KOMISSION DIREKTIIVI 2000/33/EY,

annettu 25 päivänä huhtikuuta 2000,

vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kahdennenkymmenennenseitsemännen kerran (*)

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 27 päivänä kesäkuuta 1967 annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY ([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 1999/33/EY ([2]), ja erityisesti sen 28 artiklan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Direktiivin 67/548/ETY liitteessä V säädetään menetelmistä aineiden ja valmisteiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, toksisuuden ja ekotoksisuuden määrittämiseksi. Kyseinen liite on mukautettava tekniikan kehitykseen.

(2) Kokeisiin ja muihin tieteellisiin tarkoituksiin käytettävien eläinten suojelua koskevien jäsenvaltioiden lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 24 päivänä lokakuuta 1986 annetun neuvoston direktiivin 86/609/ETY ([3]) 7 artiklan 2 kohdan säännösten mukaan ”koetta ei saa suorittaa, jos tavoitellun tuloksen saavuttamiseksi on mahdollista soveltaa jotakin toista tieteellisesti luotettavaa menetelmää, joka ei edellytä eläimen käyttöä”.

(3) Komissio aikoo lisätä direktiivin 67/548/ETY liitteeseen V uusia vaihtoehtoisia koemenetelmiä, joihin ei sisälly eläinten käyttöä, jotta sellaisia menetelmiä voitaisiin käyttää direktiivin 67/548/ETY 3 artiklan 1 kohdassa tarkoitettujen kemiallisten aineiden testaukseen.

(4) Tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat vaarallisten aineiden ja valmisteiden kaupan teknisten esteiden poistamiseksi annettujen direktiivien mukauttamista tekniikan kehitykseen käsittelevän komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Lisätään tämän direktiivin liitteen I ja II teksti direktiivin 67/548/ETY liitteessä V olevaan B osaan.

2 artikla

1. Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 1. lokakuuta 2001. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus, kun ne virallisesti julkaistaan. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten tällaiset viittaukset tehdään.

2. Jäsenvaltioiden on toimitettava komissiolle tässä direktiivissä tarkoitetuista kysymyksistä antamansa keskeiset kansalliset säännökset ja vastaavuustaulukko tämän direktiivin säännöksistä ja antamistaan kansallisista säännöksistä.

3 artikla

Tämä direktiivi tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä*.

4 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 25 päivänä huhtikuuta 2000.

Komission puolesta
Margot WALLSTRÖM
Komission jäsen

(*) Annettu ennen 26:tta mukauttamista.
([1]) EYVL 196, 16.8.1967, s. 1.
([2]) EYVL L 199, 30.7.1999, s. 57.
([3]) EYVL L 358, 18.12.1986, s. 1.

LIITE I

"B.40. IHOSYÖVYTTÄVYYS

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus (ECVAM, Euroopan komission Yhteinen tutkimuskeskus) on validoinut tieteellisesti kaksi *in vitro* ihosyövyttävyystestiä, rotan ihon sähkövastusmäärityksen (transcutaneous electrical resistance, TER) ja ihmisihomallitestin (1) (2) (3). ECVAMin validointitutkimuksessa osoitettiin, etta molemmilla testeillä voidaan erottaa luotettavasti tunnetut ihoa syövyttävät kemikaalit ja sellaiset kemikaalit, jotka eivät syövytä ihoa. Lisäksi ihmisihomalliin perustuvalla tutkimuksella voitiin erottaa eriasteinen ihosyövyttävyys (ihoa voimakkaasti syövyttävät aineet, R35, ja ihoa syövyttävät aineet, R34) (2). Seuraavassa esitetään molemmat testit ja niiden suoritusmenetelmät. Käytättävä testi valitaan käyttäjän erityisvaatimusten ja mahdollisuuksien mukaan.

Ks. myös osan B Yleisjohdanto.

1.2 Begriffsbestimmung

Ihosyövyttävyys (ihokorroosio): palautumattoman kudosvaurion ilmeneminen ihossa testiaineen aplikaation jälkeen.

1.3 Vertailuaineet

Vertailuaineita ei täsmennetä. Ks. kuitenkin kohdat 1.5.3.4 ja 1.7.2.3.

1.4 Testimenetelmän periaate — rotan ihon sähkövastusmääritys

Testiainetta aplikoidaan enintään 24 tunnin ajan inhimillisellä tavalla lopetetuista nuorista rotista otettujen ihonäytteiden orvaskesipinnalle. Aineen katsotaan olevan syövyttävä, jos se rikkoo marraskeden ja tuhoaa sen suojavaikutuksen, mikä mitataan ihon suhkövastuksen pienenemisenä tietyn raja-arvon (5 kΩ) alapuolelle (4) (5). Ärsyttävät ja ei-ärsyttävät aineet eivät pienennä ihon sähkövastusta raja-arvon alapuolelle. Pinta-aktiivisia aineita ja neutraaleja orgaanisia aineita (ks. määritelmä viitteessä 6) tutkittaessa testimenetelmään voidaan lisätä väriaineensitomisvaihe, jolla voidaan vähentää erityisesti kyseisen tyyppisillä kemikaaleilla saatujen väärien positiivisten tulosten määrää (2) (7).

1.5 Testimenetelmän kuvaus — rotan ihon sähkövastusmääritys

1.5.1 *Eläimet*

Ihonäytteiden valmistusta varten tarvitaan nuoria (20—23 päivän ikäisiä) rottia (Wistar tai vastaava kanta). Selästa ja kyljistä ajetaan karvat tarkasti pienillä eläinten karvaleikkureilla. Eläimet pestään pyyhkimällä huolellisesti, ja näytteenottoaluetta käsitellään runsaalla määrällä antibioottiliuosta (jossa on bakteerikasvua tehokkaasti estävät pitoisuudet esim. streptomysiiniä, penisilliiniä, kloramfenikolia ja amfoterisiiniä). Eläimet pestään jälleen antibioottiliuoksella kolmantena tai neljäntenä päivänä ensimmäisen pesun jälkeen ja käytetään kokeisiin kolmen päivän sisällä (eläimet eivät saa olla 31 päivää vanhempia ihonäytteitä otettaessa).

1.5.2 *Ihonäytteiden valmistus*

Eläimet lopetetaan inhimillisesti. Kunkin eläimen selkänahka poistetaan ja nahasta kuoritaan ylimääräinen rasva huolellisesti. Nahka asetetaan polytetrafluoroeteeni-(PTFE) putken toisen pään yli siten, etta orvaskesipinta on kosketuksissa putken kanssa. Nahkanäyte kiristetään paikalleen kumisella O-renkaalla, ja liika nahka leikataan pois. Kuvassa 1 esitetään putken ja O-renkaan mitat. O-rengas tiivistetään huolellisesti PTFE-putken päähan vaseliinilla. Putki kiinnitetään jousipidikkeellä koeastian sisälle, jossa on magnesiumsulfaattiliuosta (154 mM) (Kuva 2).

1.5.3 *Testin suoritus*

1.5.3.1 Testiaineen aplikoiminen

Nestemäiset testiaineet (150 µl) aplikoidaan putken sisäpuolella olevalle orvaskesipinnalle (Kuva 2). Kun testataan kiinteitä aineita, ainetta on pantava näytepalan päälle riittävä määrä, että se peittää koko orvaskesipinnan. Kiinteän aineen päälle lisätään sitten deionisoitua vettä (150 µl) ja putkia ravistellaan varovasti. Testiaineiden on oltava mahdollisimman hyvin kosketuksissa ihon kanssa. Joitakin kiinteitä aineita voidaan tämän saavuttamiseksi lämmittää aina 30 °C:een testiaineen sulattamiseksi tai jauhaa rakeiseen tai jauhemaiseen muotoon.

Kutakin testiainetta varten käytetään kolme ihonäytettä. Testiaineita aplikoidaan 24 tunnin ajaksi (ks. myös 1.5.3.4). Testiaine poistetaan pesemällä vesihanan alla enintään 30 °C:n lämpötilassa, kunnes ainetta ei enää irtoa. Jos testiaineet ovat jähmettyneet putkessa, niiden irtoamista voi auttaa noin 30 °C:n lämminvesisuihkulla.

1.5.3.2 Ihon sähkövastusmittaus

Ihon sähkövastus mitataan matalajännitevaihtovirtasillalla (esim. AIM 401 tai 6401 tai vastaava). Ennen sähkövastuksen mittausta ihon pintajännitystä pienennetään lisäämällä putkeen 70-prosenttista etanolia riittävästi orvaskeden peittämiseksi. Etanoli poistetaan muutaman sekunnin kuluttua kääntämällä putki ylösalaisin, ja kudos hydratoidaan lisäämällä 3 ml magnesiumsulfaattiliuosta (154 mM). Mittaussillan elektrodit asetetaan ihonäytteen molemmille puolille vastuksen mittaamiseksi kilo-ohmeina (kΩ) ihonäytettä kohti (Kuva 2). Elektrodien mitat ja hauenleukapidikkeen alapuolella olevan elektrodin pituus esitetään kuvassa 1. Sisemmän (paksun) elektrodin pidike pidetään mittauksen aikana PTFE-putken päällä sen varmistamiseksi, että sama pituusmäärä elektrodia on upotettuna magnesiumsulfaattiliuokseen. Ulompi (ohut) elektrodi asetetaan koeastian sisälle siten, että se lepää astian pohjalla. Jousipidikkeen pohjan ja PTFE-putken pohjan välinen etäisyys pidetään vakiona (Kuva 1), koska tämä etäisyys vaikuttaa mitattavaan vastuksen arvoon.

Jos mitattu vastuksen arvo on yli 20 kΩ, se voi johtua siitä, että testiaine kyllästää ihonäytteen orvaskesipinnan. Tätä kerrosta voidaan yrittää poistaa esim. sulkemalla PTFE-putki peukalolla (hansikas kädessä) ja ravistelemalla putkea noin 10 sekuntia; magnesiumsulfaattiliuos heitetään pois ja vastusmittaus toistetaan tuoreen magnesiumsulfaattiliuoksen kanssa.

Ihon sähkövastusmittausten keskiarvot hyväksytään, jos samaan aikaan mitatut positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden arvot ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa. Suositellut kontrolliaineet ja niiden hyväksyttävät vastusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita ovat:

Kontrolli	Aine	Vastuualue (kΩ)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo (36 %)	0,5—1,0
Negatiivinen	Tislattu vesi	10—25

1.5.3.3 Muunnettu menetelmä pinta-aktiivisille aineille ja neutraaleille orgaanisille aineille

Jos testiaineet ovat pinta-aktiivisia aineita tai neutraaleja orgaanisia aineita ja niillä saatavat ihon sähkövastusarvot ovat enintään 5 kΩ, voidaan määrittää väriaineen tunkeutuminen kudokseen. Siten selvitetään, ovatko tulokset vääriä positiivisia (2).

1.5.3.3.1 Sulforodamiini B -väriaineen aplikaatio ja poistaminen

Kun ihoa on ensin käsitelty testiaineella, kunkin ihonäytteen orvaskesipinnalle aplikoidaan 2 tunniksi 150 µl 10-prosenttista (paino/tilavuus) sulforodamiini B -liuosta tislatussa vedessä. Ihonäytteitä pestään sen jälkeen vesihanan alla huoneenlämpötilassa n. 10 sekuntia liian tai sitoutumattoman väriaineen poistamiseksi. Ihonäytteet poistetaan varovasti PTFE-putkista ja pannaan pulloon (esim. 20 ml:n lasinen tuikelaskentapullo), jossa on deionisoitua vettä (8 ml). Pulloja ravistellaan varovasti 5 minuuttia mahdollisen liian tai sitoutumattoman väriaineen poistamiseksi. Huuhtelu toistetaan. Ihonäytteet otetaan pulloista, pannaan toisiin pulloihin, joissa on 5 ml 30-prosenttista (paino/tilavuus) natriumdodekyylisulfaattia (SDS) tislatussa vedessä ja inkuboidaan yli yön 60 °C:ssa. Inkubaation jälkeen ihonäytteet otetaan pulloista ja heitetään pois. Jäljellä olevaa liuosta sentrifugoidaan 8 minuuttia 21 °C:ssa (suhteellinen keskipakoisvoima ∼ 175). Supernatantista otetaan 1 ml:n näyte, joka laimennetaan 1:5:een (tilavuus/tilavuus) [ts. 1 ml + 4 ml] 30-prosenttisella (paino/tilavuus) SDS:llä tislatussa vedessä. Liuoksen optinen tiheys (OD) mitataan aallonpituudella (noin) 565 nm.

1.5.3.3.2 Väriaineen pitoisuuden laskeminen

Sulforodamiini B -väriaineen pitoisuus ihonäytteessä lasketaan OD-arvoista (sulforodamiini B:n molaarinen ekstinktiokerroin aallonpituudella 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekyylipaino = 580). Sulforodamiini B-pitoisuus määritetään kullekin ihonäytteelle, ja rinnakkaismäärityksille lasketaan keskiarvo. Väriaineen sitoutumiskokeen keskiarvotulokset hyväksytään, jos samaan aikaan tehtyjen kontrolliaineiden määritysten tulokset ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa. Suositellut kontrolliaineiden hyväksyttävät väriainepitoisuusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita ovat:

Kontrolli	Aine	Väriaineen pitoisuusalue (µg/ihonäyte)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo (36 %)	40—100
Negatiivinen	Tislattu vesi	15—35

1.5.3.4 Lisätietoja

Testiaineet voidaan myös aplikoida ihonäytteille lyhyemmäksi ajaksi (esim. 2 tunniksi), jos halutaan selvittää, mitkä aineet ovat erittäin syövyttäviä. Validointitutkimuksessa havaittiin kuitenkin, että ihon sähkövastuskoe, jonka avulla voitiin erottaa oikein syövyttävät ja ei-syövyttävät aineet 24 tunnin aplikaation jälkeen, yliarvioi useiden testikemikaalien syövyttävyyden, kun niitä aplikoitiin ihonäytteille 2 tunniksi (2).

Testauslaitteiden ominaisuudet ja mitat sekä koemenetelmä voivat vaikuttaa saatuihin ihon sähkövastusarvoihin. Viiden kΩ:n syövyttävyysraja saatiin tässä ohjeessa selostetuilla erityislaitteilla ja -menetelmällä saatujen tulosten perusteella. Jos testiolosuhteita muutetaan merkittävästi, voi olla tarpeen käyttää eri raja- ja kontrolliarvoja. Siksi suositellaan, että menetelmä ja vastuksen raja-arvo kalibroidaan testaamalla sarja vertailustandardeja, jotka on valittu validointitutkimuksessa käytettyjen kemikaalien joukosta (3).

1.6 **Testimenetelmän periaate — ihmisihomallimääritys**

Testiainetta aplikoidaan enintään 4 tunniksi kolmiulotteiseen ihmisihomalliin, jossa on rekonstruoitu orvaskesi ja toimiva marraskesi. Syövyttäviksi aineiksi katsotaan aineet, jotka vähentävät solujen elävyyden (määritettynä esim. MTT-pelkistyskokeella) määriteltyjen raja-arvojen alapuolelle tiettyjen altistusaikojen jälkeen. Määritys perustuu olettamukseen, että syövyttävät kemikaalit pystyvät tunkeutumaan marrasketeen (diffundoitumalla tai eroosion seurauksena) ja ovat niin myrkyllisiä soluille, että aiheuttavat solukuolemaa alla olevissa solukerroksissa.

1.7 **Testimenetelmän kuvaus —ihmisihomallimääritys**

1.7.1 *Ihmisihomallit*

Ihmisihomallit voivat olla peräisin eri lähteistä, mutta niiden on täytettävä tietyt vaatimukset. Mallissa on oltava toimiva marraskesi, jonka alla on kerros eläviä soluja. Marraskeden suojaavan vaikutuksen on oltava riittävä. Tämä voidaan osoittaa toteamalla, että sellaisten aineiden aplikointi, joiden tiedetään olevan myrkyllisiä soluille mutta jotka eivät normaalisti tunkeudu marraskeden läpi, ei aiheuta sytotoksisia vaikutuksia ihomalliin. On osoitettava, että mallilla saadaan toistettavia tuloksia määrätyissä koeolosuhteissa.

Mallin elävien solujen elinkelpoisuuden on oltava riittävä positiivisten ja negatiivisten kontrolliaineiden erottamiseen. Kun malli altistetaan negatiiviselle kontrolliaineelle, solujen elinkelpoisuuden (mitattuna esim. MTT:n pelkistyksen avulla eli OD-arvona) on oltava kyseiselle mallille hyväksyttyjen rajojen sisällä. Samoin positiiviselle kontrolliaineelle altistettujen solujen elävyyden (verrattuna negatiivisen kontrollin arvoihin) on oltava määritellyissä rajoissa. Tärkeintä on, että käytetyn ennustemallin osoitetaan täyttävän kansainväliset validointivaatimukset (2).

1.7.2 *Testin suoritus*

1.7.2.1 Testiaineen aplikoiminen

Nestemäistä testiainetta aplikoidaan määrä, mikä peittää ihonpinnan (vähintään 25 µl/cm^2). Kiinteää testiainetta aplikoidaan määrä, mikä peittää ihonpinnan, ja ainetta pitäisi kostuttaa, jotta se olisi hyvin kosketuksissa ihoon. Tarvittaessa kiinteät aineet on jauhettava aplikointia varten. On osoitettava, että aplikaatiomenetelmä sopii monenlaisille kemikaalityypeille (2). Altistuksen päättyessä testiaine pestään huolellisesti ihon pinnalta suolaliuoksella.

1.7.2.2 Sulujen elinkykyisyysmittaukset

Solujen elävyyden määrittämiseksi voidaan käyttää mitä tahansa kvantitatiivista ja validoitua menetelmää. Tavallisin määritysmenetelmä on MTT:n pelkistys, jonka on osoitettu antavan tarkkoja ja toistettavia tuloksia eri laboratorioissa (2). Ihonäyte pannaan MTT-liuokseen, 0,3 mg/ml, 20—28 °C:n lämpötilassa 3 tunniksi. Saostunut sininen formatsaani uutetaan (liuotinuutolla), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD aallonpituudella 545—595 nm.

1.7.2.3 Lisätietoja

Käytetty ihomalli sekä altistusajat ja pesuohjelmat vaikuttavat huomattavasti solujen elävyyteen. Menetelmä ja ennustemalli on suositeltavaa kalibroida testaamalla sarja vertailustandardeja, jotka on valittu ECVAMin validointitutkimuksessa käytettyjen kemikaalien joukosta (3). On tärkeää, että käytetyn menetelmän on osoitettu olevan toistettava laboratorioissa ja niiden välillä useille kemikaaleille kansainvälisten standardien mukaisesti. Menetelmän on vähintäänkin täytettävä tieteelliselle validiteetille aiemmin määritellyt vaatimukset (2), ja tällaisen validointitutkimuksen tulokset on julkaistava referee-käytäntöä noudattavassa tieteellisessä aikakauslehdessä.

2. MITTAUSTULOKSET

2.1 Tulosten käsittely

2.1.1 *Rotan ihon sähkövastusmääritys*

Testiaineiden, positiivisten ja negatiivisten kontrollien ja mahdollisten vakiovertailukemikaalien vastusarvot (kΩ) olisi esitettävä taulukkomuodossa, ja myös tulokset rinnakkaiskokeista tai toistetuista kokeista, keskiarvot ja tuloksena johdettu luokitus olisi esitettävä.

2.1.2 *Ihmisihomallimääritys*

Testiaineiden, positiivisten ja negatiivisten kontrollien ja mahdollisten standardien vakiovertailukemikaalien OD-arvot ja lasketut prosentuaaliset solujen elävyydet olisi esitettävä taulukkomuodossa, ja myös tulokset rinnakkaiskokeista tai toistetuista kokeista, keskiarvot ja tuloksena johdettu luokitus olisi esitettävä.

2.2 Tulosten arviointi ja tulkinta

2.2.1 *Rotan ihon sähkövastusmääritys*

Jos testiaineelle saatu ihon sähkövastusarvo on yli 5 kΩ, aine ei ole syövyttävä. Jos testiaineelle saatu ihon sähkövastusarvo on enintään 5 kΩ, eikä testiaine ole pinta-aktiivinen aine tai neutraali orgaaninen aine, testiaine on syövyttävä.

Jos pinta-aktiivinen aine tai neutraali orgaaninen aine antaa enintään 5 kΩ:n ihon sähkövastusarvoja, aineelle voidaan tehdä väriaineen tunkeutumiskoe. Jos ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on vähintään sama kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (36 % HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus, testiaine on oikeasti positiivinen ja siis syövyttävä. Jos ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on pienempi kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (36 % HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus, testiaine on väärä positiivinen, eikä siis ole syövyttävä.

2.2.2 *Ihmisihomallimääritys*

Negatiivisen kontrollin OD-arvo edustaa 100 % solujen elävyyttä. Siksi kullekin testinäytteelle saaduista OD-arvoista voidaan laskea solujen elinkykyisyys prosentteina negatiivisesta kontrollista. Prosentuaalinen solujen elävyyden raja-arvo, jolla erotetaan syövyttävät testiaineet ei-syövyttävistä (tai eri syövyttävyysluokat), on määriteltävä selvästi ennustemallissa ennen menetelmän validointia, ja sen jälkeen tehtävässä validointitutkimuksessa on osoitettava, että erottava raja-arvo on asianmukainen (2).

3. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Testiraportti

Testiraportissa on esitettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

— tunnistetiedot, fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet. Nämä tiedot on esitettävä myös mahdollisesti käytetyistä vertailuaineista.

Testiolosuhteet:

— käytetty testimenetelmä yksityiskohtaisesti

— mahdolliset muutokset ja niiden perustelut.

Tulokset:

— taulukoidaan vastusarvot (ihon sähkövastuskokeesta) tai prosentuaalinen solujen elävyys (ihmisihomallimäärityksestä) testiaineelle, positiiviselle ja negatiiviselle kontrollille ja mahdollisille vertailukemikaaleille sekä tulokset rinnakkaiskokeista tai toistetuista kokeista ja keskiarvot,

— kuvataan mahdolliset muut havaitut vaikutukset.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

4. **VIITTEET**

(1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, s. 275-280.

(2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, s. 483-524.

(3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, s. 471-482.

(4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, s. 507-512.

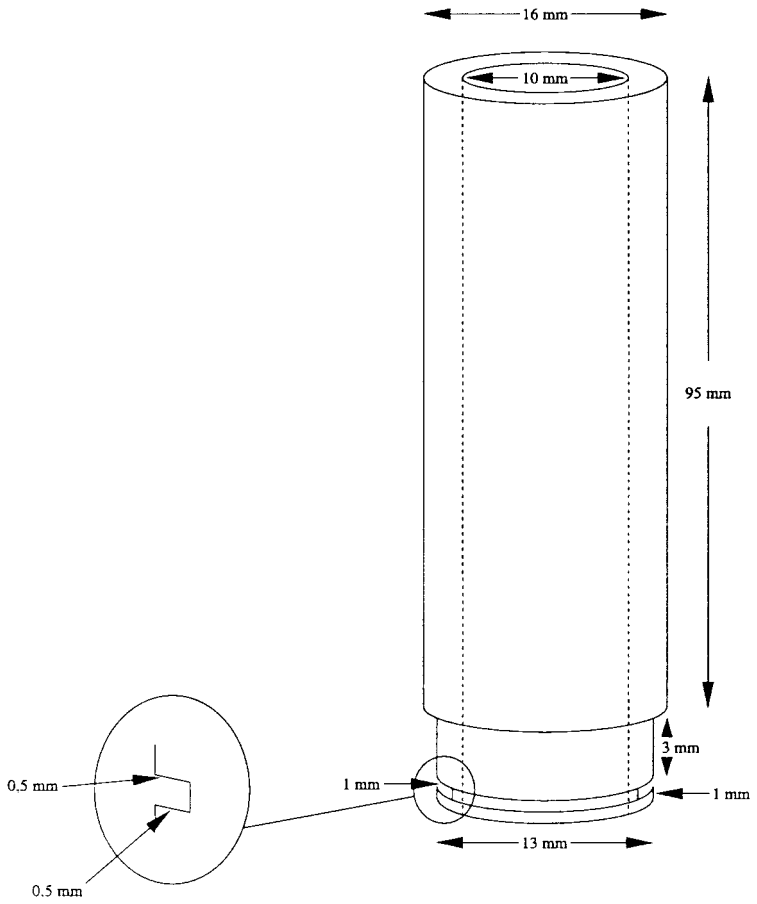
(5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, s. 191-194.

(6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, s. 709-720.

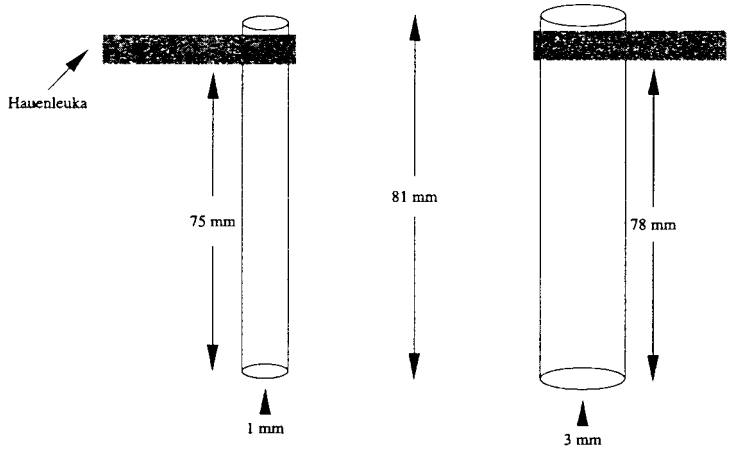
(7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, s. 219-255.

Kuva 1

PTFE-putken mitat

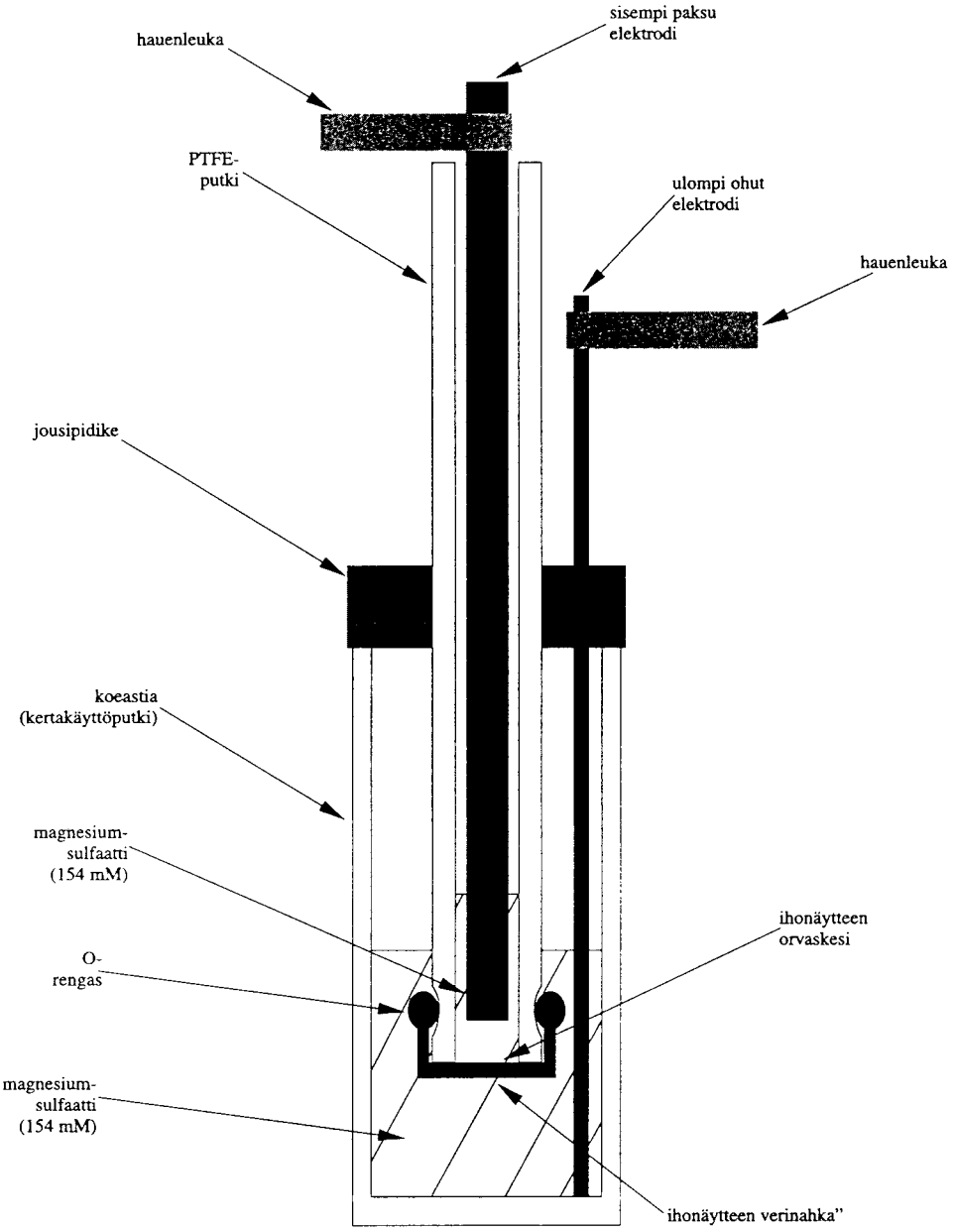


Elektrodien mitat



Kuva 2

Rotan ihon sähkövastuksen määrityslaite



LIITE II

"B.41 VALOMYRKYLLISYYS — *IN VITRO* 3T3 NRU — VALOMYRKYLLISYYSTESTI

1 MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Valomyrkyllisyys määritellään toksiseksi vasteeksi, joka ilmenee sen jälkeen, kun iho on ensin altistunut tietyille kemikaaleille ja sen jälkeen valolle tai jonka kemikaali aiheuttaa ihoa säteilytettäessä aineen päästyä systeemisesti elimistöön.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestillä saadun informaation avulla voidaan tunnistaa testiaineen valomyrkyllisyystaipumus, ts. voiko testiaine yhdessä UV-valolle ja näkyvälle valolle tapahtuvan altistuksen kanssa aiheuttaa vauriota.

Koska valomyrkyllisyys määritetään *in vitro* -testissä kemikaalin ja valon yhteisvaikutuksesta aiheutuvana fotosytotoksisuutena, testillä voidaan tunnistaa sekä yhdisteitä, jotka ovat valomyrkyllisiä *in vivo* elimistöön annettuna ja ihoon jakautuneina, että yhdisteitä, jotka ovat valoärsyttäviä sen jälkeen, kun niitä on aplikoitu iholle paikallisesti.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystesti kehitettiin ja validoitiin EU:n ja COLIPAn (Eurooppalainen kosmetiikka- ja hajuvesivalmisteyhdistys) yhteisessä hankkeessa vuosina 1992—1997 (1) (2) (3). Tarkoituksena oli kehittää validi *in vitro* -vaihtoehto erilaisille käytössä oleville *in vivo* -testeille. Vuonna 1996 OECD:n työryhmässä suositeltiin vaiheittaiseen *in vitro* -testaukseen perustuvaa lähestymistapaa valomyrkyllisyyden määrittämiseksi (4).

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin tuloksia verrattiin akuutteihin valomyrkyllisyys- ja valoärsytysvaikutuksiin eläimillä ja ihmisillä *in vivo*, ja testin osoitettiin ennustavan erinomaisesti näitä vaikutuksia. Testin tarkoituksena ei ole ennustaa muita kemikaalien ja valon yhteisvaikutuksesta aiheutuvia haitallisia vaikutuksia, esim. fotogenotoksisuutta, valoallergiaa ja fotokarsinogeenisuutta, vaikka monet tällaisia erityisominaisuuksia omaavat kemikaalit reagoivat positiivisesti *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä. Testi ei pysty arvioimaan aineen valomyrkyllisyyspotenssia kvantitatiivisesti.

Lisäyksessä esitetään vaiheittainen lähestymistapa kemikaalien valomyrkyllisyyden määrittämiseksi.

1.2 Määritelmät

Säteilyvoimakkuus: pintaan kohdistuvan ultraviolettivalon (UV) tai näkyvän valon (VIS) intensiteetti mitattuna watteina neliömetriä kohti tai watteina neliösenttimetriä kohti (W/m^2 tai mW/cm^2).

Valoannos: pintaan kohdistuvan ultraviolettisäteilyn (UV) tai näkyvän valon säteilyn määrä (= intensiteetti × aika) ilmaistuna jouleina (= W × s) pinta-alayksikköä kohti, esim. J/m^2 tai J/cm^2.

UV-valon aallonpituusalueet: Kansainvälisen valaistustoimikunnan (ICI) suosittelemat nimitykset ovat: UVA (315—400 nm), UVB (280—315 nm) ja UVC (100—280 nm). Muitakin määritelmiä käytetään: UVB- ja UVA-alueen raja asetetaan usein 320 nanometriin ja UVA-alue voidaan jakaa alueisiin UV-A1 ja UV-A2, jolloin raja on noin 340 nanometrissä.

Solujen elävyys: muuttuja, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta (esim. neutraalipunan ottoa solujen lysosomeihin), joka mittaussuureesta ja testimenetelmästä riippuen korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

Suhteellinen solujen elävyys: solujen elävyys ilmaistuna suhteessa negatiivisiin kontrolleihin (liuotinkontrolleihin), jotka käyvät läpi testin muuten (joko + UV tai − UV), mutta joita ei ole käsitelty testikemikaalilla.

Ennustemalli: algoritmi, jonka avulla myrkyllisyystestin tulokset muunnetaan ennusteeksi myrkyllisyyspotentiaalista. Tässä ohjeessa voidaan käyttää PIF:iä ja MPE:tä in vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin tulosten muuntamiseen valomyrkyllisyyspotentiaaliennusteeksi.

PIF (valoärsyttävyystekijä): tekijä, joka muodostetaan vertaamalla testikemikaalin kahta yhtä tehokasta solumyrkyllisyyspitoisuutta (EC_{50}), jotka on saatu, kun soluja säteilytetään UVA-/näkyvällä valolla (+ UV), joka ei ole solumyrkyllistä, ja kun soluja ei säteilytetä (− UV).

MPE (keskimääräinen valovaikutus): uusi suure, joka saadaan analysoimalla matemaattisesti kokonaan kaksi pitoisuus—vaste—kuvaajaa, jotka on saatu, kun soluja säteilytetään UVA-/näkyvällä valolla, joka ei ole solumyrkyllistä, ja kun soluja ei säteilytetä (− UV).

Valomyrkyllisyys: akuutti toksinen vaste, joka ilmenee sen jälkeen, kun iho on ensimmäisen kerran altistettu tietyille kemikaaleille ja sen jälkeen valolle, tai jonka ihon säteilytys aiheuttaa samalla tavalla sen jälkeen, kun kemikaalia on annettu elimistöön.

Valoärsyttävyys: valomyrkyllisyyden alakäsite, jota käytetään vain sellaisista valomyrkyllisistä reaktioista, jotka ilmenevät ihossa (paikallisesti tai suun kautta annetulle) kemikaalille altistumisen jälkeen. Tällaiset valomyrkylliset reaktiot aiheuttavat aina epäspesifistä solutuhoa (auringonpolttaman tapaisia reaktioita).

Valoallergia: hankittu immunologinen reaktiivisuus, joka ei ilmene ensimmäisen kemikaali- ja valokäsittelyn yhteydessä ja joka tarvitsee yhden tai kahden viikon induktioajan ennen kuin reaktiivisuus voidaan osoittaa.

Fotogenotoksisuus: genotoksinen vaste, joka havaitaan genotoksisuusmäärityksellä ja joka ilmenee altistettaessa soluja sellaiselle UV-/näkyvän valon annokselle, joka ei ole genotoksinen, ja kemikaalille, joka ei ole genotoksinen.

Fotokarsinogeenisuus: toistuvalla valo- ja kemikaalialtistuksella aiheutettu karsinogeenisuus. Termiä 'foto-kokarsinogeneesi' käytetään, jos kemikaali voimistaa UV-valon aiheuttamaa tuumorigeneesiä.

1.3 Vertailuaineet

Kun 3T3 NRU -valomyrkyllisyystesti otetaan käyttöön, suositellaan, että positiivisena kontrollina käytetyn, klooripromatsiinin, joka olisi testattava samanaikaisesti jokaisessa määrityksessä, lisäksi käytetään vertailukemikaaleina joitakin tämän testin yhteydessä laboratorioiden välisissä vertailuissa käytetyistä kemikaaleista (1) (3) (13).

1.4 Alustavia huomioita

Useantyyppisten kemikaalien on ilmoitettu olevan valomyrkyllisiä (5) (6) (7) (8). Niiden ainoa yhteinen ominaisuus on kyky absorboida valoenergiaa auringonvalon spektrialueella. Valokemian ensimmäisen lain (Grotthaus-Draperin laki) mukaan valoreaktio edellyttää riittävää valokvanttien absorptiota. Tämä merkitsee sitä, että ennen kuin harkitaan tämän ohjeen mukaista biologista testausta, testikemikaalin UV-valon ja näkyvän valon absorptiospektri olisi määritettävä (esim. OECD:n testiohjeen 101 mukaisesti). Jos kemikaalin mooliekstinktio- tai absorptiokerroin on pienempi kuin 10 $1 \times mol^{-1} \times cm^{-1}$, kemikaalilla ei ole valoreaktiokykyä eikä sitä tarvitse testata *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestillä tai millään muulla haitallisia valokemiallisia vaikutuksia määrittävällä biologisella testillä (Lisäys).

1.5 Testimenetelmän periaate

Tunnetaan neljä mekanismia, joilla valomyrkyllisyysvaste voi syntyä, kun (kemiallinen) kromofori absorboi valoa (7). Kaikista aiheutuu soluvaurioita. Sen vuoksi *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystesti perustuu kemikaalin solumyrkyllisyyden vertaamiseen, kun kemikaalia testataan altistettaessa sellaiselle UVA- tai näkyvälle valolle, joka ei ole solumyrkyllinen, ja ilman tällaista valoaltistusta. Solumyrkyllisyys ilmaistaan tässä testissä pitoisuudesta riippuvana neutraalipunan (9) soluunoton/kertymisen vähenemisenä 24 tuntia kemikaalikäsittelyn ja säteilytyksen jälkeen.

Balb/c 3T3 -soluja viljellään 24 tuntia yhden solun vahvuisen kerroksen aikaansaamiseksi. Kutakin testikemikaalia kohti inkuboidaan aluksi yhden tunnin ajan kahta 96 kuopan levyä, joissa on kahdeksaa eri pitoisuutta testattavaa kemikaalia. Sen jälkeen toinen levyistä altistetaan ei-solumyrkylliselle UVA-valon ja näkyvän valon annokselle 5 J/cm^2 UVA:ta (+ UV-koe), ja toinen levy pidetään pimeässä (− UV-koe). Sitten kummankin levyn käsittelyneste korvataan viljelynesteellä, inkuboidaan toiset 24 tuntia, ja määritetään solujen elävyys neutraalipunan ottona (NRU) kolmessa tunnissa. Suhteellinen solujen elävyys, joka ilmaistaan prosenttiosuutena käsittelemättömistä negatiivisista kontrolleista, lasketaan kullekin kahdeksalle testipitoisuudelle. Valomyrkyllisyyskyvyn ennustamiseksi verrataan pitoisuusvasteita, jotka on saatu UV-säteilytyksen kanssa (+ UV) ja ilman sitä (− UV), yleensä EC_{50} -tasolla, ts. siinä pitoisuudessa, joka vähentää solujen elävyyttä 50 prosentilla verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin.

1.6 Laatuvaatimukset

Solujen herkkyys UVA-valolle, solujen aiempaa käyttöä koskevat tiedot: solujen herkkyys UVA-valolle on tarkistettava säännöllisesti. Soluja pannaan viljelyyn samassa tiheydessä, jota käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä, säteilytetään seuraavana päivänä UVA-valoannoksilla, joiden suuruus on 1—9 J/cm^2, ja määritetään solujen elävyys päivää myöhemmin NRU-määrityksellä. Solut täyttävät laatuvaatimukset, jos niiden elävyys UVA-säteilytyksen jälkeen, jonka voimakkuus on 5 J/cm^2, on vähintään 80 % pimeässä pidettyjen kontrollien elinkykyisyydestä. Suurimmalla UVA-annoksella 9 J/cm^2 elävyyden pitäisi olla vähintään 50 % pimeässä pidettyjen kontrollien elävyydestä. Tämä tarkistus olisi tehtävä suunnilleen joka 10. kerta soluja siirrostettaessa.

Negatiivisten kontrollisolujen UVA-herkkyys, nykyinen testi: testi täyttää laatuvaatimukset, jos negatiivisten kontrollien (Earlen tasapainotetussa suolaliuoksessa, EBSS, jossa on tai ei ole 1 % dimetyylisulfoksidia, DMSO, tai 1 % etanolia, EtOH, olevat solut) elävyys + UVA-kokeessa on vähintään 80 % samassa liuottimessa olevien säteilyttämättömien solujen elinkykyisyydestä samaan aikaan tehdyssä pimeäkokeessa (− UVA).

Negatiivisten kontrollien elävyys: negatiivisten kontrollien neutraalipunauutteesta mitattu absoluuttinen optinen tiheys ($OD_{540\ NRU}$) osoittaa, ovatko kuoppaa kohti aplikoidut 1×10^4 solua lisääntyneet normaalilla nopeudella määritykseen kuuluvien kahden päivän aikana. Testi täyttää hyväksymisvaatimukset, jos käsittelemättömien kontrollien keskimääräinen $OD_{540\ NRU}$ on ≥ 0,2.

Positiivinen kontrolli: kussakin *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä on testattava samanaikaisesti jokin tunnetusti valomyrkyllinen kemikaali. EU/COLIPA-validointitutkimuksessa käytettiin positiivisena kontrollina klooripromatsiinia (CPZ), jota sen vuoksi suositellaan. CPZ:n testaukselle *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyyden standardiprotokollassa määriteltiin seuraavat hyväksyntävaatimukset: CPZ, säteilytetty (+ UVA): EC_{50} = 0,1—2,0 μg/ml; CPZ, ei säteilytetty (− UVA): EC_{50} = 7,0—90,0 μg/ml. Valoärsyttävyystekijän (PIF), ts. EC_{50}:n muutoksen, olisi oltava vähintään 6.

CPZ:n sijasta voidaan samanaikaisesti testattavina positiivisina kontrolleina käyttää muita tunnettuja valomyrkyllisiä kemikaaleja, jotka sopivat kyseessä olevalle kemikaaliluokalle tai arvioitavana olevan testikemikaalin liukoisuusominaisuuksiin. Tällöin testin hyväksyntävaatimuksiksi pitäisi määritellä asianmukaisesti EC_{50}-arvojen vaihtelualue ja PIF- tai MPE-arvot (keskimääräinen valovaikutus) aikaisempien tietojen perusteella (historiallinen kontrolli).

1.7 **Testimenetelmän kuvaus**

1.7.1 *Valmistelut*

1.7.1.1 Solut

Validointitutkimuksessa käytettiin joko ATCC:stä tai ECACC:stä hankittua pysyvää hiiren fibroblastisolulinjaa Balb/c 3T3, kloonia 31, ja siksi sitä suositellaan. Muita soluja tai solulinjoja voidaan käyttää, kun tutkimussuunnitelma on sama, jos viljelyolosuhteet mukautetaan solujen erityistarpeisiin. Samanlaisuus on tällöin osoitettava.

Mykoplasmakontaminaatio on tutkittava säännöllisesti, ja soluja saa käyttää vain jos tutkimustulos on tyydyttävä.

Koska solujen UVA-herkkyys voi lisääntyä siirrostamisten myötä, pitäisi käyttää sellaisia Balb/c 3T3 -soluja, joita on siirrostettu mahdollisimman harvoja kertoja, mieluiten alle 100 kertaa. On tärkeää, että Balb/c 3T3 -solujen UVA-herkkyys tarkistetaan tässä ohjeessa selostetun laadunvalvontamenettelyn mukaisesti.

1.7.1.2 Viljelyneste ja viljelyolosuhteet

Sopivaa viljelynestettä ja inkubaatio-olosuhteita olisi käytettävä solujen tavanomaiseen siirrostamiseen ja testin aikana. Balb/c 3T3 -soluille käytetään DMEM:iä, jossa on 10 % vastasyntyneen vasikan seerumia, 4 mM glutamiinia, penisilliiniä ja streptomysiiniä, ja soluja inkuboidaan kaapissa, jonka lämpötila on 37 °C ja CO_2-pitoisuus 7,5 %. On erityisen tärkeää, että viljelyolosuhteet ovat sellaiset, että solusykli pysyy samanlaisena kuin se on aiemminkin ollut käytetyillä soluilla tai solulinjalla.

1.7.1.3 Viljelmien valmistus

Pakastetuista varastoviljelmistä otettuja soluja inokuloidaan viljelynesteessä sopivassa tiheydessä, ja niitä siirrostetaan vähintään kerran ennen kuin ne käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä.

Valomyrkyllisyystestiä varten soluja inokuloidaan sellaisessa tiheydessä, että viljelmät eivät ole konfluentteja testin päättyessä, ts. kun solujen elinkykyisyys määritetään 48 tunnin kuluttua solujen inokuloinnista. Balb/c 3T3 -soluille, joita viljellään 96-kuoppalevyillä, suositellaan solutiheyttä 1×10^4 solua kuoppaa kohti.

Kutakin testikemikaalia varten soluja inokuloidaan täysin samalla tavalla kahdelle erilliselle 96-kuoppalevylle, jotka käyvät läpi samanaikaisesti koko testiohjelman täysin samanlaisissa olosuhteissa, lukuun ottamatta aikaa, jolloin yhtä kuoppalevyä säteilytetään (+ UVA/VIS) ja toinen pidetään pimeässä (− UVA/VIS).

1.7.1.4 Metabolinen aktivaatio

Vaikka metaboloivia järjestelmiä yleensä tarvitaan kaikissa *in vitro* -testeissä, joilla ennustetaan genotoksisuutta ja karsinogeenisuutta, valomyrkyllisyydelle ei toistaiseksi tunneta kemikaaleja, jotka edellyttäisivät metabolista aktivaatiota, jotta ne voisivat olla valomyrkyllisiä *in vivo* tai *in vitro*. Siten ei katsota olevan tarpeellista eikä tieteellisesti perusteltua suorittaa tätä testiä metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa.

1.7.1.5 Testikemikaalin valmistus

Testikemikaalit on valmistettava välittömästi ennen käyttöä ellei stabiilisuustiedoista ilmene, että varastointi voidaan hyväksyä. Valmistus on mahdollisesti tarpeen tehdä punaisessa valossa, jos aine hajoaa nopeasti valossa.

Testikemikaali pitäisi liuottaa puskuroituun suolaliuokseen, esim. Earlin tasapainotettuun suolaliuokseen (EBSS) tai fosfaatilla puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (PBS), joissa ei saa olla proteiinikontaminantteja tai valoa absorboivia pH-indikaattorivärejä, etteivät ne häiritsisi reaktioita säteilytyksen aikana.

Huonosti vesiliukoiset testikemikaalit pitäisi liuottaa sopivaan liuottimeen 100-kertaisessa pitoisuudessa loppupitoisuuteen verrattuna ja laimentaa sitten suhteessa 1:100 puskuroidulla suolaliuoksella. Jos käytetään liuotinta, sitä on oltava 1 prosentin (tilavuus/tilavuus) vakiotilavuudessa kaikissa viljelmissä, ts. myös negatiivisissa kontrolleissa ja kaikissa testikemikaalipitoisuuksissa.

Dimetyylisulfoksidi (DMSO) ja etanoli (EtOH) ovat suositeltavia liuottimia. Muut liuottimet, jotka eivät ole kovin solumyrkyllisiä (esim. asetoni), voivat olla sopivia, mutta niiden erityisominaisuudet (esim. reaktiivisuus testikemikaalin kanssa, valomyrkyllisyysvaikutuksen vaimeneminen tai radikaalien sitomisominaisuus) on arvioitava huolellisesti.

Vortex-sekoitusta ja/tai ultraäänihajoitusta ja/tai lämmittämistä 37 °C:een voidaan käyttää tarvittaessa liukenemisen helpottamiseksi.

1.7.1.6 UV-säteilytys — valmistelu

Valolähde: sopivan valolähteen ja sopivien suodattimien valitseminen on tärkein asia valomyrkyllisyyden testauksessa. UVA ja näkyvä valo liittyvät yleensä valolle herkistymiseen (7) (10), kun taas UVB on vähemmän tärkeä ja välittömästi soluille erittäin myrkyllinen. Sen valomyrkyllisyys lisääntyy 1000-kertaiseksi aallonpituudelta 313 nm aallonpituudelle 280 nm (11). Perusteena sopivan valolähteen valitsemiseen pitäisi olla mm. olennainen vaatimus, että valolähde emittoi aallonpituuksia, joita testikemikaali absorboi, ja että valoannoksen (joka pitää saavuttaa järkevässä ajassa) pitäisi olla riittävä tunnettujen valolle herkistävien kemikaalien osoittamiseksi. Lisäksi käytetyt aallonpituudet ja annokset eivät saisi olla liian tuhoisia testijärjestelmälle; tällainen vaikutus olisi mm. lämmön muodostuminen (infrapuna-alue).

Auringonvalon simulointia pidetään parhaimpana valolähteenä. Sekä ksenonkaarilamppuja että (seostettuja) elohopeahalidikaarilamppuja käytetään auringonvalosimulaattoreissa. Jälkimmäisillä on se etu, että ne muodostavat vähemmän lämpöä ja ovat halvempia, mutta niiden spektri ei täysin vastaa auringonvalon spektriä. Koska kaikki auringonvalosimulaattorit lähettävät huomattavia määriä UVB-valoa, ne pitäisi suodattaa sopivasti erittäin solumyrkyllisten UVB-aallonpituuksien vaimentamiseksi.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestiä varten olisi käytettävä säteilyspektriä, jossa ei käytännöllisesti katsoen ole UVB-valoa (UVA:UVB ∼ 1:20). Yksi esimerkki *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin validointitutkimuksessa käytetyn suodatetun auringonvalosimulaattorin säteilyspektrijakaumasta on julkaistu (3).

Dosimetria: valon voimakkuus (säteilyvoimakkuus, radianssi) olisi tarkistettava säännöllisesti ennen jokaista valomyrkyllisyystestiä käyttämällä sopivaa leveäkaistaista UV-mittaria. UV-mittarin on oltava kalibroitu valolähteen suhteen. Sen suorituskyky pitäisi tarkistaa, mitä varten suositetaan toisen, samantyyppisen ja täysin samalla tavalla kalibroidun vertailu-UV-mittarin käyttöä. Olisi toivottavaa, että tasaisin välein käytettäisiin spektrosäteilymittaria suodatetun valolähteen säteilyvoimakkuusspektrin mittaamiseen ja leveäkaista-UV-mittarin kalibroimiseen, mutta tällaiset laitteet vaativat asianmukaisesti koulutettua ammattihenkilöstöä niitä käyttämään.

Validointitutkimuksessa todettiin, että annos 5 J/cm^2 (UVA) ei ollut myrkyllinen Balb/c 3T3 -soluille ja että se pystyi eksitoimaan jopa heikosti valomyrkyllisiä kemikaaleja. Jotta saavutetaan arvo 5 J/cm^2 50 minuutin aikana, säteilyvoimakkuus on säädettävä arvoon 1,666 mW/cm^2. Jos käytetään muuta solulinjaa tai eri valolähdettä, UVA-annosta voi olla tarpeen mukauttaa hiukan ottaen huomioon, että se ei saa vahingoittaa soluja, mutta sen on oltava riittävä valomyrkyllisten standardiaineiden osoittamiseksi. Valoaltistusaika lasketaan seuraavasti:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{säteilytysannos (J/cm}^2) \times 1000}{\text{säteilyvoimakkuus (mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{W sec})$$

1.7.2 *Testiolosuhteet*

Testikemikaalin enimmäispitoisuus ei saisi olla suurempi kuin 100 µg/ml, koska kaikki valomyrkylliset kemikaalit on osoitettu alemmissa pitoisuuksissa, kun taas korkeammilla pitoisuuksilla väärien positiivisten tulosten määrä nousee (13). Testikemikaalin pH:n pitäisi olla sopiva suurimmassa pitoisuudessa (välillä 6,5—7,8).

UVA-valon kanssa (+ UVA) ja ilman sitä (− UVA) testattavan kemikaalin pitoisuusalue on määritettävä riittävän laajasti edeltävissä pitoisuusalueenmäärittelykokeissa. Pitoisuussarjan vaihtelualue ja yksittäiset pitoisuudet on asetettava siten, että koetuloksia on riittävästi pitoisuus-vastekuvaajan laatimiseksi. Pitoisuussarjan olisi oltava geometrinen (vakio laimennuskerroin).

1.7.3 *Testimenetelmä* ([1])

1.7.3.1 Ensimmäinen päivä

Valmistetaan viljelynesteeseen solususpensio, jossa on 1×10^5 solua/ml, ja 100 µl viljelynestettä pipetoidaan 96-mikrotitterikuoppalevyn laitimmaisiin kuoppiin (= nollakokeet). Muihin kuoppiin pipetoidaan 100 µl solususpensiota, jossa on 1×10^5 solua/ml (= 1×10^4 solua/kuoppa). Kutakin testikemikaalia varten valmistetaan kaksi kuoppalevyä: yksi sytotoksisuuden määritystä varten (− UVA) ja toinen fotosytotoksisuuden määritystä varten (+ UVA).

Soluja inkuboidaan 24 h (7,5 % CO_2, 37 °C), kunnes ne muodostavat puoliksi konfluentin yhden solun vahvuisen kerroksen. Tässä ajassa solut toipuvat ja tarttuvat levyn pohjaan sekä aloittavat eksponentiaalisen kasvun.

1.7.3.2 Toinen päivä

Inkubaation jälkeen viljelyneste kaadetaan kuopista pois ja solut pestään kahdesti 150 µl:lla EBSS/PBS:ää kuoppaa kohti. Lisätään 100 µl EBSS/PBS:ää, jossa on testikemikaalia tai ainoastaan liuotinta (negatiivinen kontrolli). Kuoppiin lisätään 8 eri pitoisuutta testikemikaalia. Soluja inkuboidaan testikemikaalin kanssa pimeässä 60 minuuttia (7,5 % CO_2, 37 °C).

Testin (+UVA)-osaa varten soluja säteilytetään huoneenlämpötilassa 50 minuuttia 96-kuoppalevyn kannen läpi valolla, jonka voimakkuus on 1,7 mW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2). Vesihöyryn tiivistyminen kuoppalevyn kannen alle estetään tuulettimella. Rinnakkaislevyt (− UVA) pidetään huoneenlämpötilassa pimeässä laatikossa 50 min (= UVA-altistusaika).

Testiliuos kaadetaan pois ja solut pestään kahdesti 150 µl:lla EBSS/PBS:ää. EBSS/PBS korvataan viljelynesteellä, ja soluja inkuboidaan (7,5 % CO_2, 37 °C) yli yön (18—22 h).

1.7.3.3 Kolmas päivä

Mikroskooppitutkimus

Soluja tutkitaan faasikontrastimikroskoopissa. Kirjataan solujen muodonmuutokset, jotka johtuvat testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista. Tätä kontrollia suositellaan koevirheiden eliminoimiseksi, mutta näitä muistiinpanoja ei käytetä sytotoksisuuden tai fotosytotoksisuuden arvioinnissa.

Neutraalipunatesti

Solut pestään 150 µl:lla esilämmitettyä EBSS/PBS:ää. Pesuliuos kaadetaan pois ravistamalla levyä varovasti. Kuoppiin lisätään 100 µl NR-viljelynestettä ja soluja inkuboidaan 3 tunnin ajan 37 °C:ssa kostutetussa ilmakehässä, jossa on 7,5 % CO_2.

Inkubaation jälkeen NR-viljelyneste poistetaan ja solut pestään 150 µl:lla EBSS/PBS:ää. EBSS/PBS kaadetaan pois ja kuopat kuivataan täysin imeyttäen neste paperiin. (Vaihtoehtoisesti: alassuin käännetty kuoppalevy sentrifugoidaan.)

Lisätään tarkasti 150 µl NR-desorbointiliuosta (juuri valmistettu etanoli/etikkahappo).

Mikrotitterilevyä ravistetaan nopeasti ravistajassa 10 minuutin ajan, kunnes NR on uuttunut soluista ja muodostanut tasaisen liuoksen.

NR-uutteen optinen tiheys luetaan aallonpituudella 540 nm spektrofotometrissä käyttäen vertailuliuoksena nollanäytteitä. Mittaustulokset tallennetaan sopivassa muodossa (esim. ASCII) myöhempää analysointia varten.

([1]) Lisätietoja annetaan viitteessä 12.

2 MITTAUSTULOKSET

2.1 Mittautulosten laatu ja määrä

Mittaustulosten avulla pitäisi voida analysoida järkevästi UVA-valon tai näkyvän valon kanssa ja ilman sitä saadut pitoisuusvasteet. Jos havaitaan sytotoksisuutta, sekä pitoisuusalue että yksittäiset pitoisuudet on valittava siten, että koetuloksiin voidaan sovittaa kuvaaja. Koska on mahdollista, että testikemikaali ei ole myrkyllinen soluille edes määritellyssä pitoisuusrajassa 100 pg/ml pimeäkokeessa (– UVA), mutta on erittäin myrkyllinen soluille säteilytettäessä (+ UVA), voi olla tarpeen valita kokeen kummassakin osassa testattavat pitoisuusalueet siten, että ne eroavat toisistaan jopa useita kymmenen potensseja, jotta mittaustulosten riittävää laatua koskevat vaatimukset täyttyvät. Jos kokeen kummassakaan osassa (– UVA ja + UVA) ei havaita solumyrkyllisyyttä, riittää testaaminen korkeimpaan pitoisuuteen asti siten, että yksittäisten annosten valillä on pitkä väli.

Selvästi positiivista tulosta ei tarvitse tarkistaa toistamalla koetta. Myöskään selvästi negatiivisia tuloksia ei tarvitse tarkistaa, jos testikemikaali on testattu riittävän korkeissa pitoisuuksissa. Tällaisissa tapauksissa riittää yksi koe, jota tukee yksi tai useampia pitoisuusaluetta määrittäviä alustavia kokeita.

Testit, joissa on saatu lähellä ennustemallin erotusrajaa olevia tuloksia, olisi toistettava tulosten tarkistuksen vuoksi.

Jos testin toistaminen katsotaan tarpeelliseksi, koeolosuhteiden muuttaminen voi olla tärkeää selvän tuloksen saamiseksi. Keskeinen muuttuja tässä testissä on testikemikaaliliuosten valmistaminen. Valmistusolosuhteiden (muut liuottimet, hienontaminen, ultraäänihajoitus) muuntelu voi siksi olla tarkoituksenmukaisinta testiä toistettaessa. Vaihtoehtoisesti voidaan harkita säteilytystä edeltävän esi-inkubaatioajan muuntelua. Vedessä hajoaville kemikaaleille voi lyhyt aika olla tarkoituksenmukainen.

2.2 Tulosten käsittely

Aina kun on mahdollista, määritetään testikemikaalin pitoisuus, joka vastaa 50 prosentin laskua solujen NRU-otossa (EC_{50}). Tämä voidaan tehdä soveltamalla pitoisuus-vastetuloksiin mitä tahansa sopivaa ei-lineaarista regressiomenetelmää (mieluiten Hill-funktiota tai logistista regressiota) tai käyttämällä muita sovitusmenetelmiä (14). Ennen kuin EC_{50}:tä käytetään laskuissa, sovituksen laatu olisi tarkastettava asianmukaisesti. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää graafisia sovitusmenetelmiä EC_{50}:n laskemiseksi. Tällöin suositellaan todennäköisyyspaperin käyttöä (x-akseli: log, y-akseli: probiitti), sillä usein pitoisuusvastefunktio tulee melkein lineaariseksi tämän muunnoksen jälkeen.

2.3 Tulosten arviointi (ennustemallit)

2.3.1 *Ennustemalli versio 1: Valoärsyttävyystekijä (PIF)*

Jos molemmissa tapauksissa — sekä UVA-valon kanssa (+ UVA) että ilman sitä (– UVA) — saadaan täydelliset pitoisuus-vastekuvaajat, voidaan valoärsyttävyystekijä (PIF) laskea seuraavasta kaavasta:

(a) $$PIF = \frac{EC_{50}\,(-\,UV)}{EC_{50}\,(+\,UV)}$$

Jos PIF < 5, ennuste on 'ei valomyrkyllisyyspotentiaalia', kun taas PIF ≥ 5 ennustaa valomyrkyllisyyspotentiaalin olemassaoloa.

Jos kemikaali on solumyrkyllinen ainoastaan UVA-valon kanssa testattaessa mutta ei ilman sitä, PIF:iä ei voida laskea, vaikka tulos viittaakin valomyrkyllisyyspotentiaaliin. Tällöin voidaan laskea '> PIF', jos ilman UV-valoa tehtävä solumyrkyllisyystesti tehdään suurimmalla testipitoisuudella (C_{max}) ja tätä arvoa käytetään '> PIF':n laskemiseen:

(b) $$> PIF = \frac{C_{max}\ (-\,UV)}{EC_{50}\ (+\,UV)}$$

Jos saadaan ainoastaan arvo '> PIF', kaikki arvot > 1 ennustavat valomyrkyllisyyspotentiaalia.

Jos ei voida laskea sen enempää arvoa EC_{50} (– UV) kuin arvoa EC_{50} (+ UV), koska kemikaali ei osoita solumyrkyllisyyttä korkeimmassakaan pitoisuudessa, tulos merkitsee, ettei kemikaalilla ole valomyrkyllisyyspotentiaalia. Tällöin käytetään muodollista arvoa 'PIF = *1' karakterisoimaan tulosta:

(c) $$PIF = *1 = \frac{C_{max}\ (-\,UV)}{C_{max}\ (+\,UV)}$$

Jos saadaan ainoastaan arvo 'PIF = *1', ennuste on 'ei valomyrkyllistä potentiaalia'.

Tapauksissa b) ja c) on valomyrkyllisyyspotentiaalia arvioitaessa huolellisesti tarkasteltava niitä pitoisuuksia, jotka saatiin *in vitro* 3T3 NRU-valomyrkyllisyystestissä.

2.3.2 *Ennustemalli versio 2: Keskimääräinen valovaikutus (MPE)*

Vaihtoehtoisesti voidaan soveltaa uutta valomyrkyllisyyspotentiaalin ennustamiseen tarkoitettua mallia, joka on kehitetty käyttäen EU/COLIPA-validointitutkimuksen (15) tietoja ja testattu sokkokoeolosuhteissa myöhemmässä UV-suodinkemikaalien *in vitro* -valomyrkyllisyystutkimuksessa (13). Tässä mallissa ei esiinny PIF-mallin rajoitusta silloin, kun EC_{50}-arvoa ei voida saada. Mallissa käytetään 'keskimääräistä valovaikutusta' (MPE). Se on suure, joka perustuu täydellisten pitoisuus-vastekuvaajien vertaamiseen. MPE-mallin soveltamiseen kehitettiin Humboldt-yliopistossa (Berliini) erityinen tietokoneohjelma, jonka saa maksutta käyttöön.

2.4 **Tulosten tulkinta**

Positiivinen tulos *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä (PIF ≥ 5 tai MPE ≥ 0,1) merkitsee, että testikemikaalilla on valomyrkyllisyyspotentiaalia. Jos tämä tulos saadaan pitoisuuksilla, jotka ovat pienemmät kuin 10 µg/ml, testikemikaali on myös todennäköisesti valomyrkyllinen erilaisissa altistusolosuhteissa *in vivo*. Jos positiivinen tulos saadaan vain suurimmalla testipitoisuudella 100 µg/ml, voi vaaran arviointia tai valomyrkyllisyyspotentiaalin arviointia varten olla tarpeen hankkia lisätietoja esimerkiksi kemikaalin kyvystä läpäistä iho sekä sen imeytymisestä ja mahdollisesta kertymisestä ihoon, tai kemikaali on testattava muulla testillä vahvistusta varten, esim. ihmisihoa käyttävällä *in vitro* -testillä.

Negatiivinen tulos *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä (PIF < 5 tai MPE < 0,1) merkitsee, että testiaine ei ollut valomyrkyllinen kyseisille nisäkässoluille käytetyissä olosuhteissa. Jos kemikaali pystyttiin testaamaan suurimmassakin pitoisuudessa 100 µg/ml, negatiivinen tulos merkitsee, ettei kemikaalilla ole valomyrkyllisyyspotentiaalia, ja valomyrkyllisyys *in vivo* voidaan katsoa epätodennäköiseksi. Tapauksissa, joissa samat pitoisuus-myrkyllisyysvasteet (EC_{50}+ UV ja EC_{50}− UV) on saatu pienemmillä pitoisuuksilla, tulokset tulkittaisiin samalla tavalla. Jos sitä vastoin myrkyllisyyttä ei voida osoittaa (+ UV ja − UV) ja jos aineen liukenemattomuus veteen rajoittaa pitoisuudet pienemmiksi kuin 100 µg/ml, voidaan asettaa kyseenalaiseksi, sopiiko testiaine kyseiseen määritykseen, ja on harkittava vahvistavaa määritystä (esim. käyttämällä *in vitro* -ihomallia, *ex vivo* -ihomallia tai *in vivo* -testiä).

3 **RAPORTOINTI**

Testiraportti

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

— tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään,

— fysikaalinen olomuoto ja puhtaus,

— fysikokemialliset ominaisuudet, jotka vaikuttavat tutkimuksen tekemiseen,

— stabiilius ja valostabiilius, jos tunnetaan.

Liuotin:

— perustelut liuottimen valinnalle,

— testikemikaalin liukoisuus tähän liuottimeen,

— liuottimen pitoisuus prosentteina käsittelynesteessä (EBSS tai PBS).

Solut:

— solujen tyyppi ja lähde,

— onko soluissa mykoplasmaa,

— solujen siirrostusjärjestysluku, jos se tiedetään,

— solujen herkkyys UVA:lle määritettynä sillä säteilytyslaitteella, jota käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä.

Testiolosuhteet a) — inkubointi ennen käsittelyä ja sen jälkeen:

— viljelynesteen tyyppi ja koostumus,

— inkubaatio-olosuhteet (CO_2-pitoisuus, lämpötila, kosteus),

— inkubaatioaika (esikäsittely, jälkikäsittely).

Testiolosuhteet b) — käsittely kemikaalilla:

— perustelut testikemikaalin pitoisuuksien valintaan käytettäväksi sekä UV-valon/näkyvän valon kanssa että ilman sitä,

— jos testikemikaali on huonoliukoinen eikä osoita solumyrkyllisyyttä, perustelut suurimmalle testatulle pitoisuudelle,

— käsittelynesteen tyyppi ja koostumus (puskuroitu suolaliuos),

— kemikaalikäsittelyn kesto.

Testiolosuhteet c) — säteilytys:

— perustelut käytetyn valolähteen valinnalle,

— valolähteen säteilyspektrin ominaisuudet,

— käytetyn suotimen (käytettyjen suotimien) transmissio- ja absorptio-ominaisuudet,

— säteilymittarin ominaisuudet ja sen kalibrointi yksityiskohtaisesti,

— valolähteen etäisyys testijärjestelmästä,

— UVA-säteilyn voimakkuus kyseisellä etäisyydellä, mW/cm^2,

— UV-altistuksen tai näkyvälle valolle altistuksen kesto,

— UVA-annos (säteilyvoimakkuus × aika), ilmaistuna laatuna J/cm^2,

— soluviljelmien lämpötila säteilytyksen aikana ja samanaikaisesti pimeässä pidettyjen soluviljelmien lämpötila.

Testiolosuhteet d) — NRU testi:

— NR-nesteen koostumus,

— NR-inkubaation kesto,

— inkubaatio-olosuhteet (CO_2-pitoisuus, lämpötila, kosteus),

— NR-uutto-olosuhteet (uuttoaine, kesto),

— aallonpituus, jolla NR:n optinen tiheys luettiin spektrofotometrillä,

— toinen (vertailu-) aallonpituus, jos sellaista käytettiin,

— spektrofotometrin mahdollisen nollaliuoksen sisältö.

Tulokset:

— solujen elinkykyisyys, joka on saatu kullekin testikemikaalin pitoisuudelle, ilmaistuna prosentteina kontrollien keskimääräisestä elinkykyisyydestä,

— pitoisuus-vastekuvaajat (testikemikaalin pitoisuus vs. suhteellinen solujen elinkykyisyys), joka on saatu samanaikaisesti tehdyissä (+ UVA)- ja (− UVA)-kokeissa,

— pitoisuus-vastekuvaajien tietojen analyysi; jos mahdollista, lasketaan EC_{50} (+ UVA) ja EC_{50} (− UVA)

— niiden kahden pitoisuus-vastekuvaajan vertailu, jotka on saatu UVA-valon tai näkyvän valon kanssa ja ilman sitä, joko laskemalla valoärsyttävyystekijä (PIF) tai laskemalla keskimääräinen valovaikutus (MPE),

— valomyrkyllisyyspotentiaalin luokitus,

— testin hyväksyttävyyskriteerit a) — samanaikainen negatiivinen kontrolli:

  — säteilytettyjen ja säteilyttämättömien solujen absoluuttinen elävyys (NR-uutteen optinen tiheys),

  — negatiivista kontrollia koskevat aiemmat tiedot, keskiarvo ja vakiopoikkeama,

  testin hyväksyttävyyskriteerit b) — samanaikainen positiivinen kontrolli:

  — positiivisen kontrollikemikaalin EC_{50}(+ UVA) ja EC_{50}(− UVA) ja PIF,

  — positiivista kontrollikemikaalia koskevat aiemmat tiedot: EC_{50}(+UVA) ja EC_{50}(−UVA) ja PIF, keskiarvo ja vakiopoikkeama.

Tulosten tarkastelu.

Päätelmät.

4 **KIRJALLISUUSVIITTEET**

(1) 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, *Toxicology in Vitro* 8, s. 793-796.

(2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, s. 7-8.

(3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA '*In vitro* phototoxicity' validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, s. 305-327.

(4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.

(5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, s. 95-102.

(6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, s. XI-XXXV.

(7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, s. 314-348.

(8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, s. 79-110.

(9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, s. 119-124.

(10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, s. 515-530.

(11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, s. 1825-1829.

(12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project '*In Vitro* Photoirritation'.

(13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, s. 679-708.

(14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, s. 127-138.

(15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, s. 445-462.

Lisäys

3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin asema kemikaalien valomyrkyllisyyden testauksessa

