還元物質）にも使用できる。HPLC/UPLC 分光光度法システムは多様であるため、組織抽出物由来の MTT ホルマザンの定量に使用する前に、米国食品医薬品局の生物学的分析法バリデーションに関する業界向けガイダンス（36）記載の、一連の標準適格性評価パラメータの判定基準を満たすことにより、HPLC/UPLC 分光光度法システムの適格性を実証すべきである。

© OECD, (2023)

有効な試験の基準

67. 有効な試験を実施するためには、以下の判定基準を満たす必要がある。

- 溶媒（陰性）または陽性対照で処理した2つの複製組織間の相対生存率の差は、20%を超えないこと。
- 非照射下で試験した溶媒（陰性）対照の生存率は、**表 2** に示した許容範囲内にあること。
- 非照射下で試験した溶媒（陰性）対照と比較して、照射下で試験した溶媒（陰性）対照の生存率は 80%以上であること。第 43 段落に記載されているように、この対照は細胞に過剰な照射感度がないことを実証する。
- 陽性対照は陽性の予測となること。

68. 各被験物質処理群において光毒性の可能性を評価するためには、以下の基準を満たす必要がある。

- 被験物質で処理した組織の非照射下における生存率は、最大推奨濃度である10%（100 mg/mL）または最大濃度が細胞毒性により制限される場合には最大耐量において、光毒性および非光毒性の両方を予測する能力を確保するのに十分高い値（例:生存率 35%超）でなければならない。

結果の解釈と予測モデル

69. 照射下で処理した 1 つ以上の試験濃度の相対生存率が、非照射下で処理した同濃度の相対生存率と比較して 30%以上低下した場合、その化学物質は**光毒性を有する**（または光毒性の可能性を有する）と予測される。

70. 照射下で処理したいずれの試験濃度の相対生存率も、非照射下で処理した同濃度の相対生存率と比較して 30%以上低下しない場合、その化学物質は**光毒性を有さない**（または光毒性の可能性を有さない）と予測される。

71. 試験濃度のいずれも光毒性の予測に至らず、濃度の少なくとも 1 つがカットオフ値の5%以内にある場合、および/または複製組織から一致しない結果が得られた場合、2 回目の測定を検討し、最初の 2 回の測定間で予測が一致しない場合は 3 回目の測定を検討する。この場合、光毒性の可能性の結果が認められた濃度に近い濃度範囲を検討することが推奨される。

© OECD, (2023)

データおよび報告:

データ

72. *データの質と量。*データの意味のある解析を可能にするため、照射下および非照射下での濃度反応を捕捉する適切な濃度を選択する必要がある。不確かな結果、境界域の結果、または不明確な結果は、さらに試験を実施して明らかにする。このような場合には、試験条件の変更（たとえば、試験濃度）を考慮すべきである。

73. 各測定について、個々の複製組織のデータ（たとえば、分類を含む各被験化学物質のOD値および算出された細胞生存率（%）データ）を、必要に応じて反復実験のデータを含めて報告すべきである。また、生細胞率平均値 ± 各測定における重複組織間の差を報告する。MTT試薬と有色被験化学物質で観察された相互作用は、各被験化学物質について報告すべきである。

試験報告書

74. 試験報告書には、以下の情報を含めること。

被験化学物質および対照物質:

- 単一成分物質：必要に応じ、また現実的に実施可能な場合、IUPAC 名または CAS 名、CAS 番号、SMILES または InChI コード、構造式、純度、不純物の化学的識別情報などでの化学物質の識別
- 多成分物質、UVCB、および混合物：可能な限り成分の化学的識別情報（上記参照）、定量的組成、関連のある物理化学的特性により特徴付ける。
- 物理的外観、水溶解度およびその他関連する物理化学的特性
- 入手可能な場合は供給元、ロット番号
- 該当する場合は、試験前の被験化学物質／対照物質の調製（加温、粉砕など）
- 判明している場合は、被験化学物質の安定性、使用期限、再分析日
- 保存条件
- 溶媒（溶媒の選択根拠、被験化学物質の溶媒に対する溶解性）

使用した RhE モデルおよびプロトコル（および該当する場合はその選択根拠）

- 使用した RhE モデル（バッチ番号を含む）
- 使用した特定の RhE モデルの性能を含む補足情報を記入する。これは、組織の開発者/供給者から分析証明書または QC 出荷報告書として提供される。以下が含まれるが、これらに限定されるものではない。
    - i) 生存率
    - ii) バリア機能
    - iii) 形態
    - iv) モデルの品質管理（QC）

© OECD, (2023)

- モデルの過去のデータの参照。これには、過去のバッチデータに関連する QC データの許容性が含まれるが、これに限定されない。
- 習熟度確認物質の試験による、試験法の実施における習熟度の記述。

試験条件：

- 測定装置（分光光度計など）の校正情報、ホルマザンの定量に用いる波長およびバンドパス（該当する場合）および測定装置の直線範囲。MTT ホルマザンの定量に用いる方法の説明。
- 該当する場合、HPLC/UPLC 分光光度法システムの適格性評価の説明
- 光源 - 照射条件：
  - 使用光源の選定根拠
  - 光源と放射計の製造者および種類
  - 光源の全分光照射特性
  - 使用するフィルターの透過および吸光度特性
  - 照射計の特性およびキャリブレーションの詳細
  - 試験系から光源までの距離
  - 上記距離から UVA 照射した量（単位:mW/cm^2）
  - 照射曝露時間
  - UVA 量（放射照度×時間）、J/cm^2 表示
  - 照射中の細胞培養液の温度、および同時に暗所に置く細胞培養液の温度。

試験手順：

- 使用した試験手順の詳細（曝露期間後に使用した洗浄手順を含む）
- 用いた被験化学物質および対照物質の用量
- 照射下および非照射下における被験化学物質濃度の設定根拠
- 溶媒/溶媒の種類および組成
- 曝露の時間、温度および曝露後の培養時間
- 該当する場合、直接的な MTT 還元物質および/または有色被験化学物質に用いる対照の表示
- 被験化学物質および対照（該当する場合、PC、溶媒（陰性）対照、NSMTT および NSCliving）ごとに使用した複製組織数
- 使用した RhE モデルに基づいて適用した判定基準/予測モデルの説明
- 試験手順（洗浄手順を含む）の変更の説明

測定および試験の判定基準：

- 陽性対照および溶媒（陰性）対照の複製組織間のばらつきの判定基準
- 溶媒（陰性）対照の OD 値の判定基準

© OECD, (2023)

- 非照射下に対する照射下での溶媒（陰性）対照の生存率に関する判定基準
- 陽性対照の判定基準

結果：

- 個々の被験化学物質のデータ（OD または MTT ホルマザンのピーク面積、組織生存率（%）、平均組織生存率（%）および組織間差を含む）の測定および複製測定ごとの表
- 該当する場合、OD または MTT ホルマザンピーク面積、%NSMTT、%NSCliving、最終補正相対生存率を含む、直接的な MTT 還元物質および/または有色被験化学物質に使用した対照の結果
- 規定された測定および試験の判定基準に関連して、被験化学物質および対照物質から得られた結果
- 観察されたその他の影響の説明
- 使用した予測モデル/判定基準を参照して導き出された分類

結果の考察

結論

© OECD, (2023)

参考文献

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 (EpiDermTM)] [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., 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™ 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)

Steiling, Winfried. (1999). A Proposed Strategy for Testing Phototoxicity by Stepwise Use of Validated In Vitro Methodolgies: The COLIPA Task Force on Phototoxicity In Vitro. COLIPA Symposium on Alternative methods 24-25 March 1999. Brussles, Belggim. 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 succssfully 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., Sapora, 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, (2023)

23) Jones, P.A., Lovell, W.W., King, A.V., Earl, L.K (2001) In vitro testing for phototoxic potential using the EpiDermTM 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 vitrophototoxicity 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 TiO_2 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, (2023)

34) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.

35) Stoien, 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

© OECD, (2023)

補遺 1：定義

混合物：互いに反応しない複数の化学物質からなる混合物または溶液（14）。

照射：W/m^2 または mW/cm^2 で測定した表面上の紫外線（UV）または可視光線の強度。

光の線量：表面積あたりのジュール（= W × s）（J/m^2 または J/cm^2 など）で表される、表面での紫外線（UV）または可視光線の照射量（=強度×時間）。

紫外線波長：CIE（国際照明委員会）が推奨する規格は以下の通り。**UVA**（315～400 nm）、**UVB**（280～315 nm）、**UVC**（100～280 nm）。他の規格も使用可能。UVB と UVA の区分は 320 nm であることが多く、UVA は約 340 nm を区分点として UV-A1 と UV-A2 に区分できる。

相対組織生存率：被験化学物質で処理していないが、全試験手順（+Irr または-Irr のいずれか）を行って採取した溶媒（陰性）対照との比較における組織生存率。

MEC（モル吸光係数）：特定の条件下（たとえば、溶媒、温度および波長）での任意の分子の定数であり、分子が光子を吸収できる効率を反映する（通常は $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ として表される）。

光毒性：特定の化学物質への皮膚の初回曝露およびそれに続く光曝露後に誘発される急性毒性反応、または同様に化学物質の全身投与後の皮膚照射により誘発される急性毒性反応。

正確性：試験法の結果と、容認されている基準値との一致の程度。試験法の性能を判断する尺度であり、妥当性の一側面である。この用語はしばしば、試験法の正しい結果の割合を意味する「一致率」と同義で用いられる（20）。

細胞生存率：細胞集団の全体的な活動性を測定するパラメータ。たとえば、細胞内ミトコンドリア脱水素酵素が生体染色色素 MTT（3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド、チアゾリルブルー）を還元する能力などである。測定されたエンドポイントおよび使用される試験デザインにもよるが、生細胞の総数および/または生存率と相関する。

化学物質：物質または混合物を意味する。
一致率：分類結果をもたらす試験法について、その試験法の性能を示す尺度であり、妥当性の一側面である。この用語は、正確性と同義で用いられることがあり、陽性または溶媒（すなわち陰性）として正しく分類されるすべての被験化学物質の割合として定義される。一致率は、試験する被験化学物質の種類における陽性率に大きく依存する（20）。

HPLC：高速液体クロマトグラフィー

IATA：試験および評価の総合的アプローチ

© OECD, (2023)

MTT：3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド、チアゾリルブルーテトラゾリウムブロマイド

陰性対照：「溶媒対照」を参照

NSCkilled：死亡組織における非特異的着色

NSCliving：生存組織における非特異的着色

NSMTT：非特異的 MTT 還元

性能基準（PS）：検証された試験法に基づく基準で、機械的および機能的に類似した提案された試験法の同等性を評価するための根拠となる。性能基準には、（i）試験法に不可欠な要素、（ii）バリデーション済み試験法の性能が許容されることを立証する際に用いられた化学物質の中から選抜された、参照物質の最小限のリスト、（iii）提案された試験法を参照物質の最小限のリストを用いて評価する際に示さなければならない、バリデーション済み試験法について得られたものと同等レベルの正確性と信頼度が含まれる（20）。

陽性対照（PC）：試験系のすべての構成要素を含み、陽性反応を誘導することが知られている物質で処理した複製試料。陽性対照反応の経時的な変動を確実に評価するために、陽性反応の大きさは過度であってはならない。

妥当性：試験とその対象となる作用との関連性、およびそれが特定の目的において意義や有用性があることの是非を説明するもの。これは、試験が対象となる生物学的作用を正しく測定または予測する程度である。妥当性には、試験法の正確性（一致率）の考察が組み込まれる（20）。

信頼性：同じプロトコルを用いて、試験を経時的に試験施設内および試験施設間で再現性よく実施できる程度の尺度。施設内および施設間再現性を算出し評価する（20）。

代替試験：有害性の同定および/またはリスク評価のために日常的に使用され、一般に認められている試験の代わりになるようにデザインされた試験で、試験対象になる可能性のあるすべての状況や化学物質に関して、認められている試験と比較して、ヒトまたは動物の健康や環境（該当する場合）に対する保護が同等かそれ以上であることが確認されているもの（20）。

測定：測定は、溶媒（陰性）対照および PC と同時に試験する 1 つ以上の試験化学物質で構成される。

感度：試験により正しく分類されたすべての陽性/活性被験化学物質の割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する上で考慮すべき重要な事項である（20）。

溶媒対照：被験化学物質を除く試験系の全成分を含む複製で、使用する溶媒を含むもの。これは、同じ溶媒に溶解した被験化学物質で処理した試料のベースライン反応を確立するために使

© OECD, (2023)

用し、本試験法では、データ分析における陰性対照として使用する。この試料を、被験物質で処理した試料および他の対照試料とともに手順を進める。

特異度：試験により正しく分類されたすべての陰性/不活性の被験化学物質の割合。断定的な結果をもたらす試験法の正確性を示す尺度であり、試験法の妥当性を評価する際の重要な考慮事項である（20）。

被験化学物質：「被験化学物質」という用語は、試験の対象物を指す場合に用いられる。

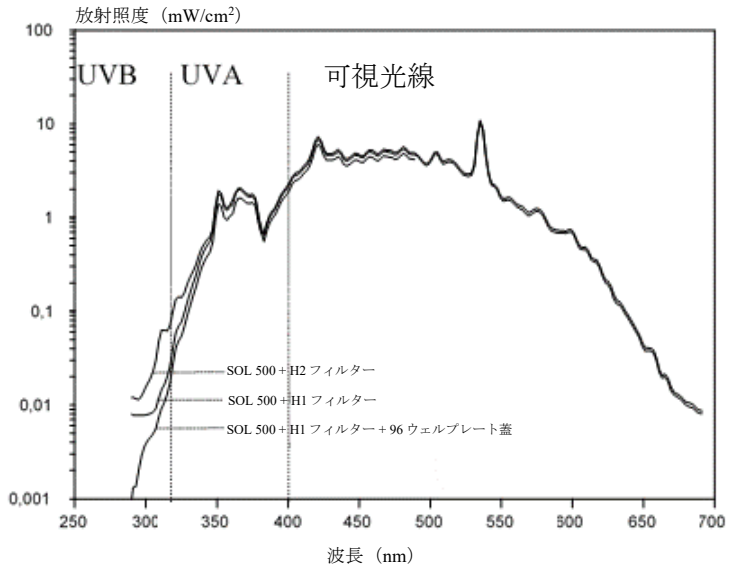
UPLC：超高速液体クロマトグラフィー

UVCB：組成が未知または変化する物質、複雑な反応生成物または生物学的物質。

© OECD, (2023)

補遺 2：光源の分光分布と RhE の照射感度の一例

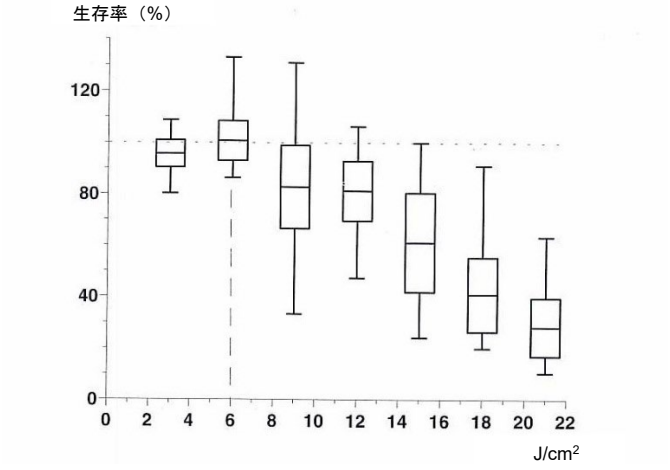
図 1.フィルタリングされたソーラーシミュレータのスペクトル分布



出典：Spielmann, H. *et al* (1998) (37)

図 1 は、フィルタリングしたソーラーシミュレータの許容可能なスペクトル分布を示す。これは、ドープされた金属ハロゲン光源のもので、3T3 NRU PT のバリデーション試験、ならびに EpiDerm 光毒性試験およびほとんどの追跡調査試験の事前バリデーションで使用されるものである。異なる 2 つのフィルターの効果および 96 ウェル細胞培養プレートの蓋の追加のフィルター効果を示す。H2 フィルターは、高量 UVB（皮膚モデル試験および赤血球光溶血試験）に忍容性がある試験系のみに用いた。3T3 NRU-PT では H1 フィルターを使用した。図は、プレート蓋の追加のフィルタリング効果が主に UVB 領域で観察されることを示しているが、照射スペクトルにはアミオダロンのように UVB 領域で通常吸収される化学物質を励起するのに十分な UVB が残っている。

図 2.RhE の照射感度（UVA 領域で測定）



© OECD, (2023)

出典：Liebsch *et al* (1998) (38)

Liebsch ら（1998）（38）が示したこの図は、非照射組織と比較して高濃度の UVA 照射に曝露した組織の反応を示している。MTT 変換試験を用いて相対生存率を求めた。各ボックスは、4 回の独立した実験で評価した 12 組織の平均値を示す。組織は 6 J/cm^2 の照射量に耐性を示し、過度の細胞毒性作用は認められなかった。照度は 1.7 mW/cm^2（の UVA）で、照射時間 10 分で 1 J となる。

© OECD, (2023)

補遺 3：被験物質溶媒の選定における留意事項

溶媒/溶媒：

開発および事前バリデーション時の試験（3）（38）において、水での溶解が不十分であった化学物質の溶媒および溶媒としてゴマ油を選択した。事前バリデーションに参加した他の試験施設でその他のいくつかの溶媒を検討したが（図 3）、最終実験にはゴマ油を選択した。油性の溶媒に加えて、水や油に容易に溶解し得ない成分に対しては、エタノールおよびアセトン：オリーブ油混液が提案された（5）（30）。

模擬太陽光の全スペクトルを十分に透過する溶媒を選択することが重要である（すなわち、溶媒が模擬太陽光スペクトル内にはっきりとした吸収を示さない）。さらに、組織表面の過剰な量の溶媒/溶媒が光保護層を形成する可能性があるため、推奨容量 50 µL を超えてはならない。

さらに、代替の溶媒/溶媒に対する 3D 組織の生物学的反応を評価すべきである。代替の溶媒/溶媒は、水で処理した組織の 70%を下回る組織の生存率低下を引き起こさないこと。

油性および水溶液（3）中のクロプロマジンを用いた実験および、油性およびエタノール溶液（3）（30）中のアントラセンを用いた試験で示されたように、化学物質の光効力（すなわち光毒性強度）は溶媒/溶媒により調節することができる。

図 3.3 種の油および DMI の吸収/透過スペクトル（%）

	M
13	

出典：Liebsch, M., (1998) (38)

© OECD, (2023)