

## 皮膚感作性試験代替法としての LLNA を 化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス

医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請では、化学物質の感作性を評価するために、従来から、モルモットを用いた皮膚感作性試験が最も一般的に用いられてきている。OECD テストガイドラインに記載されている試験法としては、Maximization Test と Buehler Test がある<sup>1)</sup>。これらの試験法は、感作成立後の惹起時における皮膚反応を判定することにより、化学物質の感作性を評価できる。

一方、1986年に Kimber らにより提案<sup>2)</sup>された、局所リンパ節アッセイ (Local Lymph Node Assay : LLNA) は、感作誘導期における局所リンパ節中の細胞増殖反応を指標とした、マウスを用いる皮膚感作性試験法である。本試験法は、これまでに、欧米の公的機関で評価され<sup>3,4)</sup>、2002年に OECD テストガイドライン 429 (OECD Guideline for Testing of Chemicals, 429 : Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay) として採択され、2010年に改訂がなされている<sup>5)</sup>。本試験法は、長年広く使われてきた Maximization Test や Buehler Test に比べ、動物に与える苦痛の低減や評価に用いる動物数の低減という点で意義ある代替法の一つと考えられている。また、従来のモルモットを用いた試験法は、惹起時の皮膚反応を肉眼判定するが、LLNA では細胞増殖反応を放射性同位元素の取り込みで測定しているため、より客観的な試験となっている。

本ガイダンスは、OECD テストガイドライン 429 (reduced LLNA: rLLNA は除く。) として採択されている LLNA について、化粧品・医薬部外品の安全性評価への活用促進を図るため、その実施方法についてわかりやすく解説するとともに、必要な留意点等をガイダンスとしてとりまとめたものである。

### 1. 試験法の概要

#### 1-1. 原理

感作性を有する低分子量の化学物質は、経皮に浸透し、そのまま又は生体のタンパク質と結合した後、皮膚中の樹状細胞に取り込まれるものと考えられている。その後、活性化した樹状細胞は皮膚から所属リンパ節へ遊走し、そこで抗原提示を介して抗原特異的な (感作性物質に特異的に反応する) T 細胞の増殖を誘導し、次いで特異的な T 細胞 (感作 T 細胞) は全身に分布する。この一連の生体応答が感作と呼ばれている。LLNA では、感作誘導期のリンパ節における抗原特異的な T 細胞の増殖 (DNA 合成) を、放射性ヌクレオシドの DNA への取り込みを指標として評価する。

#### 1-2. 試験手順及び判定

##### 1-2-1. 試験手順

詳細は、OECD テストガイドライン 429 を参照する (図 1)。

8～12 週齢の CBA/Ca あるいは CBA/J 系の雌マウスを使用し、個々の動物の体重が試験に供する全動物の平均体重値の±20%を超えないようにする。試験群としては、溶媒対照群（陰性対照群）の他 3 群以上の被験物質用量群を設定し、通常、陽性対照群を加える。1 群当り最低 4 匹を用いる。全ての投与群で、マウスの両耳の耳介に被験物質を 25 $\mu$ L を 3 日間繰り返し塗布し、その 3 日後に [ $^3$ H-Methyl]-thymidine ( $^3$ H-TdR)（又は [ $^{125}$ I]-iododeoxyuridine ( $^{125}$ I-IUdR) 及び fluorodeoxyuridine) を尾静脈投与する。その 5 時間後に耳介リンパ節を摘出し、その中に取り込まれた  $^3$ H-TdR（又は  $^{125}$ I-IUdR）の放射活性を測定する。

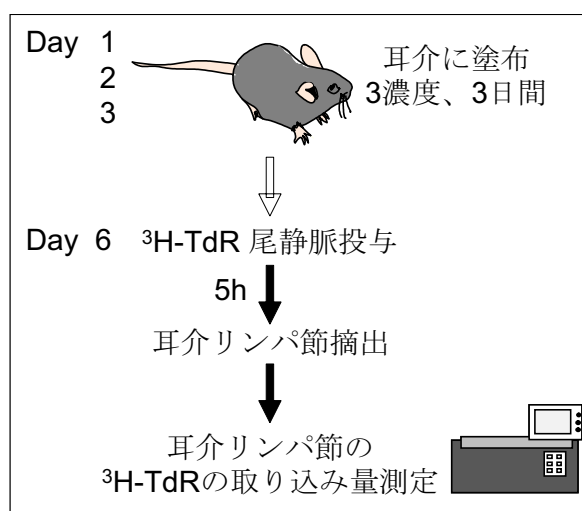


図 1 LLNA の概略 ( $^3$ H-TdR を用いた場合)

### 1-2-2. 判定

溶媒対照群に対する被験物質投与群の  $^3$ H-TdR（又は  $^{125}$ I-IUdR）の取り込み量の比（Stimulation index : SI）が 3 倍を超えた際に、陽性と判定する。ただし、結果が明確でない場合は、用量相関性の強さ、統計学的有意差、陰性対照群及び陽性対照群の反応も考慮する<sup>8, 9, 10, 11)</sup>。

### 1-3. 試験実施上の留意点

#### 1-3-1. 試験実施における各種条件及び注意事項

##### ① 溶媒の選択

使用溶媒は被験物質の溶解性を考慮し、溶液又は懸濁液として最も高濃度で適用可能な溶媒を選択する。皮膚への適用性から acetone : olive oil (4 : 1, v/v ; AOO)、N,N-dimethylformamide (DMF)、methyl ethyl ketone、propylene glycol、dimethylsulfoxide 等が推奨される。また、エタノール溶液（例えば、70%エタノール）も使用可能である。水溶性の被験物質の場合、適切な溶媒（例えば、Pluronic® L92 を 1%含む溶液）を用い、皮膚を濡らし、直ちに流れ落ちないように注意すべきであ

る。十分な科学的根拠があればその他の溶媒でも使用可能であるが、皮膚に対する付着性が悪い水溶液の使用は避ける。

## ② 塗布濃度設定の方法

被験物質の塗布濃度は、**100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%**等、**OECD テストガイドライン 429** で既定された濃度系列から、連続した少なくとも3用量を用いる。

最高塗布濃度には、全身毒性や強度の皮膚刺激性を生じない最も高い濃度を用いる。全身毒性や強度の皮膚刺激性を生じない濃度は、急性毒性、皮膚刺激性等の毒性情報や類似構造を含む物質や物理化学的特性情報等、利用可能な全ての情報を参照して決定する。これら既存情報から当該濃度を推察できない場合は、以下に示す予備スクリーニング試験を実施して設定する。

### 【予備スクリーニング試験】

1濃度につき1~2匹の動物を用い、本試験と同様に被験物質による塗布を行う。ただし、放射性同位元素の尾静脈投与は行わない。塗布濃度は、原則として被験物質の性状が液体である場合は**100%**、固形物、懸濁物の場合は調製可能な最高濃度とする。他の動物種（モルモット等）で得られた情報のうち、類似条件で行われた利用可能な情報がある場合はその条件を参考にする。

全身毒性は、試験期間中の一般状態の変化と **Day1**（被験物質処置前）及び **Day6**（最終処置 3 日後）の体重変化率を指標として評価する。皮膚刺激性は、**Day1**（被験物質処置前）、**Day3**、**Day6** に、塗布部位の皮膚所見の観察と、耳介の厚さを測定して評価する。すなわち、投与期間中（**Day1**~**Day6**）に神経機能の変化（立毛、運動失調、振戦、痙攣等）、行動変化、行動量変化、呼吸パターンの変化、傾眠、無反応症状、摂食量変化、ストレス症状等の一般状態の異常を認める場合、あるいは **Day1** から **Day6** の間で **5%** を超えた体重減少を生じる場合は、全身毒性があると判定する。また、**Day3** 及び **Day6** に実施した刺激性評価において、2回の測定の両方、又はどちらかの耳介で、中等度以上の紅斑を示す所見を認める場合や、耳介厚の増減率が **+25%** 以上となる場合は、過度の刺激性があると判断する<sup>5)</sup>。

以上の結果を踏まえ、**100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%**等、**OECD テストガイドライン 429** で既定された濃度系列の中から、原則として、全身毒性反応や過度の刺激性反応が認められなかった最高濃度を本試験の最高用量に設定する。

## ③ その他

- ある種の金属化合物では、感作性物質を識別できないことがある。
- ある種の皮膚刺激性物質（界面活性剤等）で偽陽性反応を生じることがある。

### 1-3-2. 試験成立条件について

試験が適正に実施されたことは、反応強度が明らかな陽性対照物質を用いて、**SI 値が 3**

を超えることを確認する。試験毎に陽性対照群として 25% ヘキシルシンナミックアルデヒドや 5%メルカプトベンゾチアゾール等を投与する群を設定する。ただし、LLNA を定常的に実施し、陽性対照物質の背景データより試験結果の再現性や正確性を確認できる実験施設の場合には、陽性対照物質を試験に供するのは一定期間毎（例えば、6 箇月毎）でもよい。

## 2. 本試験法の運用方法に関する留意点

本試験法は、動物を使用した試験法であるが、従来の動物を用いた試験法（Maximization Test 等）と比較して、動物に与える苦痛の低減や評価に用いる動物数の低減が図ることができ、試験結果の定量性においても同程度の精度を有している。

- ① 製剤の試験には利用できない。
- ② 適正に実施された LLNA で陰性と判定された場合には、当該物質の皮膚感作性は陰性と、陽性と判定された場合には皮膚感作性は陽性と結論し、原則としてそれ以上の追加試験は必要とされない。
- ③ ただし、適正に実施された LLNA で、陽性と判断された場合でも、既に十分に使用実績のあることが知られている類縁物質の皮膚感作性データとの比較あるいは従来のアジュバントを用いないモルモット皮膚感作性試験による追加データ等から総合的に、皮膚感作性の安全性を担保できることがある。
- ④ LLNA が適正に実施できなかつたと判断された場合、あるいは、LLNA の利用が適切でないと考えられる被験物質の場合、従来のモルモットを用いる皮膚感作性試験を実施する。

## 3. 資料の信頼性の確保

適正な試験実施の信頼性を確保するため、LLNA を定常的に実施する施設において、陽性対照物質を試験に供さない場合、その施設における陽性対照物質の背景データについて整理しておく必要がある。

## 4. 引用文献

- 1) OECD, 1992, OECD test guideline 406; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Sensitization:  
<<http://oberon.sourceoecd.org/vl=28459316/cl=11/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s6/p1>>
- 2) Kimber I. et al., 1986, Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. Food Chem Toxicol, 24, 585-586.
- 3) ICCVAM – Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, 1999. The Murine Local Lymph Node Assay: a test method for assessing the

allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. The results of an independent peer review evaluation coordinated by the ICCVAM and the NICEATM. NIH publication No. 99-4494. National Institute of Environmental Health Sciences.  
<<http://www.iccvam.niehs.nih.gov>>

- 4) Balls M. and Hellsten E., 2000, Statement on the validity of the local lymph node assay for skin sensitization testing. ECVAM Joint Research Centre, European Commission, Ispra, Italy. ATLA 28, 366-367.
- 5) OECD, 2010, OECD test guideline 429; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay, <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-TG429-2010.pdf>
- 6) 医薬品非臨床試験法ガイドライン研究会編、医薬品非臨床試験法ガイドライン解説 2010(薬事日報社)、2-7 皮膚感作性試験、p.71-76
- 7) 感作性分科会、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会最終報告書－感作性分科会報告－、平成 21 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究 (平成 22 年 4 月)
- 8) Basketter D.A. et al., 1999, A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. J Appl Toxicol, 19(4), 261-266.
- 9) Boussiquet-Leroux C. et al., 1995, Evaluation of lymphocyte proliferation by immunohistochemistry in the local lymph node assay. J Appl Toxicol, 15(6), 465-475.
- 10) Angers-Loustau A. et al., 2011, The regulation use of the local lymph node assay for the notification of new chemicals in Europe. Reg Toxicol Pharm, 60, 300-307..
- 11) Kimber I and Dearmann RJ., 2010, The local lymph node assay and skin sensitization testing. In “Immunotoxicity Testing. Methods and Principles. Methods in Molecular Biology, vol.598”, ed by Diertert RR, Humana Press, p.221-231

## 光毒性試験代替法としての *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験を 化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス

光毒性は、皮膚に化学物質を適用した場合、光（紫外線または紫外線及び可視光）照射が加わることで生ずる皮膚刺激反応である。光毒性の評価には、従来から、動物を用いた試験法が用いられている。すなわち、動物の皮膚に被験物質を塗布し、光照射部位と非照射部位を設定し、光照射後に生じた皮膚反応を非照射部位の反応と比較することで光毒性の有無を判定する試験法である。

光毒性試験に関する *in vitro* の試験法では、培養細胞を用いた試験法が EU において研究開発され<sup>1-4)</sup>、2004年に OECD テストガイドライン 432 (OECD Guideline for Testing of Chemicals, 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)<sup>5)</sup>として採択された。現在、本試験法は、化学物質の光毒性の有無を検出する試験法として世界的に広く受け入れられ、特に感受性 (Sensitivity) の高い試験法としても認識されている。

本試験法は、平成 14 年度厚生労働科学研究班「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」において検討され光毒性の有無を検出するための *in vitro* 光毒性試験としての妥当性が検証されている<sup>6)</sup>。

本ガイダンスは、OECD テストガイドライン 432 として採択されている *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験について、化粧品・医薬部外品の安全性評価への活用促進を図るため、その実施方法についてわかりやすく解説するとともに、必要な留意点等をガイダンスとしてとりまとめたものである。

### 1. 試験法の概要

#### 1-1. 原理

光毒性反応は、光が当たることにより励起された化学物質が定常状態に戻る際、エネルギーが何らかの形で放出されるが、その作用を契機として細胞全体が傷害されることで発現すると考えられている。本試験法は、この原理を利用し、マウス由来の線維芽細胞の単層培養系を用い、被験物質の光照射時と非照射時における用量－細胞生存率曲線を描き、光照射によって細胞毒性の増強が見られるか否かで被験物質の光毒性の有無を判定する方法である。生細胞の判別には Neutral Red (NR) を用いる。NR は弱カチオン性の色素で、細胞膜を能動輸送により透過してリソゾームに蓄積される性質を持つ。細胞傷害や、細胞死により、細胞膜の輸送能の低下やリソゾームの脆弱化が起これば NR が蓄積されなくなる。そのため、生細胞と傷害を受けた細胞又は死細胞とを区別することが可能である。その原理を応用し、吸光度により色素の取り込み量を測定し、その違いから光照射による細胞傷害性を評価する。

## 1-2. 試験手順及び判定

### 1-2-1. 試験手順

詳細は、OECD テストガイドライン 432 (OECD Guideline for Testing of Chemicals, 432 : *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test) や成書<sup>8)</sup>を参照する。

96 穴のアッセイプレート 2 枚を用い、BALB/c 3T3 細胞を 24 時間培養し、24 時間後、96 穴のアッセイプレート 2 枚から培養液を除去し、8 段階に緩衝液 (EBSS、HANKS 液等) で希釈した試験試料及び溶媒を含む緩衝液 (溶媒対照) を培養液と交換し 1 時間培養する。被験物質の緩衝液に対する溶解性に問題がある場合は、良好な溶解性が得られる溶媒 (水、エタノール、DMSO 等) に溶解した後、緩衝液をもちいて 8 段階に希釈し、試験試料を作製する。1 時間培養後、アッセイプレート的一方は光を照射し、もう一方は遮光して放置する。照射光は、UVA と可視光領域を持つ光が推奨されており、照射量は UVA 領域での計測で  $5\text{J}/\text{cm}^2$  とする。照射後、試験試料を除去し、培養液に交換した後、18-22 時間培養する。培養後、NR を含む培養液を 3 時間培養して NR を取り込ませる。その後、細胞内に取り込まれた NR を抽出し、測定した吸光度を用いて、溶媒対照を細胞生存率 100% として試験試料の各処理濃度における細胞生存率 (%) を算出し、用量-細胞生存率曲線を得る。

### 1-2-2. 判定

結果の評価法としては、Photo Irritant Factor (PIF) を求める方法と Mean Photo Effect (MPE) を求める方法と 2 つの評価法が、OECD テストガイドライン 432 において記されている。PIF は光照射時と非照射時の細胞 50% 生存濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) の比であり、以下の式で求められる。

$$\text{PIF} = \text{IC}_{50}(\text{UV}-) / \text{IC}_{50}(\text{UV}+)$$

MPE は光非照射時から照射時への用量-細胞生存率曲線のシフトを評価する数値で、各濃度における生存率方向の移動率 (response effect) と、濃度方向における移動率 (dose effect) を掛け合わせた値 (photo effect) の平均値である。それぞれの値を用いたときの判断基準を次頁の表に示した。

どちらの評価軸を用いても評価結果に差はないことが確認されている。これらの判定基準により、光毒性ポテンシャルの有無を判断する。

表 : PIF 及び MPE による光毒性判定基準

Classification	PIF	MPE
No phototoxicity	$\text{PIF} < 2$	$\text{MPE} < 0.1$
Probable phototoxicity	$2 \leq \text{PIF} < 5$	$0.1 \leq \text{MPE} < 0.15$
Phototoxicity	$5 \leq \text{PIF}$	$0.15 \leq \text{MPE}$

### 1-3. 試験実施上の留意点

#### 1-3-1. 試験実施における各種条件及び注意事項

##### ①培養細胞について

OECD テストガイドラインにおいて、BALB/c 3T3 clone A31 (CCL-163 ; ATCC 又は 86110401 ; ECACC) を推奨している。他の細胞の使用は可能であるが、同等性を示す必要がある。

##### ②光源及び照射光について

- ・ 照射光については、UVA と可視光領域の光を照射することとし、光源としては、ソーラーシミュレーターとして、キセノンランプ若しくは水銀メタルハライドランプが記載されている。

太陽光との近似性はキセノンランプの方が高いとしているが、水銀メタルハライドランプは放熱が少ないことと、安価である点がメリットとして挙げられている。

- ・ 光源の種類によって波長特性が異なることや、照射装置の照射野の UV 強度の差異が生じることにより化学物質との光化学反応や毒性として発現する生物学的な反応も変わってくる。そのため、光源の波長特性を予め把握しておくとともに、その試験条件下での細胞毒性の発現について十分な背景データを得ておく必要がある<sup>9)</sup>。
- ・ UV 強度測定器計のメーカーによって、検出する UV 波長域が異なるため、光源の波長特性に合致した UV 強度測定器を選択することが重要である<sup>6)</sup>。

##### ③その他

- ・ 溶解性の低い被験物質については、正確なデータが得にくい<sup>6,9)</sup>。
- ・ 光毒性の有無を定性的に判断するための試験系であり、光毒性の強弱の程度、生体における用量・濃度反応関係については必ずしも評価できない<sup>6,9)</sup>。
- ・ 被験物質の代謝などによる間接的な光毒性を検出できない<sup>9)</sup>。

#### 1-3-2. 試験成立条件について

本試験法によるデータの質を維持する為に、試験施設ごとの背景データを取り、試験が適正に実施されたことを確認する。

試験成立を確認する参考として OECD テストガイドラインで推奨されている数値を以下に示す。

- ・ 溶媒対照の細胞生存率：光照射条件下および非照射条件下の各プレートの溶媒対照の平均吸光度の値。OECD テストガイドラインでは 0.4 (溶媒による背景データの約 20 倍) 以上が推奨されている。
- ・ 光照射に対する細胞の感受性：非照射条件下の陰性 (溶媒) 対照群に対する、光照射条件下の溶媒対照群の細胞生存率。OECD テストガイドラインでは 80%以上であることが推奨されている。



- ・ 陽性対照に対する感受性：陽性対照物質の PIF 値が試験施設の背景データから逸脱していないこと。OECD テストガイドラインでは、塩酸クロルプロマジンを経験対照とした場合の PIF 値は 6 以上であることが推奨されている。

その他、OECD テストガイドラインの TABLE 1 (添付資料) に挙げられている化合物を経験対照物質として、その PIF 値若しくは MPE 値を比較することにより、条件設定を検討する必要がある。

OECD テストガイドラインにて推奨されている以外の条件下においても、評価が適正に実施できる可能性はあるが、その場合には、試験条件の妥当性を評価し、科学的に説明する必要がある。

## 2. 本試験法の運用方法に関する留意点

- ① 本試験は、製剤の試験には利用できない。
- ② 化学物質の紫外外部吸収スペクトルを、波長 290~400nm の範囲で測定し、光毒性試験を実施する必要があると判断された場合は、第一選択試験法として本試験法を推奨する。
- ③ 適正に実施された本試験法で No phototoxicity と判定された場合には、陰性と判断する。
- ④ 本試験法にて判定結果が No phototoxicity 以外の場合、従来の動物を用いた試験法を含めた他の試験法にて確認し、陰性と判定された場合には、光毒性は陰性と判断することもできる。
- ⑤ 本試験法は、単層細胞培養系を使用した評価システムであり、溶解性に問題がある(緩衝液と均一に混合しない)もの、著しく培養系に影響を与える(例えば、緩衝液の pH 変化をもたらす)ものは適正に評価できない。物性等から、明らかに本試験法への適用が困難であると判断された被験物質については、本試験法を適用できない。被験物質の物性等により、本試験法が適正に実施できていないと判断された場合、動物試験を含めた他の試験法にて確認する。

## 3. 資料の信頼性の確保

適正な試験実施の信頼性を確保するため、以下の情報についても整理しておく必要がある。

- ・ 光照射機器購入時のスペクトラム分布情報
- ・ UV 強度測定器に関する情報 (メーカー、機種、型番、校正記録)
- ・ 陽性対照物質の背景データ

#### 4. 引用文献

- 1) Spielmann H., et al., *In vitro* Phototoxicity testing, the report and recommendation of ECVAM workshop 2, ATLA, 22, 314-348, 1994.
- 2) Spielmann H., et al., EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: first results obtained with Balb/3T3 cell phototoxicity assay, Toxicol. *In Vitro*, 8, 793-796, 1994.
- 3) Spielmann H., et al., The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (Blind Trial). part1: The 3T3 NRU phototoxicity test, Toxicol. *In Vitro* 12, 305-327, 1998.
- 4) Spielmann H., et al., A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, ATLA 26, 679-708, 1998.
- 5) OECD, OECD test guideline 432; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test,  
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg432.pdf>
- 6) 大野泰雄ら, Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告, 平成 14 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (H13-医薬-024)
- 7) 光関連毒性分科会、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会最終報告書－光関連毒性分科会報告－、平成 21 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究 (平成 22 年 4 月)
- 8) 最新 動物実験代替法の技法ノウハウ (技術情報協会発行, 2011)
- 9) CTFA Safety Evaluation Guidelines, Evaluation of Photoirritation and photoallergy potential

添付資料

OECD TG 432

TABLE 1

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