Entwicklung eines neuen *in vitro* Tests auf dermale Phototoxizität mit einem Modell menschlicher Epidermis (EpiDerm™)

Manfred Liebsch, Christa Barrabas, Dieter Traue und Horst Spielmann

ZEBET/BgVV, D-12277 Berlin

Zusammenfassung

Wir berichten über die Ergebnisse von Versuchen, die für das Vollhautmodell Skin² von ZEBET entwickelte Methode der Phototoxizitätsprüfung auf das Epidermismodell EpiDerm™ zu übertragen. Im neuen EpiDerm™ Phototoxizitätstest wird die Zytotoxizität von Prüfsubstanzen, die auf die Oberfläche des Hautmodells aufgetragen werden, bei fünf Konzentrationen bestimmt. Dies erfolgt in einem Parallelexperiment in Gegenwart und Abwesenheit einer nicht zytotoxischen Dosis von UVA und sichtbarem Licht (Sonnensimulator). Die Zytotoxizität wird am nächsten Tag im MTT-Test gemessen. Experimente zur Optimierung der Testbedingungen werden dargestellt. Die Prüfung bekannter phototoxischer und nicht phototoxischer Testsubstanzen zeigte, daß ein Epidermismodell, wie z.B. EpiDerm™, in der gleichen Weise für die *in vitro* Phototoxizitätsprüfung geeignet ist wie ein komplettes Hautmodell.

Summary: Development of a new in vitro test for dermal phototoxicity using a model of reconstituted human epidermis (EpiDerm™).

Results are reported using the human epidermis model (EpiDerm™) in a test protocol that was adopted from the method developed by ZEBET for phototoxicity testing with the model Skin². In the new phototoxicity test the cytotoxicity of test materials applied topically to EpiDerm™ is determined at five concentrations in the absence and presence of a non-cytotoxic dose of UVA and visible light (sun simulation). Cytotoxicity is determined one day after irradiation in the MTT assay. Experiments performed to optimise test conditions are presented. Using appropriate phototoxic and non-phototoxic test chemicals our results demonstrate that a reconstructed human epidermal model, e.g. EpiDerm™, can be used in phototoxicity testing in the same way as a full skin model.

Key words: *in vitro* testing, dermal phototoxicity, human epidermal model, EpiDerm™

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

ZEBET hat 1993 an der Entwicklung eines *in vitro* Phototoxizitätstests mit dem menschlichen Hautmodell Skin² der Firma Advanced Tissue Sciences (La Jolla, USA) gearbeitet (Edwards et al., 1994; Liebsch et al., 1995). Dieser Test wurde im Rahmen des EU/COLIPA Validierungsprojektes von *in vitro* Phototoxizitätstests experimentell prävalidiert. Ende Oktober 1996 wurde die Produktion von Skin² überraschend eingestellt. Aufgrund der guten Ergebnisse des Skin² Phototoxizitätstests und des Bedarfes an einem Test, der auf einem Hautmodell basiert, hat sich ZEBET daraufhin entschlossen, aufbauend auf den mit Skin² gewonnenen Erfahrungen, einen neuen Test mit dem kommerziell hergestellten menschlichen Epidermismodell EpiDerm™ der Firma MatTek (Ashland, USA) zu entwickeln. Im Gegensatz zu Skin² handelt es sich bei EpiDerm™ nicht um ein Vollhautmodell,

sondern um ein dreidimensionales, differenziertes Modell der menschlichen Epidermis. Da die Keratinozyten der Epidermis die relevanten Zielzellen für phototoxische Reaktionen an der Haut sind, konnte eine Gleichwertigkeit beider Modelle angenommen werden. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sollen hier erstmals vorgestellt werden, um zu belegen, daß eine Methodik nicht allein dadurch verlorengelassen, daß eine Firma die Produktion eines speziellen Hautmodells einstellt. Unsere Ergebnisse belegen vielmehr, daß allgemeine toxikologische Eigenschaften mit jedem menschlichen Hautmodell geprüft werden können, sofern es bestimmte morphologische Kriterien erfüllt.

1.2 Zielsetzung

Unter Phototoxizität versteht man toxische Sofortreaktionen, die nach einmaliger Applikation eines chemischen Stoffes und anschließender Bestrahlung mit Licht oder UV-Bestrahlung hervorgeru-

fen werden. Phototoxizität kann auch nach systemischer Aufnahme des Stoffes und anschließender Lichtexposition hervorgerufen werden. Voraussetzung für phototoxische Reaktionen eines Stoffes ist, daß er bestimmte Anteile des Lichtes (UV Licht und bei Farbstoffen sichtbares Licht) absorbiert, dadurch einen energiereicheren, angeregten Zustand erreicht und auf diese Weise reaktionsfähiger wird. Bei der phototoxischen Reaktion eines Stoffes wird auf zellulärer Ebene die Energie auf andere Moleküle übertragen, so daß diese verändert werden. Dabei konnten auf molekularer Ebene verschiedene phototoxische Reaktionswege identifiziert werden, wie z.B. die Oxidation von Molekülen, die Bildung von Radikalen und reaktiver Metaboliten (Spielmann et al., 1994a). Der ECVAM Workshop No. 2 „*In Vitro Phototoxicity Testing*“ hat frühere Untersuchungen bestätigt, nach denen phototoxische Reaktionen hauptsächlich durch UVA verursacht werden, und deshalb empfohlen, bei der Testung auf

Abbildung 1: Die Abbildung zeigt den experimentellen Ablauf des EpiDerm™ Phototoxizitätstests. Je zwölf Gewebe eines EpiDerm™ Kits (24 Gewebe) werden dabei mit einer Vehikelkontrolle und fünf Konzentrationen der Testsubstanz behandelt. Zwei identische parallele Testansätze werden an den beiden folgenden Tagen in gleicher Weise behandelt, jedoch wird ein Versuchsansatz am Tag nach der Substanzapplikation mit einem Sonnensimulator (+UVA) bestrahlt, und der andere (-UVA) verbleibt während dieser Zeit im Dunkeln.

Phototoxizität Sonnenlichtsimulatoren unter Einschluss von UVA und Ausschluss von UVB zu verwenden (Spielmann et al., 1994a). Alle bekannten phototoxischen Reaktionen chemischer Stoffe führen letztlich zu Zellschädigungen, die sich am einfachsten in Zytotoxizitätstests an den unterschiedlichsten Zellen erfassen lassen. So hat sich der im Rahmen eines EU/

COLIPA Projektes entwickelte *in vitro* Photozytotoxizitätstest mit der 3T3 Fibroblastenzelllinie der Maus in Validierungsstudien als gut reproduzierbar und prädiktiv zur Vorhersage des phototoxischen Potentials chemischer Stoffe erwiesen (z.B. Spielmann et al., 1994b, 1994c; 1997). Nach der erfolgreich abgeschlossenen Validierung wird dieser Photozy-

totoxizitätstest von den beteiligten Wissenschaftlern und auch vom Wissenschaftlichen Beirat (ESAC) des EU Validierungszentrums ECVAM als validierte Alternativmethode angesehen. Sie soll die Grundlage für eine OECD Richtlinie zur Prüfung auf phototoxische Eigenschaften bilden (ECVAM, 1997).

In der Praxis werden auch Stoffe, die ein phototoxisches Potential aufweisen, in geeigneter Zubereitung ohne Risiko für den Verbraucher eingesetzt. Im Rahmen des ECVAM Workshops No. 2 „*In Vitro Phototoxicity Testing*“ (Spielmann et al., 1994a) wurde eine Teststrategie entwickelt, bei der zuerst mit einem *in vitro* Test geprüft wird. Falls in einem *in vitro* Test ein phototoxisches Potential festgestellt wird und der Stoff am Menschen angewendet werden soll, sieht auch die von ECVAM vorgeschlagene Teststrategie in einem solchen Fall vor der Anwendung am Menschen einen Tierversuch zur Ermittlung des „no effect levels (NOEL)“ vor. Zum Ersatz eines solchen Tierversuches bieten sich *in vitro* Tests mit biotechnologisch hergestellten menschlichen Hautmodellen an, da sie wichtige Zielzellen des phototoxischen Geschehens enthalten (Keratinocyten der Haut) und genau wie menschliche Haut eine Penetrationsbarriere aufweisen. Hinweise für die Verwendbarkeit von rekonstituierter EpiDermis für den Nachweis phototoxischer und photoprotektiver Eigenschaften liegen vor (Rouget et al., 1994).

1.3 Bedarf für den EpiDerm™ Phototoxizitätstest

Wie oben beschrieben, zeigt der von EU/ECVAM, COLIPA und ZEBET gemeinsam entwickelte und validierte 3T3 NRU Phototoxizitätstest (3T3 NRU PT) beim Laborvergleich eine fast 100%ige Reproduzierbarkeit und eine ebenso große Sicherheit bei der Vorhersage des phototoxischen Potentials von Stoffen (Spielmann et al., 1997). Die Ermittlung spezieller toxischer Eigenschaften eines Stoffes ermöglicht es jedoch nicht zu entscheiden, ob er in verbrauchernahen Produkten und Zubereitungen in ungefährlichen Konzentrationen eingesetzt werden kann. Dies ist unter anderem bei Kosmetika ein wichtiges Problem: So sind z.B. einige Parfümöle phototoxisch, werden aber in geringen und deshalb unbedenklichen Konzentrationen eingesetzt, in denen das

phototoxische Potential nicht zum Tragen kommt. (Beispiele für phototoxische Parfümöle sind Bergamot Öl und Musk Ambrette, die jedoch heute nicht mehr in Kosmetika eingesetzt werden.) Damit auch die Unbedenklichkeit kosmetischer Formulierungen künftig vor der Prüfung am Menschen *in vitro* getestet werden kann, ist ein Test notwendig, der sowohl die Barrierefunktion als auch die Zielzellen der menschlichen Haut einschließt. Diese Risikoabschätzung ist in einem einfachen Photozytotoxizitätstest, wie dem 3T3 NRU PT Test, nicht möglich.

1.4 Aufgabenstellung

Aufbauend auf den mit dem Vollhautmodell gewonnenen Erfahrungen waren folgende Experimente erforderlich, um das Testprotokoll zu optimieren und um zu zeigen, daß der neue Test so reproduzierbar ist, daß er im Rahmen einer Validierungsstudie in mehreren Laboratorien geprüft werden kann:

- 1) *Testung der UVA-Empfindlichkeit* des Modells EpiDerm™ zur Ermittlung einer optimalen Lichtdosis für den Test. Diese muß ausreichend hoch für die physikalische Aktivierung der Testsubstanzen sein, darf aber allein noch keine toxische Wirkung auf die Zellen des Epidermismodells im MTT-Zytotoxizitätstest zeigen.
- 2) *Technische Anpassung* der Skin²-Methodik auf die spezifischen Anforderungen des Epidermismodells EpiDerm™.
- 3) *Optimierung des Tests* hinsichtlich der Expositionsdauer mit der Prüfsubstanz vor der Bestrahlung. Diese Zeitspanne ist abhängig von den Barriereleistungen des Epidermismodells.
- 4) *Vergleich der Empfindlichkeit* des EpiDerm™ Tests mit dem Skin² Test. Da sich ein mit dem Skin² Test vergleichbares Testprotokoll auch als optimal für EpiDerm™ erwies, sollte hier anhand einer Referenzsubstanz geprüft werden, ob die in beiden Tests erzielten Ergebnisse auch vergleichbar sind.
- 5) *Testung des Einflusses des verwendeten Lösungsmittels / Vehikels*. Diese Prüfungen sollen zeigen, welchen Einfluß verschiedene Trägermedien eines phototoxischen Stoffes auf das Testergebnis haben.
- 6) *Entwicklung einer Standard Arbeitsvorschrift (SOP)*, die sowohl Kriterien für die Prüfung der Qualität des Tests ent-

halten muß, als auch ein vorläufiges Vorhersagemodell (Prädiktionsmodell) für die Umsetzung der *in vitro* Ergebnisse in eine Beurteilung der phototoxischen Eigenschaften von Stoffen.

- 7) *Erarbeitung einer Datenbasis*, die eine Beurteilung der Testleistungen erlaubt. Dabei sollten überwiegend Stoffe getestet werden, für die auch schon Ergebnisse von Skin² vorliegen, um einen Vergleich zwischen den im Hautmodell und den im Epidermismodell erhaltenen Daten zu ermöglichen.

2 Material und Methoden

Die Entwicklung der Methodik wird in den früheren Publikationen unserer Arbeitsgruppe mit dem Modell Skin² ausführlich beschrieben (Edwards et al., 1994; Liebsch et al., 1994, 1995). Sie soll hier deshalb nur kurz schematisch anhand des in Abbildung 1 beschriebenen Testablaufes erläutert werden. Der Test ist dem *in vivo* Test auf der Haut von Versuchstieren sehr ähnlich, das heißt Testsubstanzen werden topisch auf die Hornschicht der Epidermis (*stratum corneum*) aufgetragen und nach einer ausreichenden Einwirkungszeit mit einem Sonnensimulator (UVA + sichtbares Licht; Lampe SOL 500 und dem H-1 Filter der Firma Dr. Höhle, D-Martinsried) bestrahlt, wie in den Arbeiten mit Skin² beschrieben. Auf das EpiDerm™ Modell können sowohl Lösungen als auch stabile Suspensionen appliziert werden.

Das Testprinzip besteht aus dem Vergleich der Zytotoxizität, die ein Stoff bei identischen Testkonzentrationen in einem Parallelversuch mit Bestrahlung (+UVA) und ohne Bestrahlung (-UVA) in den Keratinozyten des Epidermismodells zeigt. Toxikologischer Endpunkt des Tests ist der MTT-Zytotoxizitätstest (Mosmann et al., 1983), bei dem photometrisch eine Zellstoffwechselleistung der Mitochondrien gemessen wird. Die Zellschädigung wird als Verminderung dieser Stoffwechselleistung im Vergleich zu nur mit Lösungsmitteln oder Vehikeln (H₂O oder Öl) behandeltem Kontrollgewebe ausgedrückt.

Das im Rahmen der Testentwicklung erarbeitete, endgültige Test-Design und der Zeitablauf sind in Abbildung 1 wiedergegeben. Wichtig ist dabei, daß EpiDerm™ per Luftfracht über Nacht aus den

USA so abgestimmt geliefert wird, daß es am Dienstag im Testlabor eintrifft und ab Mittwoch früh im Test verwendet wird. Der erste Medienwechsel nach einer Stunde, also bevor der eigentliche Test beginnt, ist essentiell, um das Modell EpiDerm™ nach dem Transport einheitlich zu konditionieren. In dieses Medium werden die während des Transports akkumulierten Stoffwechselprodukte, Mediatoren und Zellfragmente abgestoßen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Testung der UVA-Empfindlichkeit des Modells EpiDerm™ (Modell EPI-200)

Die wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung von Phototoxizitätstests ist die Bestimmung einer nicht toxischen UVA-Dosis mit den Zellen bzw. Geweben, die in dem Test eingesetzt werden. Zur Prüfung der UVA-Empfindlichkeit des EpiDerm™ Gewebes wurde es in der für den Phototoxizitätstest vorgesehenen, konstanten Bestrahlungsstärke von 1,7 mW/cm² in Zeitreihen bei zunehmender Bestrahlungszeit mit UVA-Dosen von 3 bis 21 Joule/cm² bestrahlt (je 3 Gewebe pro UVA-Dosis), 21 Std. später wurde ein MTT-Test durchgeführt. Das Experiment wurde an vier verschiedenen EpiDerm™ Chargen aus verschiedenen Wochen wiederholt. Die Ergebnisse der Experimente sind in den Abbildungen 2a und 2b dargestellt und zeigen deutlich, daß eine Dosis von 6 J/cm² die höchste UVA-Dosis ist, bei der eine zytotoxische Wirkung ausgeschlossen werden kann, wenn die Zytotoxizität im MTT-Test bestimmt wird. Diese Dosis ist vergleichbar mit der im 3T3 NRU PT Test verwendeten UVA Dosis (Spielmann et al., 1994b, c). Diese Dosis ist damit sicherlich stark genug, um phototoxische Stoffe ausreichend mit UVA zu aktivieren. Außerdem liegt diese Dosis im Bereich der im Tierversuch zur Prüfung der Phototoxizität chemischer Stoffe verwendeten UVA Dosen (Spielmann et al., 1994a).

3.2 Technische Anpassung der Skin² Methodik an die spezifischen Anforderungen des Hautmodells EpiDerm™

Der mit Skin² bei ZEBET entwickelte Phototoxizitätstest wurde zunächst hinsichtlich der Expositionszeit und des toxikologischen Endpunktes Zytotoxizität im

MTT-Test ohne Veränderungen auf das EpiDerm™ Modell übertragen. Die Expositionszeit war auch bei EpiDerm™ optimal, jedoch waren folgende technischen Anpassungen notwendig:

► Die EpiDerm™ Gewebe sind nicht wie Skin² auf einem Trägernetz angewachsen und werden daher auch nicht in Stücke

geschnitten geliefert. Die EpiDerm™ Gewebe wachsen während der Herstellung auf einer semipermeablen, beschichteten Polycarbonatmembran auf dem Boden von 10 mm Millicell® Gefäßeinsätzen (Töpfchen). Die Einsätze stehen in 24-well Zellkulturschalen im Kulturmedium. Während des gesamten EpiDerm™ Pho-

Abbildungen 2a und 2b: Die Darstellung zeigt Experimente zur UVA Empfindlichkeit von EpiDerm™ zur Ermittlung der höchsten nicht zytotoxischen UVA Dosis im Phototoxizitätstest. Abbildung 2a zeigt vier unabhängige Tests an verschiedenen EpiDerm™ Chargen (jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus drei Geweben). Abbildung 2b zeigt pro UVA Dosis aus den zwölf getesteten Geweben den Mittelwert, die Standardabweichung (Box) und die Extremwerte (Minima, Maxima). Danach ist die Bestrahlung mit 6 J/cm² die höchste im EpiDerm™ Modell sicher nicht zytotoxische UVA-Dosis. Diese Dosis entspricht den bei *in vivo* Versuchen verwendeten Dosen und reicht für die Anregung phototoxischer Stoffe aus.

totoxizitätstests bleiben die Gewebe in diesen Einsätzen, d. h. ein Gewebetransfer in ein neues Milieu beinhaltet immer den Transfer des gesamten 10 mm Einsatzgefäßes. Aus diesem Grunde mußten vor allem die Waschprozedur zum Entfernen der Testsubstanz und die Formazan Extraktion im MTT-Test angepaßt werden.

► ZEBET hat mit Skin² die Erfahrung gesammelt, daß der Konditionierung der Gewebe nach dem Überseetransport eine hohe Bedeutung zukommt. Dazu werden die Gewebe vor Testbeginn auf Medium gesetzt, in welches sie die beim Transport auf Agarose akkumulierten Stoffwechselprodukte entlassen können. Erst nach einem Umsetzen auf frisches Medium kann mit der Testung begonnen werden. Bei Skin² wurde diese Konditionierung über Nacht vorgenommen. Da die Firma Mat-Tek nur am Montag jeder Woche EpiDerm™ in den USA verschickt, kommen die Gewebe nicht vor Dienstagabend in die Europäischen Laboratorien. Der EpiDerm™ Phototoxizitätstest dauert 3 Tage und muß daher am Mittwoch früh begonnen werden. Es wird deshalb eine Konditionierung von nur einer Stunde durchgeführt (s. Abbildung 1). Dies reicht offensichtlich aus, da sich bei ZEBET die Vitalität der Gewebe der unbehandelten Kontrollen (absolute MTT-OD₅₇₀) nicht von den beim Hersteller in den USA gemessenen Werten unterscheidet.

3.3 Optimierung des Tests hinsichtlich der Expositionsdauer mit der Prüfsubstanz vor der Bestrahlung

Nachdem die optimale UVA-Dosis mit 6 J/cm² (= 60 min bei 1,7 mW/cm²) ermittelt war, wurde die Dauer der Vorbehand-

lung mit den Prüfsubstanzen variiert. In Abbildung 3 sind die Ergebnisse für die beiden bekannten phototoxischen Stoffe Bergamot Öl und Anthracen bei 3stündiger, 6stündiger und 21stündiger Vorbehandlungsdauer wiedergegeben. Die Ergebnisse zeigen bei diesen beiden Stoffen, daß die phototoxischen Eigenschaften bei einem Einwirken der Prüfsubstanzen über 21 Stunden am empfindlichsten sind. Dieselbe Behandlungsdauer hatte sich auch beim Skin² Modell als optimal erwiesen.

3.4 Vergleich der Empfindlichkeit des EpiDermTM Tests mit dem Skin² Test

Ein Vergleich der Empfindlichkeit der beiden Hautmodelle bei der Phototoxizitätsprüfung wurde mit Chlorpromazin durchgeführt, das klassischerweise als positive Standardsubstanz eingesetzt wird. Die Skin² Ergebnisse in Abbildung 4 wurden 1994/95 innerhalb der EU/CO-LIPA Validierungsstudie bei ZEBET erhoben, die Ergebnisse mit EpiDermTM in der vorliegenden Studie. Abbildung 4 zeigt für identische Vorbehandlungszeiten von 21 Std. und identische Chlorpromazin-Konzentrationen fast identische Ergebnisse. Dieses Ergebnis bestätigt, daß die bei ZEBET für das Hautmodell Skin² erarbeitete Methode zur Phototoxizitätsbestimmung ohne grundsätzliche Änderungen auch beim Epidermismodell EpiDermTM anwendbar ist. Dieses Ergebnis bestätigt unsere Arbeitshypothese, daß eine für künstliche Hautmodelle entwickelte toxikologische Prüfmethode nicht für jedes Modell neu entwickelt werden muß bzw. daß sie mit dem Verschwinden des Modells vom Markt nicht verloren geht.

Abbildung 3: Die Darstellung zeigt Experimente zur Ermittlung der optimalen Behandlungzeit mit den Testchemikalien vor der UVA Bestrahlung mit den beiden phototoxischen Stoffen Bergamot Öl und Anthracen. Die schwarzen Balken zeigen die mittlere Viabilität der unbestrahlten Gewebe und die grauen Balken die mittlere Viabilität der bestrahlten Gewebe, jeweils im Verhältnis zur mittleren Viabilität der Vehikelkontrollen. Für beide Stoffe ergab sich bei einer Vorbehandlungszeit über Nacht (21 Stunden) eine bessere Empfindlichkeit als bei kürzeren Vorbehandlungszeiten (3 und 6 Stunden).

3.5 Testung des Einflusses des verwendeten Lösungsmittels / Vehikels

Um zu prüfen, welchen Einfluß das Vehikel bzw. Lösungsmittel bei Applikation auf die Haut unter Standardbedingungen auf die phototoxischen Eigenschaften im EpiDermTM Modell hat, wurde wiederum Chlorpromazin, das gut wasserlöslich ist, im Konzentrationsbereich von 0,001-1%iger Lösung in Wasser, in einer Wasser-in-Öl Suspension sowie in Öl (Sesamöl) appliziert. Die in Tabelle 1 wiedergegebenen Ergebnisse bestätigen, daß Chlorpromazin als wasserlösliche Substanz in zwei Wiederholungsexperimenten bereits bei einer Konzentration

von 0,002% phototoxisch wirkte. Bei Verwendung der Wasser-in-Öl Suspension waren phototoxische Eigenschaften erst bei 0,2% nachweisbar, also einer 100fach höheren Konzentration, und wenn eine Lösung in Öl gewählt wurde, trat diese Wirkung erst bei einer 1%igen Lösung auf. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß der Test geeignet ist, den Einfluß des Lösungsmittels bzw. Vehikels bei topischer Applikation im EpiDermTM Hautmodell auf das Penetrationsverhalten abzuschätzen.

Tabelle 1 zeigt außerdem ähnliche Untersuchungen zum Einfluß des Lösungsmittels auf die phototoxischen Eigen-

Abbildung 4: Am Beispiel des phototoxischen Stoffes Chlorpromazin (CPZ) zeigt die Darstellung einen Vergleich der 1994/95 mit dem Hautmodell Skin² erhaltenen Ergebnisse mit den unter gleichen Bedingungen (Vorbehandlungszeit und Stoffkonzentrationen) 1997 mit EpiDermTM erhaltenen Ergebnisse. Die schwarzen Balken zeigen die mittlere Viabilität der unbestrahlten Gewebe und die weißen Balken die mittlere Viabilität der bestrahlten Gewebe, jeweils im Verhältnis zur mittleren Viabilität der Vehikelkontrollen. In beiden Modellen wurde ab 0,01% eine phototoxische Reaktion ermittelt.

schaften mit Promethazin (PMZ), das genau wie Chlorpromazin wasserlöslich ist und phototoxisch wirkt. Auch hier waren phototoxische Eigenschaften wiederum in sehr niedrigen Konzentrationen in wässriger Lösung nachweisbar, bei ölgiger Lösung erst bei höheren Konzentrationen

3.6 Entwicklung einer Standard Arbeitsvorschrift (SOP)

Es wurde eine 21seitige Standard Arbeitsvorschrift (*Standard Operating Procedure* = SOP) entwickelt, die neben einer detaillierten Darstellung der Testprozedur inklusive der Kalibrierung des verwendeten Sonnensimulators auch sämtliche Kriterien festlegt, mit denen die Qualität jedes einzelnen Tests gesichert wird. Diese Kriterien umfassen eine Angabe der Mindestviitalität der unbehandelten EpiDermTM Gewebe (d.h. des mindestens zu erzielenden MTT Umsatzes), sowie einen

Akzeptanzbereich für die Positivkontrolle und schließlich als Ablehnungskriterium das Überschreiten von mehr als 30% Differenz zwischen den beiden unbehandelten Kontrollgeweben. Die SOP enthält weiterhin ein Dokumentationsblatt, auf dem alle experimentellen Rahmenbedingungen nach den Regeln der Guten Labor Praxis (GLP) festgehalten werden, sowie ein MS-EXCEL *Spreadsheet*, das nach Import der Daten aus dem Photometer alle Berechnungen ausführt und eine Graphik erstellt. Die SOP ist in englischer Sprache abgefaßt, da sie so einerseits direkt an die INVITTOX Datenbank (FRAME, UK) weitergegeben werden konnte, und andererseits international mit dieser SOP Partnerlaboratorien für die anstehende Prävalidierung gesucht wer-

den konnten. Derzeit ist bei FRAME nur das Protokoll des Skin² Phototoxizitätstests erhältlich (INVITTOX *Protocol no.* 83, 1994). Die EpiDermTM SOP und das erwähnte *Spreadsheet* können bei ZEBET (siehe Korrespondenzadresse) angefordert werden.

Das in der SOP enthaltene Prädiktionsmodell für die Vorhersage phototoxischer Eigenschaften klassifiziert die Gewebereaktion als Phototoxizität, wenn die bestrahlten Gewebe gegenüber den mit gleicher Konzentration eines Teststoffes behandelten unbestrahlten Gewebe eine um mindestens 30% reduzierte MTT-Umsetzung zeigen. Eine dosisabhängige Steigerung dieser Hemmung unterstützt die positive Klassifizierung. Das Prädiktionsmodell ist noch vorläufig, es muß in ei-

Teststoff	Vehikel	Teststoffkonzentration %	EpiDerm TM -UVA %	EpiDerm TM +UVA %
Chlorpromazin (1. Experiment)	H ₂ O	0,001	90	71
		0,002	89	58
		0,01	84	27
		0,02	83	16
		0,1	15	15
Chlorpromazin (Wiederholung)	H ₂ O	0,001	107	102
		0,002	116	76
		0,01	101	48
		0,02	91	13
		0,1	21	18
Chlorpromazin	H ₂ O/Öl	0,1	91	54
		0,2	87	30
		1	10	10
		2	11	9
		10	12	19
Chlorpromazin	Öl	0,01	98	91
		0,02	98	102
		0,1	91	95
		0,2	91	85
		1	91	24
Promethazin	H ₂ O	0,003	98	91
		0,01	98	58
		0,3	88	16
		0,1	9	7
		0,3	7	6
Promethazin	H ₂ O/Öl	0,1	118	96
		0,2	40	11
		1	57	20
		2	47	29
		10	16	16

Tabelle 1: Testung der *in vivo* phototoxischen Stoffe Chlorpromazin und Promethazin in verschiedenen Trägern.

= niedrigste Konzentration mit phototoxischer Wirkung auf EpiDermTM.

Eine Viabilitätshemmung der bestrahlten Gewebe von $\geq 30\%$ im Vergleich zu den unbestrahlten Geweben gleicher Konzentration führt zur Einstufung „phototoxisch“.

Tabelle 2: Testung von Lichtschutzfilterstoffen, die *in vivo* nicht phototoxisch sind, im EpiDerm™-Phototoxizitätstest.

Eine Viabilitätshemmung der bestrahlten Gewebe von $\geq 30\%$ im Vergleich zu den unbestrahlten Geweben gleicher Konzentration führt zu der Einstufung „phototoxisch“.

ner Prävalidierungsstudie bestätigt oder modifiziert werden.

3.7 Erarbeitung einer Datenbasis

3.7.1 *In vivo* nicht phototoxische Stoffe

Da im Skin² Phototoxizitätstest nicht phototoxische Stoffe immer richtig als solche erkannt wurden, wurden im EpiDerm™ Phototoxizitätstest nur vier nicht phototoxische Stoffe getestet. Ein von Skin² abweichendes Ergebnis hinsichtlich dieser Leistung konnte aufgrund des Test-Designs nicht erwartet werden. Bei den vier getesteten negativen Stoffen handelt es sich um UV-Lichtschutzfilter, also Stoffe, die aufgrund ihrer UV-Absorption das Potential für eine falsch positive Antwort bieten.

Tabelle 2 zeigt, daß die vier UV-Lichtschutzfilter para-Aminobenzoessäure (PABA), Benzophenone-3, Methoxy Cinnamate und Mexoryl SX mit dem EpiDerm™ Phototoxizitätstest alle richtig als nicht phototoxisch eingestuft wurden. Die einheitlich bei allen 4 Stoffen getestete Konzentrationsreihe von 0,1% -10% entspricht den Konzentrationen, mit denen die Stoffe im Tierversuch und am Menschen getestet wurden und in kosmetischen Zubereitungen zur Anwendung kommen. Interessant ist, daß der UV-Filter PABA in der höchsten Testkonzentration von 10% Zellschädigung auslöste (keine Phototoxizität, denn die Schäden wurden auch in den unbestrahlten Geweben festgestellt), während die übrigen drei UV-Filter, die sich heute in vielen Sonnencremes finden, auch bei 10% Konzentration keinerlei Schäden an den Keratinozyten des EpiDerm™ Modells auslösten.

3.7.2 *In vivo* phototoxische Stoffe

Von den acht *in vivo* phototoxischen Stoffen wurden vier ausgewählt, die starke phototoxische Eigenschaften zeigen (5-MOP, 8-MOP, CPZ und PMZ), und vier

Teststoff	Vehikel	Teststoffkonzentration %	EpiDerm™ -UVA %	EpiDerm™ +UVA %	Δ Viabilität $\pm$ UVA %
para-Aminobenzoessäure (1. Experiment)	Öl	0,1	103	94	< 30
		0,2	84	96	
		1	92	89	
		2	85	65	
		10	24	22	
para-Aminobenzoessäure (Wiederholung)	Öl	0,1	104	118	< 30
		0,2	89	103	
		1	95	105	
		2	70	74	
		10	41	12	
Benzophenon-3	Öl	0,1	103	111	< 30
		0,3	100	117	
		1	96	114	
		3	109	119	
		10	117	124	
Methoxy-cinnamat S28	Öl	0,1	100	100	< 30
		0,3	101	105	
		1	100	105	
		3	102	104	
		10	96	98	
Mexoryl SX S71	Öl	0,1	101	91	< 30
		0,3	99	58	
		1	96	16	
		3	95	7	
		10	81	6	

Stoffe, die im Skin² Phototoxizitätstest entweder falsch negative oder schwache Ergebnisse gezeigt haben (6-MC, Anthracen und die Parfümöle Musk Ambrette und Bergamot Öl).

3.7.2.1 5-Methoxypsoralen (5-MOP) und 8-Methoxypsoralen (8-MOP)

In vivo sind beide Psoralene phototoxisch, jedoch löst 8-MOP im Tierversuch phototoxische Reaktionen schon bei 10-100fach niedrigeren Konzentrationen aus. Von den 7 Experimenten (vier mit 5-MOP und drei mit 8-MOP) sind in Tabelle 3 nur die 5 Experimente dargestellt, in denen mit einer Lichtdosis von 6 J/cm² gearbeitet wurde.

5-MOP zeigt in den Experimenten eine phototoxische Wirkung ab 0,1-0,2% und zeigt im dritten Experiment bei noch niedrigeren Testkonzentrationen (0,00001-0,001%) keine Wirkung. 8-MOP zeigt in beiden Experimenten bis zur niedrigsten Testkonzentration von 0,000001% (!) eine konstante phototoxische Wirkung. Unsere Ergebnisse bestätigen, daß der EpiDerm™ Phototoxizitätstest beim Vergleich der phototoxischen Eigenschaften von 5-MOP und 8-MOP dasselbe Ergeb-

nis erbringt wie die Testung *in vivo*, nämlich daß 8-MOP die erheblich stärker phototoxische Substanz ist.

3.7.2.2 Chlorpromazin (CPZ)

Chlorpromazin (CPZ) wird bei Phototoxizitätsstudien als positive Referenzsubstanz eingesetzt. Die mit CPZ erhaltenen Ergebnisse sind bereits in Kapitel 3.5 detailliert beschrieben. Danach wurde CPZ in jedem Fall richtig als phototoxisch erkannt; die phototoxischen Grenzkonzentrationen waren jedoch abhängig vom Vehikel. Dieses Ergebnis zeigt deutlich den Gewinn an zusätzlicher Information gegenüber einem einfachen Test mit kultivierten Zellen: Der gleiche Stoff weist in unterschiedlichen Zubereitungen auf der Haut unterschiedlich starke phototoxische Eigenschaften auf. Dabei ist das Konzentrations-Zeitverhalten der Aufnahme jeder Zubereitung in die Haut für die Stärke der Reaktion verantwortlich. In einem Zellkulturtest muß CPZ in Lösung getestet werden; damit sind keine Rückschlüsse über den Einfluß der Präparation auf die phototoxischen Eigenschaften möglich.

Teststoff	Vehikel	Teststoff-konzentration %	EpiDerm™ -UVA %	EpiDerm™ +UVA %
5-MOP	Öl	0,01	91	33
		0,02	84	35
		0,1	86	37
		0,2	90	34
		1	95	43
5-MOP	Öl	0,001	97	103
		0,002	100	83
		0,01	99	100
		0,02	94	59
		0,1	91	38
5-MOP	Öl	0,00001	121	134
		0,00002	114	114
		0,0001	106	105
		0,0002	106	130
		0,001	99	106
8-MOP	Öl	0,00001	91	33
		0,000002	84	35
		0,0001	86	37
		0,0002	90	34
		0,001	95	43
8-MOP	Öl	0,000001	104	47
		0,000002	106	39
		0,00001	103	41
		0,00002	99	42
		0,0001	102	46

3.7.2.3 Promethazin (PMZ)

Promethazin ist ein wasserlöslicher, phototoxischer Stoff. Er zeigte nach den in Tabelle 1 dargestellten Daten im EpiDerm™ Phototoxizitätstest in Wasser bereits in einer Konzentration von 0,01% phototoxische Eigenschaften. Bei Applikation in einer Wasser/Öl Suspension waren erst 100fach höhere Konzentrationen, nämlich die 1%ige Lösung phototoxisch wirksam. Bei 10% Konzentration von PMZ waren bestrahlte und unbestrahlte Gewebe gleichermaßen geschädigt.

3.7.2.4 Anthracen

Anthracen verhielt sich im EpiDerm™ Phototoxizitätstest wie erwartet problematisch. Es wurde zwischen 0,1% und maximal 10% in Öl getestet. In zwei Experimenten zeigte sich eine positive Reaktion ab 2 bzw. ab 3%iger Stoffkonzentration, in den beiden anderen Experimenten war Anthracen bis hin zur höchsten Konzentration von 10% negativ.

Anthracen wurde zusätzlich mit 3stündiger und mit 6stündiger Applikation vor der Bestrahlung, wie bereits in Abbildung 3 dargestellt, getestet. Die kürzere Ein-

wirkungszeit sollte ausschließen, daß Anthracen im Verlauf der 21stündigen Applikation vor der Bestrahlung bereits durch das EpiDerm™ Gewebe in das darunter befindliche Medium gewandert sein könnte und dies die Reaktion geschwächt haben könnte. Bei beiden Applikationszeiten war Anthracen je einmal positiv ab 3,16% Stoffkonzentration und je einmal negativ. Die Ergebnisse der insgesamt 10 Experimente legen den Schluß nahe, daß die *in vivo* Datenbasis für diesen Stoff noch einmal gründlich recherchiert werden muß.

3.7.2.5 Bergamot Öl

Bergamot Öl wurde in vier Experimenten je einmal mit Einwirkungszeiten von 3 Std. und 6 Std. getestet und zweimal mit der in der SOP angegebenen Standard Applikationszeit von 21 Std.. Wie Abbildung 3 zeigt, deckten die Testkonzentrationen in allen Experimenten den Bereich von 0,1% bis 10% ab. Bergamot Öl wurde in allen Experimenten richtig als phototoxisch erkannt. Die jeweils niedrigsten Konzentrationen von Bergamot Öl, in denen phototoxische Reaktionen auftraten,

Tabelle 3: Vergleich der relativen phototoxischen Potenz der beiden *in vivo* phototoxischen Psoralene 5-Methoxypsoralen und 8-Methoxypsoralen.

= niedrigste Konzentration mit phototoxischer Wirkung auf EpiDerm™. Eine Viabilitätshemmung der bestrahlten Gewebe von $\geq 30\%$ im Vergleich zu den unbestrahlten Geweben gleicher Konzentration führt zu der Einstufung „phototoxisch“.

waren 1% bzw. 3,16% bei 21 Std. Applikation sowie 3,16% bei 6 Std. Applikation und 10% bei 3 Std. Applikationszeit. Neben der Tatsache, daß bereits eine Einwirkungszeit von 3 Std. vor der Bestrahlung bei Präparation in Öl für die Penetration durch das *stratum corneum* ausreicht, bestätigen die Ergebnisse, daß das EpiDerm™ Modell bei der in der SOP vorgegebenen 21stündigen Einwirkungszeit am empfindlichsten reagiert.

3.7.2.6 Musk Ambrette

Musk Ambrette wurde in vier Experimenten je einmal mit 3 Std. bzw. 6 Std. Applikation getestet und zweimal mit der in der SOP angegebenen Standard Applikationszeit von 21 Std.. Die Testkonzentrationsreihen lagen einheitlich zwischen 0,1% und 10%. In allen vier Experimenten wurde Musk Ambrette klar als nicht phototoxisch eingestuft. In Tabelle 4 wird beispielhaft eines dieser Experimente vorgestellt. Das Ergebnis deckt sich mit den Erfahrungen bei Skin², läßt sich aber dennoch derzeit nicht hinreichend erklären. Eine Erklärung könnte sein, daß Musk Ambrette sich in den bisher vorliegenden Daten vom Menschen und aus Tierversuchen als ein Photoallergen mit nur sehr geringen akut phototoxischen Eigenschaften gezeigt hat. Im *in vitro* 3T3 NRU PI Test zeigt Musk Ambrette ein eindeutig positives phototoxisches Potential (Spielmann et al., 1994b, c; 1997).

3.7.2.7 6-Methylcoumarin (6-MC)

Tabelle 4 gibt die drei Experimente wieder, die mit 6-MC durchgeführt wurden. Im ersten Experiment zeigte 6-MC bei keiner Testkonzentration zwischen 0,1% und 10% in Öl eine positive Reaktion. Die höchste Testkonzentration von 10% wirkte mit und ohne UVA-Bestrahlung gleichermaßen zytotoxisch, d.h. der Stoff

wurde ausreichend von den Zellen des EpiDerm™ Modells aufgenommen. Da 6-MC im Skin² Phototoxizitätstest bei topischer Applikation keine positive Reaktion zeigte, wohl aber in einem einmaligen Experiment bei quasi „systemischer“ Applikation (in DMSO gelöst über das unter den Geweben befindliche Medium), wurde auch im EpiDerm™ Modell diese Applikationsart getestet. Die zwei in Tabelle 4 aufgeführten Experimente mit „systemischer Applikation“ zeigen, daß 6-MC in beiden Experimenten keine phototoxischen Eigenschaften zeigte.

6-MC ist ein Parfümstoff, der *in vivo* starke photoallergene und schwache phototoxische Eigenschaften besitzt. Das Absorptionsmaximum von 6-MC liegt im UVB Bereich, und es ist in der Literatur (Gerberick and Ryan, 1990) beschrieben, daß UVB zur Auslösung positiver Photoreaktionen essentiell ist. Da der UVB Anteil des im EpiDerm™ Phototoxizitätstest verwendeten Sonnensimulators zu 100% ausgefiltert war, bietet dies eine Erklärung für die negativen Ergebnisse. Es wird derzeit bei ZEBET getestet, wie EpiDerm™ sich verhält, wenn aus dem Sonnenspektrum nicht alle UVB Anteile ausgefiltert werden.

4 Schlußfolgerungen

Im vorliegenden Forschungsprojekt wurde ein neuer Test für die Vorhersage phototoxischer Eigenschaften bei topischer Applikation auf der Haut mit dem menschlichen Epidermis-Modell EpiDerm™ EPI-200 entwickelt. Mit Ausnahme der Substanz Anthracen erwies sich der EpiDerm™ Phototoxizitätstest im ZEBET Labor als gut reproduzierbar. Vier eindeutig am Menschen nicht phototoxische Stoffe wurden richtig als solche erkannt, ebenso vier eindeutig phototoxische Stoffe. Der Test erlaubt außerdem bei phototoxischen Stoffen direkte Schlüsse über wirksame und unwirksame Konzentrationen, wie am Beispiel der vergleichenden Prüfung von 8-MOP und 5-MOP gezeigt werden konnte. Weiterhin wurden 4 Stoffe geprüft, die im Skin² Phototoxizitätstest negative Ergebnisse lieferten, obwohl am Menschen über phototoxische Eigenschaften berichtet wird. Drei dieser Stoffe (Anthracen, 6-MC und Musk Ambrette) zeigten auch im EpiDerm™ Phototoxizitätstest „borderline“ oder negative Ergebnisse, ein Stoff (Bergamot Öl) wurde unter allen Testbedingungen als phototoxisch erkannt. Für 6-MC und

Musk Ambrette gibt es Erklärungsmöglichkeiten für das negative Testergebnis, nicht aber für Anthracen.

Der neue EpiDerm™ Phototoxizitätstest ist einfach durchzuführen und liefert schon bei Anwendung von Standard-Testkonzentrationen bei vielen Stoffen innerhalb einer Woche ein brauchbares Ergebnis. Da mit diesem kommerziell vertriebenen menschlichen Hautmodell auch fertige Zubereitungen getestet werden können und die bei den Testsubstanzen ermittelten wirksamen Konzentrationen die *in vivo* Verhältnisse der topischen Applikation gut widerspiegeln, ist der Test sehr wichtig neben dem hochprädictiven 3T3 NRU PI Zellkulturtest. In diesem können nämlich die Wirkkonzentrationen für die Testung am Menschen nicht ermittelt werden, sondern nur das „phototoxische Potential“ der Prüfsubstanzen. Durch die vorliegenden Daten und die Erarbeitung einer Testvorschrift (SOP) konnten kürzlich zwei Laboratorien der internationalen Kosmetikindustrie (Procter & Gamble, Cincinnati) und Beiersdorf AG (Hamburg) dafür gewonnen werden, sich kurzfristig an einer Prävalidierung des neuen Tests unter Anleitung von ZEBET und mit Förderung durch ECVAM zu beteiligen. Aufgrund der vertraglichen Rahmenbedingungen muß die Prävalidierung bis Ende 1997 abgeschlossen sein. Ohne das mit Hilfe zweier Schweizer Organisationen erarbeitete Standard Testprotokoll und die Datenbasis dazu hätte der Test in dem von ECVAM geförderten Prävalidierungsprogramm nicht mehr berücksichtigt werden können.

Danksagung

Wir möchten uns an dieser Stelle für die großzügige Unterstützung durch den schweizerischen Verband „Tierrechtssignet“ (Biel) bedanken, die durch Vermittlung des Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF, Zürich) zustande kam. Das „Tierrechtssignet“ hat die überwiegenden Kosten für die künstliche menschliche Haut der Firma MatTek und die Personalkosten für unsere Arbeit getragen. Unser Dank geht auch an Frau Schröteler, Frau Knietzsch und Frau Wilhelm (Senator Airfreight GmbH, Berlin), die seit 6 Jahren persönlich dafür sorgen, daß Hautmodelle aus den USA pünktlich das ZEBET Labor erreichen.

Teststoff	Vehikel	Teststoffkonzentration %	EpiDerm™ -UVA %	EpiDerm™ +UVA %	Δ Viabilität ±UVA %
6-Methylcoumarin	Öl	0,1	95	121	< 30
		0,2	98	109	
		1	85	111	
		2	80	61	
		10	7	10	
6-Methylcoumarin "systemisch" über das Medium	DMSO	0,0001	94	113	< 30
		0,0002	93	114	
		0,001	93	90	
		0,002	73	65	
		0,01	8		
6-Methylcoumarin "systemisch" über das Medium	DMSO	0,001	121	134	< 30
		0,002	114	114	
		0,01	106	105	
		0,02	106	130	
		0,1	99	106	
Musk Ambrette	Öl	0,1	109	112	< 30
		0,3	98	112	
		1	108	110	
		3	102	109	
		10	110	109	

Tabelle 4: Testung der Photoallergene 6-Methylcoumarin und Musk Ambrette.

Eine Viabilitätshemmung der bestrahlten Gewebe von ≥ 30 % im Vergleich zu den unbestrahlten Geweben gleicher Konzentration führt zu der Einstufung „phototoxisch“.

Was ist Leben?

50 Jahre nach
Erwin Schrödinger

Michael P. Murphy / Luke A. O'Neill (Hrsg.)

Was ist Leben?

Die Zukunft der Biologie

Eine alte Frage in neuem Licht –
50 Jahre nach Erwin Schrödinger

In der Nachfolge von Erwin Schrödingers einflußreichem Buch *Was ist Leben?* stellen sich in diesem Band – 50 Jahre Jahre später – führende Biologen und Physiker erneut jener Schlüsselfrage der Biologie. Ihre Antworten überspannen ein Themenspektrum von der chemischen Evolution bis zur Chaostheorie, von der Entwicklungsbiologie bis zur Physik des Bewußtseins. Sie gewähren nicht nur faszinierende Einblicke in das Denken bedeutender Wissenschaftler unserer Tage, sondern zeigen auch, wohin sich die Biologie in den nächsten 50 Jahren entwickeln könnte.

ca. 224 S., geb.

DM 48,-/öS 351,-/sFr 46,-

ISBN 3-8274-0120-8

Zu den **Autoren** zählen Nobelpreisträger wie Manfred Eigen und Christian de Duve, Biologen wie Stephen J. Gould, Jared Diamond und Lewis Wolpert und Physiker wie Roger Penrose und Hermann Haken.

Spektrum
AKADEMISCHER VERLAG

Vangerowstr. 20, D-69115 Heidelberg

Literatur

ECVAM (1997). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity). *ATLA* 25 (in press).

Edwards, S. M., Donnelly, T. A., Sayre, R. M., Rheins, L. A., Spielmann, H. und Liebsch, M. (1994). Quantitative in vitro assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin²™. *Photodermatol., Photoimmunol. Photomed.* 10, 111-117.

Gerberick, G. F. and Ryan, C. A. (1990). Use of UVB and UVA to induce and elicit contact photoallergy in the mouse. *Photodermatol., Photoimmunol. Photomed.* 7, 13-19.

Liebsch, M., Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Döring, B., Dupuis, J., Holzhütter, H. G., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W. J. W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., Willshaw, A. (1994): First results of the EC/COLIPA validation project „in vitro phototoxicity testing“. In A. Rougier, A. Goldberg and H. Maibach (eds.), *Alternative Methods in Toxicology, Vol. 10: In vitro Skin Toxicology - Irritation, Phototoxicity, Sensitization* (243-254). New York: Mary Ann Liebert Publications.

Liebsch, M., Döring, B., Donnelly, T. A., Logemann, P., Rheins, L. A. and Spielmann, H. (1995). Application of the human dermal model Skin² ZK 1350 to phototoxicity and skin corrosivity testing. *Toxic. in Vitro* 9, 557-562.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 65, 55-63.

Rouget, R., Cohen, C. and A. Rougier (1994): A reconstituted human Epidermis to assess cutaneous irritation, photoirritation and photoprotection in vitro. In A. Rougier, A. Goldberg and H. Maibach (eds.), *Alternative Methods in Toxicology, Vol. 10: In vitro Skin Toxicology - Irritation, Phototoxicity, Sensitization* (243-254). New York: Mary Ann Liebert Publications.

Spielmann, H., Lovell, W. W., Hoelzle, E., Johnson, B. E., Maurer, T., Miranda, M. A., Pape, W. J. W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994a). In vitro phototoxicity testing. The report and recommen-

dations of ECVAM workshop 2. *ATLA* 22, 314-348.

Spielmann, H., Liebsch, M., Döring, B. und Moldenhauer, F. (1994b). Erste Ergebnisse der Validierung von in vitro Phototoxizitätstests im Rahmen eines EG/COLIPA Projektes. *ALTEX* 11, 22-31.

Spielmann, H., Balls, M., Brand, 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. J. W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994c). EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol. in Vitro* 8, 793-796.

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. (1997). EU/COLIPA „In vitro phototoxicity“, validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in Vitro* (in press).

Korrespondenzadresse

Dr. Manfred Liebsch
ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz (BgVV)
Diedersdorfer Weg 1
D-12277 Berlin
Tel. +49-30-8412-2275;
Fax +49-30-8412-2958;
E-mail: zebet@bgvv.de