

を洗浄後、この緩衝液に種々の濃度の被験物質を溶かした処理液(100  $\mu$ L)を加えて前培養し、非照射群は室温暗所に置き、照射群は光照射する。この時の前培養時間、照射時間および照射強度は、陽性対照を用いたそれぞれの実施機関での背景データを参考にして決定する。(例：EU/Colipa バリデーションスタディの条件、Balb/c 3T3 細胞を用いて水銀メタルハライドランプを照射する系においては、1時間前培養し、非照射群では室温暗所 50分、UV 照射群は 1.67 mW/cm<sup>2</sup> で 50分照射(= 5 J/cm<sup>2</sup>)する。) 処理後ウェルを緩衝液(100-200  $\mu$ L)で洗浄し、新しい培地を加えて更に 1日培養する。

### 3日目：

細胞の増殖状態や形態などを顕微鏡で観察し記録する。細胞毒性をニュートラルレッド取り込み法で検出する場合は、培養終了 2-3 時間前に、ニュートラルレッドを含む培地(例、50  $\mu$ g/mL 培地を 150  $\mu$ L)に換えて培養を継続し、ニュートラルレッドを生細胞に取り込ませる。培養終了後、ニュートラルレッド含培地をのぞき、ウェルを緩衝液等で洗浄する。ついで色素抽出液(例、水：エタノール：酢酸=49:50:1(容量比))を用いて、色素を抽出する。プレートリーダ等で吸光度(540 nm)を測定し、細胞毒性の程度を算出する。試験は濃度設定試験を含めて最低 2 回行う。(注：現時点では代謝活性化の系を適用することは難しい。)

## 4) 被験物質の調製

被験物質は Eagle s Balanced salt solution (EBSS)やリン酸緩衝液(PBS)などの緩衝液に溶解する。培養に用いる培地は、通常、pH 指示薬やビタミンなど UV 吸収する物質が含まれているため使用しない。被験物質が直接緩衝液に溶けない場合は、他の溶媒に溶解後、緩衝液に添加する。使用する溶媒は水、エタノール、DMSO などがあげられるが、試験に影響を与えない濃度で使用する。また、懸濁/浮遊/析出するような被験物質、もしくは、着色しているような場合は、真の細胞毒性が得られないことがあるので注意する。これらは、被験物質を緩衝液や溶媒に添加した際や光照射を行う直前に確認する。

被験物質処理により培養環境が非生理的条件になる場合(pH や浸透圧など)は、試験結果に影響が現れる可能性があるので注意する。また、被験物質の調製および試験を行う際は、室内の光環境に注意する。

## 5) 用量段階

予め、本試験の濃度を設定する為の予備試験を実施し、どの程度の濃度域で毒性を示すかを調べる。本試験では適切な間隔(公比 $\sqrt{10}$ 以下)で処理濃度を設定する。適用する濃度範囲は、ほとんど毒性を示さない領域からほとんど生存細胞が認められない濃度までを含み、20~80% の間に 2 点以上とれるようにするのが望ましい。本試験濃度は非照射、照射各条件それぞれの条件下で決定するが、別々に行うと正しい判定が下せない場合があるので、照射と非照射は同時に試験する。

毒性が見られない場合の最高濃度の上限は、5 mg/mL または 10 mM (いずれか低い方)とする。(注：96 ウェルプレートであれば、1 プレートあたり 1 濃度につき 3-6 ウェル、8 濃度とることで 1 プレート 1~2 検体の処理ができる。照射、非照射群、それぞれ一度に複数のプレートを用いる必要はない。)

## 6) 陽性対照

陽性対照物質としては、chlorpromazine (CPZ), anthracene, amiodarone HCl などがあげられる。Balb/c

3T3 細胞を用いて水銀メタルハライドランプを照射する系で CPZ を使用する場合は、照射下での IC50 値 = 0.1-2.0 g/mL、非照射下での IC50 値 = 7.0-90 g/mL、Photo Irritation Factor (PIF) > 6 を目安とする。陽性対照は、光照射、非照射の両方で IC50 値を測定できる物質であることが望ましい。陽性対照は本試験において必ず必要であるが、被験物質と同じプレート上におく必要はない。光照射、非照射について独立したプレートを用いて試験を行ってよい。

#### 7) 照射条件

照射光源としては太陽光類似のソーラーシミュレーターが適している。一般的に、キセノンランプと水銀メタルハライドランプの両方がソーラーシミュレーターとして使われている。UVB を減少させるためにフィルタ-をかける場合もある(注：自然太陽光では UVA:UVB = 約 20:1)。試験に用いるランプの機種やメーカー、その波長特性については予め調べ記録しておく。

UV 線量計についても同様に機種、メーカーを特定しておく。同一照射線量でも用いる個々の UV メーターの特性によって測定値が異なるので、常に同じ UV 線量計を使用し、定期的に校正して使用する必要がある。試験時の UV 照射はプレートにプラスチックのフタをかけた状態で行うため、線量の測定は、使用するプラスチックのフタを通して実施する。

①EU/COLIPA のバリデーションで行われたのと同一条件の水銀メタルハライドランプを用いる場合は、線量や照射時間などは OECD のガイドライン案に示す試験条件に準じて実施する事ができる。

②キセノンなど他の光源を用いる場合は、予備実験により適切な照射条件を設定する必要がある。照射線量は細胞に毒性を示さない線量で、光毒性物質が十分に反応する条件でなければならないので、細胞の反応性と陽性対照物質の反応性から決める。照射量を決めるためのリファレンスとなる化学物質は EU/COLIPA のバリデーションスタディで用いられた、陽性、陰性の明らかな物質を使用すると良い。

#### 8) 細胞の光感受性

光照射下のコントロール値が非照射下のコントロール値に対して 80%以上の生存率を示すこと。

#### 9) 細胞毒性の測定

光細胞毒性を調べる方法としては、ニュートラルレッド法、MTT 法、クリスタルバイオレット法、コロニー形成法など、各種の方法が適用可能であるが、本格的なバリデーションスタディが実施されているのはニュートラルレッド法のみである。ニュートラルレッド法を用いる場合は、OECD のガイドライン案に従う。その他の試験方法を用いる場合においても、各群の相対生存率を陰性対照とブランクの値から求める。

#### 10) 結果の判定

結果は光照射および非照射における IC50 値の比、もしくは照射および非照射における反応性の平均によって判定する。前者は PIF (Photo Irritation Factor)、後者は MPE (Mean Photo Effect) として算出される (H-G. Holz hter, ATLA 25, pp445-462, 1997)。どちらの場合も、最終的には照射量に依存するので、陽性対照物質等を用いた照射量の設定が重要となる。

明らかに陰性または陽性の結果が得られた場合は、確認試験を行う必要はない。明確に陰性、陽性が結論づけられない場合は、濃度の幅や前培養時間や照射量を変えるなど、適切な条件下で確認

試験を行う。(注：判定の指標となる数値は光源等によって若干異なると思われる。したがって、それぞれの系で EU/COLIPA バリデーションで用いられた検体を用いて IC50 値や PIF 値、MPE 値の確認を行うことが必要である。)

#### 11) 結果の表示

被験物質の処理群、陰性および陽性対照群について、吸光度、吸光度の平均、相対生存率、IC50 値を表示する。非照射下の IC50 値と照射下の IC50 値の比である PIF (Photo Irritation Factor) 値が求められる場合は算出する。または照射下、非照射下で得られたそれぞれの濃度依存曲線を比較し、MPE (Mean Photo Effect) を求める。

結果は PIF または MPE によって判定する。OECD のガイドライン案に示す方法に従って試験を行った場合、PIF > 5 で陽性、PIF < 2 で陰性、2 < PIF < 5 は疑陽性とする。また、MPE は MPE > 0.15 で陽性、MPE < 0.1 で陰性、0.1 < MPE < 0.15 は疑陽性とする。それ以外の系で試験を行った場合、陽性物質と陰性物質を各自の系で試験し、カットオフ値を決める必要がある。

\* PIF と MPE についての計算の原理とその応用方法は、次章の「5-3) MPE について」を参照されたい。

## 5-2) OECD 試験法ガイドライン案(2002年3月15日)との関係

### 5-2-1) 用量選択手順

#### EU/COLIPA のバリデーション

広い濃度域をカバーして予備試験を実施している。やり方は本試験と同様で光照射と非照射を同時に試験する。最高濃度での pH を調べ、極端な酸性もしくはアルカリ性の場合は pH を調整して用いる。

#### OECD のガイドライン案

試験を開始する前に UV/Vis 吸収スペクトラムを OECD ガイドライン TG101 に従って測定する、その際、molar extension/absorption coefficient が  $10 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  より小さければ試験は行わなくても良い。また、被験物質の処理液を細胞に添加した際の pH は 6.5-7.8 の範囲とする。検体の溶解性にもよるが、最高濃度は  $1000 \mu\text{g/mL}$  としている。

#### 本標準試験法

原則的には OECD ガイドライン案に示すように、化学物質の特性(UV/Vis 吸収スペクトルや pH)により試験に適用するかどうかを決定する。最高濃度の上限は OECD をはじめ、厚生省などのガイドラインにあわせて、 $5\text{mg/mL}$  もしくは  $10\text{mM}$  とする。ただし、本試験系は沈殿する化学物質の試験には適さないので、沈殿が見られない限界濃度まで適用する。

### 5-2-2) 用量段階(用量数)

#### EU/COLIPA のバリデーション

1 回目、2 回目ともに 8 濃度設けている。1 回目のバリデーションでは、その濃度範囲は  $0.5\text{--}5\text{mg/mL}$ 、1 濃度で 3-6 ウェル使用する (1-2 物質/プレート)。試験は濃度設定試験を含み、2 回実施する。また、10-90%に 3 点以上はっていない場合は、より狭い範囲で再試験を行うとしている。

#### OECD のガイドライン案

公比または公差などの希釈段階で 8 濃度設定するとしている。

#### 本標準試験法

濃度間隔は $\sqrt{10}$ 以下として、用量数については特に設けないが、わが国で実施した細胞毒性試験のバリデーションスタディの経験より、細胞の生存率が20-80%の間に2点以上はいるようにする事を条件とする。

#### 5-2-3) 試験に用いる材料、装置、使用細胞

##### EU/COLIPA のバリデーション

下記のような条件で行われた。

細胞：Balb/c 3T3 細胞 (培地：DMEM+10% NBCS)

培養条件：37℃、7.5%CO<sub>2</sub>

播種細胞数：10<sup>4</sup> cells/well

照射装置：統一 (UV-sun simulator: type SOL 500, with filter type H1, Dr.Honle, Germany)

照射量：1.6mW/cm<sup>2</sup> で50分 (5J/cm<sup>2</sup>)

##### OECD のガイドライン案

各国からのコメントもいれて現段階では下記のようなものである。

細胞：Balb/c 3T3 細胞 (培地：DMEM+10% NBCS)、他の細胞の場合は妥当性を記載する、また細胞のUVに対する感受性を調べておく。

培養条件：37℃、5-7.5%CO<sub>2</sub>

播種細胞数：試験の最後に細胞がコンフルエントにならないような密度で播種する。

Balb/c 3T3 細胞の場合は10<sup>4</sup> cells/well

照射装置：太陽光の波長に類似したサンシュミレータ (フィルター装着)、キセノンランプでも水銀メタハライドランプでもよい。

照射量：1.7mW/cm<sup>2</sup> で50分 (5J/cm<sup>2</sup>)

#### 本標準試験法

基本的には OECD のガイドライン案に準じるが、それにこだわらず、十分な背景データがありそれに基づく妥当性があれば他の試験条件でも良い。用いる細胞は Balb/c 3T3 細胞を例示したが、特にこの細胞のみに限定しない。培地や血清のロットも十分に増殖する事が確認されていれば、どれを用いても良い。照射装置や照射線量等の条件も、十分な背景データに従って条件が設定されていること。

#### 5-2-4) データ収集手順

##### EU/COLIPA のバリデーション

1 回目は20 検体、2 回目は30 検体実施し、いずれも濃度設定試験を実施して本試験を行った。照射群と非照射群の IC<sub>50</sub> 値を求め、PIF 値を計算した。バリデーション 2 回目では、PIF 値に加えて、MPE 値を求めた。

##### OECD のガイドライン案

ほぼバリデーションスタディの方法に準じている。

#### 本標準試験法

OECD のガイドライン案にほぼ準じている。

## 5-2-5) データ解析、評価、判断基準

### EU/COLIPA のバリデーション

1 回目、2 回目のバリデーションともにやり方はほぼ同じであるが、2 回目では評価基準として、PIF だけでなく、濃度依存性を考慮した MPE の値を評価の基準に加えた。

- A. 照射、非照射それぞれの IC50 値を算出し、その比である  $PIF = IC50(-UV)/IC50(+UV)$  が 5 より大きい場合に陽性と判定する。
- B. 照射下で毒性があり、非照射下で毒性がない場合、結果は陽性であるが、">factor" の形で表す。この factor は非照射下で毒性の認められなかった最高濃度を IC50(+UV)の値で割って求める。
- C. 照射、非照射ともに試験した最高濃度で毒性がない場合、陰性と判定する。

\*MPE 値： IC50 値が求められないような場合でも使える。MPE は非照射と照射における濃度依存曲線に共通な濃度域から濃度を選んで比較する方法である。ある濃度(C)における光効果(photo effect:PEi) は濃度効果(concentration effect:CEi) と反応効果 (response effect:REi) から得られる。MPE はすべての PEi 値の平均から得られる。MPE<sub>c</sub> = 0.1 が cut-off 値となる。

\*Predictive capacity は 2 × 2 の contingency tables により、*in vivo* での評価と *in vitro* での評価を比較した。これらから以下の項目について計算した: sensitivity、specificity、positive predictivity、negative predictivity、accuracy および prevalence。また、*in vivo* と *in vitro* の関係を  $\chi^2$  検定から求めた。

\*得られたデータの研究室の変動はそれぞれの化合物について、classification variability (CV) として再現性を調べた。研究室間の変動は、それぞれの化合物について CV を比較した。

### OECD のガイドライン案

照射、非照射それぞれの IC50 値を算出し、その比である  $PIF = IC50(-UV)/IC50(+UV)$  を求める。PIF < 2 で陰性、2 < PIF < 5 で疑陽性、PIF > 5 で陽性と判定する。照射、非照射どちらかで IC50 値が求められない場合は、PIF 値は求められない。また、MPE の場合、MPE < 0.1 で陰性、0.1 < MPE < 0.15 で疑陽性、MPE > 0.15 で陽性と判定する。

### 本標準試験法

原則としてこの OECD ガイドライン案を結果の判定に採用する。

## 5-2-6) 陽性、陰性、対照物質について

### EU/COLIPA のバリデーション

下記のように設定した。

陰性対照：検体を溶解もしくは懸濁した溶媒を使用する。

陽性対照：chlorpromazine (CPZ)を使用する。この試験条件下では、照射下での IC50 値は 0.1-2  $\mu$ g/mL、非照射下での IC50 値は 7.0-90.0  $\mu$ g/mL、PIF > 6 となる。

### OECD のガイドライン案

バリデーションと同様に記載した。

### 本標準試験法

OECD ガイドライン案を採用し、CPZ で得られた IC50 値は参考値として示す。

## 5-2-7) 用量反応の説明

バリデーションスタディおよび OECD のガイドライン案では、化学物質の光毒性作用に対して IC50 値をもとめ、それを基準に PIF 値を出し、PIF 値により光毒性を評価している。加えて、光存在下と非存在下での生存率に関する用量依存曲線から、MPE 値を求め光毒性の評価を行っている。この標準試験法でもそれに準じて評価を行うこととした。

#### 5-2-8) 試験法プロトコールの精密度と完全性

ここで推奨する標準的な方法は、重要な点は押えつつ、かなり自由度を持たせて記載した。先にも記載したように、結果に大きな影響を及ぼす可能性のある試験条件（光源の種類や照射線量、細胞の UV 感受性の問題）などもあり、その施設の条件下での背景データを保持していないと、得られた結果を正当に評価できない。したがって、必ず実施施設での背景データを保有しておくことが重要である。

#### 5-2-9) 本試験系の限界

この試験系は動物を用いる光毒性試験の代替法として開発され、評価が行われてきた。その結果、動物で得られる結果と極めて相関性が高く、簡便で再現性も高い事から、代替法として推奨されている。しかしながら、限界として幾つかの問題点が挙げられる。第一に、この方法は薬物代謝の系、すなわち代謝活性化の系が組み込めない事である。その理由として、メカニズムは不明であるが、S9 mix の調製時に添加する補酵素が妨害して光毒性を十分に検出できない点である。第二に、培養細胞の系の限界であるが、溶解しない化学物質に関しては、毒性を適正に調べることができない。また、得られた結果から、光毒性があると判定された場合、その原因として、単純に細胞の傷害だけでなく、光毒性に派生する光アレルギーや DNA に対する傷害に起因する光変異原性や光発がんなどについて、メカニズムに特定した更なる試験を実施しなくてはならない。一方、試験を実施する立場から、通常の培養装置だけでなく、太陽類似光線を光源とする照射装置が必要である事もネックになる。そして、用いる光源の種類によって、生物反応が変わってくる事も大きな問題点である。

#### 5-2-10) 結論

ここに示した光毒性試験の主な目的は、hazard identification でありメカニズムの研究を目的とするものではない。したがって、光毒性物質をもれなくスクリーニングするためには、簡便で精度よく、再現性が高い事が必要である。動物を用いる光毒性試験の代替法の候補として、数多くの方法が開発されているが、ここで推奨した培養細胞を用いる試験方法は、1994 年に EU/COLIPA 主催で多施設によるバリデーションがスタートし、十分な評価がなされてきた方法である。第 4 章で述べたように、今回の我々の評価においてはそれらのデータの質についての確認が十分には行えていないが、それらの実績を踏まえ、現在 OECD のガイドライン化も進行中の段階であり、ここではあえて OECD のガイドライン案と異なる視点で、どのように具体的に試験を進めるかの指針とするべく標準的な方法を記載した。内容的には、なるべく自由度を持たせ、試験を実施しやすく記載した。

### 5-3) 光毒性評価パラメーターについて

担当：大森 崇

#### 5-3-1) はじめに

3T3 細胞を用いた NR 法の Phase II バリデーション研究では、Phase I 研究で用いられていた予測モデルである PIF (photo irritation factor) の他に、Holzh tter (1997) らにより新たに提案された MPE (mean photo effect) という予測モデルが導入され、これら 2 つの予測モデルによる評価が行われている。2 つの予測モデルは、どちらも照射の有無という 2 つの条件下での用量反応曲線の違いを表現する指標である。

ここでは、MPE がどのような指標であるのかを PIF と対比し解説することにする。

#### 5-3-2) PIF について

PIF は、非照射下における用量反応曲線から得られた ED50 を ED50(-UV)、照射下における ED50 を ED50(+UV)としたときに以下のように定義される。

$$PIF = \frac{ED50(-UV)}{ED50(+UV)} \quad (1)$$

実際の試験では、設定した用量の範囲に細胞毒性はみられず、反応の 50%を示すまでの結果を得られないことがある。このような場合には ED50 を得ることができず、このため(1)式として表現される PIF の値を求めることができない。このような状況には 2 つの場合が考えられ、通常、以下のように対処することにする。

1. もしも、ED50(+UV)は求めることができ、ED50(-UV)を求めることができなかった場合、光毒性が示唆されると思われる。この場合には、非照射下で実施された試験のもっとも高い濃度 (Cmax(-UV)) を用いた  $>PIF$  を PIF の値とする。ここで、 $>PIF$  の定義は、

$$>PIF = \frac{Cmax(-UV)}{ED50(+UV)} \quad (2)$$

である。

2. ED50(-UV)、ED50(+UV)のどちらも求めることができなかった場合、光毒性がないということが示唆されると思われる。この場合には、 $PIF=1$  とすることにする。

Phase II 研究では、以下のような判定ルールが SOP に定められていた。

(1)もしも、ED50(-UV)と ED50(+UV)を求めることができた場合、(1)式を用いて PIF お計算し、

PIF  $\geq$  5 ならば陽性

PIF < 5 ならば陰性

(2)もしも、ED50(-UV)が求められず、ED50(+UV)のみ求めることができた場合、(2)式を用いて PIF お計算し、

$>PIF > 1$  ならば陽性

$>PIF \leq 1$  ならば陰性

(3)もしも、ED50(-UV)と ED50(+UV)のいずれも求めることができなかった場合、

PIF=1 で陰性

#### 5-3-3) MPE

##### 5-3-3-1) MPE の導出の背景

PIF は、基本的には照射下、非照射下の両方の ED50 が求めることができることが前提であり、>PIF の値を求めることや、値を「\*1」とすることは便宜的な対処にすぎない。また、>PIF の値は、その値が2つの ED50 の比でないことを示すために、計算値に「>」がつけられる。例えば、その値が 3.1 であるとしたら、表記として「>3.1」と記載される。このようなデータの表記法は、データ処理する際には非常に扱いにくい。困難さの例として、バリデーション研究における施設間差の評価を考えてみたい。被験物質ごとに PIF の値をプロットすることにしたとき、個々のプロットはある施設で得られたある物質の PIF の値となるが、データが「\*1」や「>3.1」というような値である場合にこの値を図の中でどのように示すべきであろうか。さらに、標準偏差を計算するとしたら、その計算をどのように行うべきだろうか。いずれにしる難しい問題となる。したがって、データの処理という立場からすれば、両方の ED50 の値が求まらない場合であっても、定量的な値が求まる方が扱いやすい。

2つの ED50 の値の比として定義される PIF のもう一つの欠点は、用量反応曲線の形が考慮されないことである。PIF では、その定義から光毒性が示唆される物質は照射することにより用量反応曲線が左に併行移動することが前提となっているが、現実には得られたデータから描かれる用量反応曲線は必ずしもそうはなっていない。したがって、照射の有無により用量反応曲線の形が違う場合には、それにも対応できる指標が望ましい。

### 5-3-3-2) MPE の求め方

MPE は、上述した PIF の2つの特徴を克服することを考えて作られた指標である。

PIF の併行移動の考え方は、照射の有無が細胞毒性発現用量に影響を与えているという考え方である。一方、MPE では照射の有無が用量と反応のそれぞれに影響を与えると考える。また、MPE では、PIF のように各用量反応曲線の違いを ED50 で表される1点のみではなく、複数の点を用いる。このように考えることにより、用量反応曲線の形の相違が加味された指標となる。MPE の計算は、用量の影響は DE (dose effect)、反応の影響は RE (response effect) と呼ばれる2つの指標を複数の用量で求めることが基本となる。

#### ① DE (dose effect)

DE は、2つの用量反応曲線の水平方向の違いを評価する指標である。今、非照射下での用量反応曲線のある用量  $d$  における反応を  $r$  としたとき、照射下の用量反応曲線において、 $r$  の値に最も近くなるようにとった照射下での反応の値を  $r^*$  とする。そして  $r^*$  とする照射下での用量を  $d^*$  とする(図1)。このとき非照射下の用量  $d$  における DE を  $DE_d$  とし、以下のように定義する。

$$DE_d = \frac{d/d^* - 1}{d/d^* + 1} \quad (3)$$

#### ② RE (response effect)

RE は、2つの用量反応曲線の垂直方向の違いを評価する指標である。ある用量  $d$  における非照射下での反応を  $R_{(-UV)}[d]$ 、同じ用量での照射下での反応を  $R_{(+UV)}[d]$ 、反応の最大と最小を与える量の差を  $R_0$  とする。このとき、非照射下の用量  $d$  における RE を  $RE_d$  とし、以下のように定義する(図2)。

$$RE_{d_i} = \frac{R_{(-UV)}[d_i] - R_{(+UV)}[d_i]}{R_0} \quad (4)$$

### ③ MPE (mean photo effect)

MPE は、2つの指標である DE と RE の積をいくつかの特定の用量について求めて、平均をとったものとなる。用量の数を N 個とったとき、第 i 番目の用量を  $d_i$  とする ( $i=1 \sim N$ )。このとき、

$DE_{d_i}$  と  $RE_{d_i}$  の積を  $PE_{d_i}$  とすると

$$PE_{d_i} = DE_{d_i} \cdot RE_{d_i}$$

であり、MPE はその平均値として以下のように定義される。

$$MPE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N PE_{d_i} \quad (5)$$

原著である Holz tter (1997) では、重み  $w(d_i)$  を用いて、次に示すようにより一般化した形で MPE を定義している。

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^N w(d_i) PE_{d_i}}{\sum_{i=1}^N w(d_i)} \quad (6)$$

(5)式は重みを 1 とした場合に相当する。

### ④ N の決め方

(注：この記載は、最新の OECD ガイドライン案 (2002 年 3 月 15 日付け) のものと異なっている。ガイドラインはまだ案であるため、ここでは原著に従った。)

MPE は、N 個の用量についての PE (DE と RE の積) の平均であるが、このときの N の数は試験で設定した用量の数とは異なることに注意が必要である。先に PIF は ED50 という一点について照射の有無について比較しており、MPE ではこの点を複数にすることで2つの用量反応曲線の形を考慮していると記載したが、このことが N の数と関係している。ED50 は 50%の反応を与える用量ということであるが、反応は 0%から 100%であるから 50%というのは、反応を均等に2分割する点となる。もし反応を均等に3分割する場合は、33.3%と 66.6%をとればよく、この2つの反応を与える用量は ED33.3、ED66.6 に相当する。同様に、均等に4分割するならば、反応を 25%、50%、75%とすればよく、対応する用量は ED25、ED50、ED75 となる。MPE でいう N の数はこのように反応を均等に分割する数から 1 を減じた数を指しており、個々の DE や RE を求める用量は、分割に対応する用量となる。例えば、N=3 ならば ED25、ED50、ED75 に相当する点で DE と RE を求めればよい。このように求めることにしたときに、実際に N の数をいくつにするか、すなわち反応軸をいくつに分割して計算するかが問題になる。Holz tter は、N の数を徐々に増やしたときに、試験から得られたデータと用量反応曲線とのあてはまりの変化の度合いを比べることで自動的に N の数を決める方法を採用している。

### ⑤ カットオフ値

実際には、光毒性について、陽性または陰性の判断が必要になる。Phase II 研究では、このカットオフ値として 0.1 が採用されている。すなわち

MPE ≥ 0.1 ならば陽性

MPE<0.1 ならば陰性

#### 5-3-3-4) 用量反応曲線

より客観的 MPE や PIF を求めるためには、データから用量反応曲線を推定することが望ましいであろう。曲線の候補としては、ロジスティック曲線のような S 字型の曲線が利用できるであろうが、Holzh tter (1997) はより複雑なモデルの使用を提案している。ここでは、モデルの詳細には触れないが、彼が提案しているモデルは、データとして測定された各点をなめらかにつなぐ関数で結ぶもので、このときの関数として用量反応関係についてある種の理論的なモデルを導入している。この用量反応曲線を使うとかなり柔軟な形を表現することが可能である。

#### 5-3-3-5) 性能の比較

PIF と MPE による光毒性の判定の比較は、Holzh tter (1997) でも行なわれているが、Phase II 研究、UV Filter 研究で得られているデータが参考になるであろう。光毒性の有無の判定については、両方で極端に大きな違いがあるようには思えない。これは、単に陽性か陰性かを判定する場合には、PIF を用いた判定では、PIF の値そのものは求めることができなくても、用量反応曲線の関係の情報を利用した >PIF の値や「\*1」という表記を用いた判定で十分であることを意味している。Phase II 研究や UV Filter 研究では 3T3 細胞を用いた NR 法は良好な成績を示しているので、3T3 細胞を用いた NR 法により光毒性を判定する場合にはどちらの指標を用いてもよいであろう。

#### 5-3-3-6) 議論

ここでは 3T3 細胞を用いた NR 法のバリデーション研究で、予測モデルとして用いられた MPE を、従来より用いられてきた PIF と対比する形で解説した。

MPE は、光毒性の指標としてさまざまな用量反応曲線のパターンに対して具体的な数値が求めることができる。陽性と陰性の判定に関しては >PIF や「\*1」との併記により判定された PIF と大きな違いはないので、この点についてはどちらを用いても大差はないように思われる。光毒性の有無の判定が適切に行えることが指標にとって最も重要であるものの、陽性か陰性かの判定以外の検討を、指標を用いて行いたい場合には PIF に比べて使い勝手がよいと思われる。たとえば、UV Filter 研究では、データのばらつきを施設間、施設内の試験間、繰り返しの 3 つの変動に分解した解析を行っているが、このような解析を行う場合は、MPE は扱いやすい。しかし、扱い易いことと、適切に光毒性を評価していることは異なる。あまり大きな問題は生じないと思われるが、極端な現象が生じた場合に、その値がどのような意味を持つのか、どのような値であるべきか、MPE が望ましい値に要約されているかどうかについては今後検討が必要であるかもしれない。

(6)式は重みを用いて MPE を定義しているが、実際に重みを客観的に与えるのは難しいように思われる。OECD ガイドライン案 (2002 年 3 月 15 日付け) では、この値の決め方について若干の記載が触れられているが、その妥当性については不明である。

Holzh tter (1997) は用量反応曲線として、非常に柔軟で興味深い曲線を採用しているが、極端に外れたデータがあるような場合に対する頑健性がやや気になる。幅広いデータに対応することができる反面、はずれ値のようなデータの影響を受けてしまうと思われる。MPE や PIF を求める際には、生データと用量反応曲線とのあてはまり度合いをチェックすることが必要であろう。

## 参考文献

- Holz tter, H.G.,(1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose response curves and it use for predicting *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA* **25**, 445-462.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., de Silva, O., Holz tter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W. & Pfannenbecker, U.(1998) 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
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechocitch G., de Silva, O., Holz tter, 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.,& Prantom, 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**, 305-327.

## 第6章 まとめ

担当：大野泰雄

文献的情報に基づいて光毒性試験とその代替法について調査した。その結果は以下のように要約できる。

### 6-1) 動物での光毒性試験について

in vivo で光毒性を評価する方法については、かなり古くから研究がなされてきたが、ガイドラインとして正式に認められたものは未だ存在していない。この理由としては動物愛護運動への配慮もあるが、古くから様々な試験法が検討されてきたため、一つの試験法に集約すること、もしくは一つの試験法を選択することが困難なためと考えられる。しかし、経皮投与による試験法についてはモルモットを用いた森川らの方法(1975)を基礎とした方法が化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブックに記載され、化粧品および化粧品原料の光毒性評価に広く用いられており、大卒のコンセンサスが得られていると考えられる。動物を用いる最新の光毒性評価法としては OECD ガイドライン案が提案されている。このガイドライン案は「Acute Dermal Photoirritation Screening Test」と「Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test」の2部から構成されている。動物福祉の観点から無用な試験の実施を避け、また強刺激性物質の試験を最小限にすることに重点が置かれている。これらの方法は、施設内の再現性は高いと考えられるが、試験法の施設間バリデーションは実施されていないため、施設間の再現性については考察できない。また、ヒトと動物との結果の対応性に関する情報は充分とは言えず、in vivo 光毒性試験について false positive や false negative の頻度についての考察は困難である。

### 6-2) In vitro 光毒性試験一般について

in vitro で光毒性を評価する方法には単層培養細胞を用いる方法や培養皮膚モデルを用いる方法、溶血性試験、蛋白変成試験など様々な方法が試みられている。しかし、施設間バリデーションが実施されたものは Balb/c 3T3 細胞を用い、ニュートラルレッド取り込みを指標とする光毒性試験方法(3T3-NR 法)のみである。この方法は 96 ウェルプレートに播種した Balb/c 3T3 細胞を被験物質で 60 分間前処理後、50 分間光照射し、後新鮮な培地に交換した後、更に 24 時間培養した後、ニュートラルレッド取り込み法により細胞毒性を算出するものである。この 3T3-NR 法には次のような長所、短所があげられる。

長所：

- i) 試験法が比較的簡単である。
- ii) 細胞播種して結果が得られるまで3日という短時間で試験が終了する。
- iii) 96 ウェルプレートを用いるので、インキュベータのスペースをとらない。

- iv) マイクロプレートリーダを用いて測定するので、測定が簡単である。
- v) 再現性の高い安定した結果が得られる。
- vi) バリデーシンの結果より、OECD ガイドライン案では Balb/c 3T3 細胞を推奨しているが、原理的にはどのような細胞でも用いることができる。

短所：

- i) 太陽類似光の光源の種類によって波長特性が異なる為、化学物質との光化学反応や毒性として発現してくる生物学的な反応も変ってくる。そのため、ランプの波長特性を予め把握しておくと同時に、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とっておく必要がある。
- ii) UV 測定器についても同様に、UV 強度を検出する為の波長ウィンドウがメーカーによって異なるので、絶対照度を測定する事が難しい。
- iii) 緩衝液に溶けないような被験物質については、正確なデータが得にくい可能性がある。
- iv) 現時点では代謝活性化の過程を含む光毒性試験が組めない。

### 6-3) 3T3-NR 法の施設間バリデーションについての Spielmann らの報告結果について

#### 6-3-1) バリデーションデータの質について

3T3-NR 法についての EU/COLIPA の施設間バリデーションの報告データの信頼性について Spielmann らの3つ文献報告から検討した。その結果、比較的データの質に関する情報が記述されていた Phase II 試験の報告を除き、OECD で示された代替法のバリデーション基準(1996)を満足しているか否かを判断するために必要な情報が十分に提供されているとは言えなかった。なお、文献レベルでのバリデーション研究の質をする一つの方法として、データの質に関する記述がどこまでされているかをチェックするためのチェックリストを作成した。もちろん、このようなチェックリストを用いたとしても、文献のみによる質の検討には限界がある。別途、詳細なバリデーションデータ情報を入手して再評価する必要がある。また、必要に応じて独自のバリデーションを行い、試験法の妥当性を確認すべきである。このバリデーションの規模と内容は事前に得られているデータの質の評価結果に依存している。

#### 6-3-2) 被験物質の選択について

評価の対象となった被験物質数は 44 化学物質であり、*in vivo* での光毒性の有無が明らかであったものとしては、紫外線吸収剤 10 種、香料 4 種、抗生物質・抗菌薬 8 種、抗炎症薬・鎮痛薬 3 種、その他の薬剤 11 種、その他の化学物質 4 種となり、計 40 種であった。紫外線吸収剤の比率が高いが、それ以外は比較的広い領域から選択されていて、被験物質の選択は適切であったと考えられる。しかし、被験物質の溶解性などの性状が 3T3-NR 法に与える影響につい

て充分議論できるような被験物質の選択とはなっていないし、情報提供がなされていない。なお、プロトコールの範囲で使われる溶解助剤を用いた判定結果は大きくは変動しなかった。

#### 6-3-3) in vivo 試験結果との対応性について

ピボ試験結果との対応性として、我々は3つの研究のデータをまとめて、ピボ（ヒト、動物）と予測モデル（PIF、MPE）の関係を検討した。組み合わせにより異なるが、評価した被験物質は、26～38であった。評価指標として、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率を求めた。この結果、ヒト試験を優先した場合のヒトまたは動物の結果と PIF の関係は、感度 88.5%、特異度 91.7%、陽性予測力 95.8%、陰性予測力 78.6%、一致率 89.5%であり、MPE では、感度 90.5%、特異度 90.0%、陽性予測力 95.0%、陰性予測力 81.8%、一致率 90.3%と全体として高かった。この結果は、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効な試験法であると思われる。特にヒトで陽性とされている物質を陽性とする陽性検出力は PIF で 95.8%、MPE で 94.7%と高い値を示したことは本試験法をスクリーニング法として用いることの妥当性を示している。また、2つのパラメーター（PIF、MPE）を併用することにより幅広い薬物について光毒性の程度についての数値データが得られ、評価に有用であると思われる。なお、これらのバリデーション研究で用いられたデータは多くはなく、被験物質の溶解性の影響等について本試験方法の課題もある。

#### 6-3-4) 3T3-NR 法の信頼性について

信頼性については、報告により記載が様々であった。施設内再現性については、UV Filter に関する Phase III 研究で評価することが望ましいと思われる。この研究は4つの施設で20物質を評価しており、報告には各施設で行われた2回の試験について個々の用量反応曲線から測定値から算出された PIF、MPE の値がそれぞれ記載されている。2つの PIF 値の比でみた場合、3倍を越える物質は、のべ 80 物質中わずか4物質であり（80 物質中1施設1物質が1回しか測定されていない）、再現性は悪くなかった。

施設間再現性については、Phase II 研究と UV Filter 研究で評価がされているが、両者で評価方法は異なっている。Phase II 研究では、得られたデータを復元抽出することにより用量反応曲線を繰り返し再現し、その変動を評価する CV（classification variability）という指標が導入され評価されている。11 施設で30物質を評価した Phase II 研究では、CV の最高値は、PIF で 18.8%、MPE で 20.0%となっており、それほど大きな値とはなっていない。一方、UV Filter に関する Phase III 研究では、測定されたデータを施設間、実験間、繰り返しの3つの要因に分け、変動係数が評価指標とされている。この係数も CV（coefficients of variation）として標記されているが、Phase II 研究の CV とは本質的に異なる指標である。UV Filter 研究では、施設間と施設内の CV の比較がされており、一般に施設内の値に比べ、施設間の値の方が大きい（PIF、MPE のいずれも最高値は約 200%であった）という結果が得られている。物質によ

っては、PIF や MPE の値が 10 倍以上異なるものもあった。したがって、PIF や MPE の値での施設間再現性は低いと思われる。ところで、これらの指標とは離れて、光毒性の判定の食い違いに注目した場合、施設により食い違いが生じた被験物質の数は、11 施設で評価された Phase II 研究では、判定不能とされた 1 物質を除いた 29 物質中 PIF で 13 物質、MPE で 11 物質である。このうち、3 施設以上食い違ったのは PIF で 3 物質、MPE で 1 物質であった。また、4 施設で評価された Phase III 研究では、判定の食い違いが生じた被験物質の数は、20 物質中 PIF で 4 物質、MPE で 3 物質であった。以上の結果から、この結果は、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、光毒性の判定の施設間再現性という観点からは、再現性を有する試験法であると思われる。

即ち、施設内の再現性は高いが、施設間の再現性は高いとは言えない。このバラツキが光毒性の予測性に大きな影響を与えている場合は少ないが、施設により誤ったデータが蓄積される可能性もある。また、本来、施設毎の生データを解析することにより、再現性を調べることが常道であり、これがもっとも重要な点であると考えるが、今回は文献結果からの解析であり、その評価に限界があることを認識する必要がある。

#### 6-3-5) 総合評価

以上より、文献上に記載された要約指標の値に基づき総合的に判断した場合、3T3-NR 法は、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率は 90%前後と高く、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効であり、かつ結果の判定の観点からはある程度の施設間再現性を有する試験法であるといえるだろう。

ただし、この結論はあくまでも文献上からの評価である。我々の検討では生データやバリデーションにおけるデータ検討会や management 会議の議事録等を得ているわけではない。したがって、データの質を十分に確かめることはできていない。したがって、文献に試験結果が正しく反映されているか否かについての確認はできていない。また、3つの文献で評価された物質数は決して多くはなく、偽陽性が高めになる可能性があることを考慮すると、本方法のみで光毒性の有無を判定することにはリスクがあり、この試験法について更に検討する余地があると思われる。

よって、我々はこの試験法を代替法として、我が国で導入する場合には、大規模ではないにしてもこの結果を確認することを目的とした、質の高いデータに基づくバリデーション研究を実施する必要があると考える。

### 6-4) 3T3-NR 法の受け入れに関して

新しい試験法を行政的に受け入れる際には試験法の普及性、若干の修正に対する頑健性、教育訓練及び専門性の必要性、必要な装置や材料の入手の容易さ、コストとそれに見合う有用性、

っては、PIF や MPE の値が 10 倍以上異なるものもあった。したがって、PIF や MPE の値での施設間再現性は低いと思われる。ところで、これらの指標とは離れて、光毒性の判定の食い違いに注目した場合、施設により食い違いが生じた被験物質の数は、11 施設で評価された Phase II 研究では、判定不能とされた 1 物質を除いた 29 物質中 PIF で 13 物質、MPE で 11 物質である。このうち、3 施設以上食い違ったのは PIF で 3 物質、MPE で 1 物質であった。また、4 施設で評価された Phase III 研究では、判定の食い違いが生じた被験物質の数は、20 物質中 PIF で 4 物質、MPE で 3 物質であった。以上の結果から、この結果は、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、光毒性の判定の施設間再現性という観点からは、再現性を有する試験法であると思われる。

即ち、施設内の再現性は高いが、施設間の再現性は高いとは言えない。このバラツキが光毒性の予測性に大きな影響を与えている場合は少ないが、施設により誤ったデータが蓄積される可能性もある。また、本来、施設毎の生データを解析することにより、再現性を調べることが常道であり、これがもっとも重要な点であると考えるが、今回は文献結果からの解析であり、その評価に限界があることを認識する必要がある。

#### 6-3-5) 総合評価

以上より、文献上に記載された要約指標の値に基づき総合的に判断した場合、3T3-NR 法は、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率は 90%前後と高く、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効であり、かつ結果の判定の観点からはある程度の施設間再現性を有する試験法であるといえるだろう。

ただし、この結論はあくまでも文献上からの評価である。我々の検討では生データやバリデーションにおけるデータ検討会や management 会議の議事録等を得ているわけではない。したがって、データの質を十分に確かめることはできていない。したがって、文献に試験結果が正しく反映されているか否かについての確認はできていない。また、3つの文献で評価された物質数は決して多くはなく、偽陽性が高めになる可能性があることを考慮すると、本方法のみで光毒性の有無を判定することにはリスクがあり、この試験法について更に検討する余地があると思われる。

よって、我々はこの試験法を代替法として、我が国で導入する場合には、大規模ではないにしてもこの結果を確認することを目的とした、質の高いデータに基づくバリデーション研究を実施する必要があると考える。

#### 6-4) 3T3-NR 法の受け入れに関して

新しい試験法を行政的に受け入れる際には試験法の普及性、若干の修正に対する頑健性、教育訓練及び専門性の必要性、必要な装置や材料の入手の容易さ、コストとそれに見合う有用性、

試験法導入に要する時間、動物愛護の立場から 3 R s の面からの妥当性等について考慮する必要がある。今回検討した 3T3-NR 法はこれらの点でほぼ満足できるものである。この方法は動物実験代替法の側面以外にも、時間的、経済的な面から有利な点も多く、本実験方法がリスクとベネフィットのトータルバランスの点からも優れたものであると考えられる。

今回の光毒性試験の導入で大きな問題は光源である。どのような光源が妥当であるかについてはさらに検討を加えなければならない。光毒性試験を普及させるためには、色々なメーカーの光源についてデータを蓄積する必要がある。

なお、光毒性試験は化粧品のみならず、医薬品や医薬部外品、また、一般化学物質の安全性評価に必要である。また、局所作用のみならず全身的作用、複合作用や代謝による影響などについても十分配慮する必要性も大きい。そのための諸因子を含めた幅広い *in vitro* 実験方法の開発について要望するものである。

## 6-5) 標準的試験法について

Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法による光毒性試験はヒトや動物の光毒性データとの対応や施設間での再現性も良く、光毒性の評価に有効である事が示された。一方、使用する細胞の種類や光源等、必ずしもガイドライン案で示された方法で試験が可能であるとは限らない。そこで、基本的にはこの OECD のガイドライン案に準じた試験法を、データの信頼性を損なわないと思われる範囲で照射条件や用いる細胞株、試験の方法などに自由度を持たせて改変した方法を標準的試験法として提案した。

### 1) その他

① *in vivo* において光刺激性発現の場合は皮膚であることを考慮すると、皮膚細胞の活用や測定指標（ニュートラルレッドの取り込み）の見直しが必要となるかも知れない。

② 評価パラメーターである PIF や MPE の cut-off 値の妥当性については実際にはバリデーションが実施されていない。これについては今後のデータの蓄積により再検討が必要となるかも知れない。

③ 代謝活性化については検出感度向上の観点から将来検討すべきと考えられる。

④ bergapten (bergamot oil 中の香料成分)等の香料は本 3T3 NRU 法が香料に対して感度が低いことが報告されており、その原因の解明とそれらの光毒性を正確に評価する新たな *in vitro* 試験法の開発が必要である。

⑤ 難溶性物質や製品を評価可能な 3次元皮膚モデルの使用や他の *in vitro* 試験との battery が考えられるが、今後の課題である。

## 6-6) 結論

3T3-NR 光毒性試験法は in vivo 結果との対応が良く、被験物質の光毒性の有無を評価するのに有効であると思われた。しかし、文献的情報のみではデータの質や再現性が明らかにはできない。また、試験法を若干変更した場合の頑健性等について不明確なところもある。従って、我が国においても少数の被験物質を用いて施設間バリデーションを行い、試験法の再現性や in vivo との対応性など、試験としての妥当性について確認する必要があると考える。また、本試験法では感度の低い物質群の存在することも報告されており、それらについて更に基礎的な検討の推進が必要である。また、公開のワークショップ等を開催し、広く意見を求めることも必要であろう。

なお、現在、Dr Spielmann より詳細なバリデーション情報を入手中であり、文献のみで確認できなかった点について更に検討する予定である。

20010968

以降、「OECD Guideline for testing of chemicals, draft proposal for a new guideline:432, In vitro 3T3 NRU phototoxicity test」前までは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、「添付資料一覧表」をご参照ください。

### 「添付資料一覧表」

- 1) Spielmann et al. (1994) EEC/COLIPA Project on In Vitro Phototoxicity Testing: First Results Obtained with A BALB/C 3T3 Cell Phototoxicity Assay, Toxicology in Vitro 8 793-796.
- 2) Spielmann et al. (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, 305-327.
- 3) Spielmann et al. (1998) 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.

**OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS****DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE: 432*****In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test****INTRODUCTION**

1. Phototoxicity is defined as a toxic response from a substance applied to the body which is either elicited or increased (apparent at lower dose levels) after subsequent exposure to light, or that is induced by skin irradiation after systemic administration of a substance.
2. The *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test is used to identify the phototoxic potential of a test substance induced by the excited chemical after exposure to light. The test evaluates photo-cytotoxicity by the relative reduction in viability of cells exposed to the chemical in the presence versus absence of light. Substances identified by this test are likely to be phototoxic *in vivo*, following systemic application and distribution to the skin, or after topical application.
3. Definitions used are provided in Annex 1.

**INITIAL CONSIDERATION**

4. Many types of chemicals have been reported to induce phototoxic effects (1)(2)(3)(4). Their common feature is their ability to absorb light energy within the sunlight range. According to the first law of photochemistry (Grotthaus-Draper Law), photoreaction requires sufficient absorption of light quanta. Thus, before biological testing is considered, a UV/vis absorption spectrum of the test chemical must be determined according to OECD Test Guideline 101. If the molar extinction/absorption coefficient is less than  $10 \text{ litre} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  the chemical has no photoreactive potential and may not need to be tested in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test or any other biological test for adverse photochemical effects (1)(5). See also Annex 2.
5. The reliability and relevance of the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test was recently evaluated (6)(7)(8). The *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test was shown to be predictive of acute phototoxicity effects in animals and humans *in vivo*. The test is not designed to predict other adverse effects that may arise from combined action of a chemical and light, e.g., it does not address photogenotoxicity, photoallergy, or photocarcinogenicity, nor does it allow an assessment of phototoxic potency. In addition, the test has not been designed to address indirect mechanisms of phototoxicity, effects of metabolites of the test substance, or effects of mixtures.
6. Whereas the use of metabolising systems is a general requirement for all *in vitro* tests for the prediction of genotoxic and carcinogenic potential, up to now, in the case of phototoxicology, there are only rare examples where metabolic transformation is needed for the chemical to act as a phototoxin *in vivo* or *in vitro*. Thus, it is neither considered necessary nor scientifically justified for the present test to be performed with a metabolic activation system.