

Erste Ergebnisse der Validierung von *in vitro* Phototoxizitätstests im Rahmen eines EG/COLIPA Projektes

Horst Spielmann, Manfred Liebsch, Beate Döring, Ferdinand Moldenhauer

aus der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) im Robert von Ostertag Institut, Berlin

Zusammenfassung

Seit 1991 erarbeiten in einem Validierungsprojekt sechs Laboratorien der europäischen Kosmetikindustrie zusammen mit FRAME (England) und ZEBET (Deutschland) *in vitro* Methoden für eine internationale Richtlinie zur akuten Phototoxizitätsprüfung. In der 1993 abgeschlossenen ersten Phase des Validierungsprojektes wurde versucht, die besten bisher entwickelten *in vitro* Tests für die Validierung unter blinden Bedingungen herauszufinden. Dazu wurde die Leistungsfähigkeit der Tests an 20 Stoffen mit bekannten phototoxischen Eigenschaften geprüft (12 phototoxische (PT) Stoffe, vier UV absorbierende nicht-PT und vier nicht UV absorbierende nicht-PT Stoffe).

Diese Testchemikalien wurden von allen Laboratorien in einem einfachen, standardisierten Zytotoxizitätstest mit einer Mäusefibroblastenzelllinie (3T3-Zellen) unter identischen UV-Bestrahlungsbedingungen (Sonnensimulator, UVA 5 J/cm²) geprüft (Parameter: Neutralrot-Aufnahme, NRA). Außerdem wurden *in vitro* Phototoxizitätstests geprüft, die in Industrielabors etabliert sind, wie z. B. der Photohämolyse-Test, der Histidin-Oxidations-Test und der Hefe-Test, sowie zwei neue, kommerziell in den USA entwickelte und vertriebene Testsysteme (SOLATEX PITM und Skin²TM). Die Ergebnisse des einfachen 3T3 NRA-Phototoxizitätstests, des Photohämolyse-Tests mit Erythrozyten und des Skin²TM-Tests ergaben eine überraschend gute Übereinstimmung mit *in vivo* Daten vom Menschen oder aus Tierversuchen.

Diese Tests scheinen daher für die weitere Validierung unter blinden Bedingungen besonders geeignet zu sein. Bei den übrigen Tests sind dagegen noch Verbesserungen und eine Standardisierung der Methodik erforderlich.

Summary: First results of an EC/COLIPA validation project of in vitro phototoxicity testing methods

In a joint project six laboratories from the European cosmetics industry (COLIPA) as well as from FRAME (England) and ZEBET (Germany) are validating *in vitro* methods to be incorporated into new international guidelines for photoirritancy testing. During the first stage of the study it was attempted to select the most promising *in vitro* photoirritancy tests for further validation. Twenty chemicals with known photoirritation properties (12 phototoxins (PT), 4 non-PTs and 4 UV absorbing non-PTs) were tested under identical UV exposure conditions (5 J/cm², UV-A sun simulator) in a standardized cytotoxicity assay using 3T3 fibroblasts (endpoint: Neutral red uptake, NRU). The chemicals were also tested with *in vitro* phototoxicity assays established in industrial laboratories, e.g. the photohaemolysis (Pape et al., 1993), histidine oxidation, candida albicans (Johnson et al., 1986), and, furthermore two commercial tests (SOLATEX PITM and Skin²TM). Data from the 3T3 NRU photoirritancy test, the red blood cell photohaemolysis test and the Skin²TM assay showed a better overall correlation to human *in vivo* data than results from the other tests. These simple assays, therefore, seem very promising for further validation under blind conditions. The protocols of the other tests have to be improved and standardized to permit better interlaboratory comparison.

Diese Studie wurde finanziell von der DG XI der EG in Brüssel unterstützt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse mit dem 3T3-Zell-Test wurden in Kooperation mit folgenden Wissenschaftlern und Institutionen erarbeitet: M. Balls, FRAME, Nottingham (UK), J. Dupuis, COLIPA, Brüssel (B), G. Klecak, Hoffmann-La Roche, Basel (CH), W.W. Lovell, Unilever, Sharnbrook (UK), T. Maurer,

Ciba-Geigy, Basel (CH), W.J.W. Pape, Beiersdorf AG, Hamburg (D), O. De Silva, L'Oréal, Clichy Cedex (F), W. Steiling, Henkel KGaA, Düsseldorf (D).

Die mit dem 3T3-Zell-Test erzielten Ergebnisse werden in Kürze in der Zeitschrift *Toxicology In Vitro* publiziert.

Einleitung

Unter Phototoxizität versteht man das akute Auftreten toxischer Symptome an der lichtbestrahlten Haut nach Aufnahme bzw. Behandlung mit einem chemischen Stoff, wie z. B. nach der Einnahme von Medikamenten oder nach der Applikation einer Substanz auf die Haut. Diese Hautreaktion wird vorwiegend durch die nicht sichtbaren UV-Anteile des Lichtes ausgelöst, wobei dem langwelligeren UV-A-Anteil aufgrund der Eindringtiefe in die Haut die größte Bedeutung zukommt. Im Gegensatz dazu bezeichnet man allergische Hautreaktionen, die durch Fremdstoffe in Kombination mit Licht ausgelöst werden und die erst mit zeitlicher Verzögerung nach der Bestrahlung auftreten, als Photoallergie. Das vorliegende Projekt beschäftigt sich nur mit *in vitro* Methoden zur Identifizierung phototoxischer Stoffe.

Anerkannte Tests zur Erfassung „der akuten Phototoxizität an der Haut“ werden an verschiedenen toxiologischen Tiermodellen wie Meeresschweinchen, Kaninchen, Ratten oder Mäusen durchgeführt. Obwohl kürzlich von einer Arbeitsgruppe eine Standardmethode für die Prüfung chemischer Stoffe auf Phototoxizität im Tierversuch erarbeitet wurde (Nilsson et al., 1993), hat die OECD den Vorschlag nicht verabschiedet, da keine Einigung über die zu verwendenden Tierspezies erzielt werden konnte. Es erscheint daher erfolgversprechend, zunächst anhand von *in vitro* Phototoxizitäts-Tests die Notwendigkeit zur Durchführung weiterführender Tierversuche zu überprüfen. Deshalb haben sich 1991 die COLIPA (Europäischer Verband der Kosmetikerhersteller, Sitz: Brüssel) und die für toxikologische Prüfrichtlinien zuständige Generaldirektion XI (DG XI) der EG entschlossen, gemeinsam ein Projekt zur Entwicklung und Validierung von *in vitro* Phototoxizitätstests durchzuführen. In dem Projekt, das teilweise von der DG XI der EG finanziert und von ZEBET (BGA, Berlin) koordiniert wird, sollen für die Kosmetik-

produkte *in vitro* Methoden für die Phototoxizitätsprüfung standardisiert und validiert werden, um ihre rasche Akzeptanz durch die zuständigen Behörden zu erreichen. Die gängigsten *in vitro* Methoden zur Erfassung phototoxischer Eigenschaften und die wichtigsten bisher bekannt gewordenen Mechanismen (Bergner und Pryzibilla, 1993) sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

In der ersten Phase des Projektes wurden 1992 von COLIPA 20 Testchemikalien mit bekannten phototoxischen Eigenschaften ausgesucht (12 phototoxische (PT) Stoffe, vier nicht-PT und vier UV absorbierende nicht-PT Stoffe), um *in vitro* Phototoxizitätstests, die in der europäischen Kosmetikindustrie bereits etabliert waren, miteinander zu vergleichen (Tabelle 2). Wie diese Tabelle zeigt, wurden außerdem kommerziell entwickelte einfache Tests in die Studie einbezogen, die von Institutionen durchgeführt werden können,

auch wenn sie nicht über speziell ausgebildetes Personal verfügen. Besonderer Wert wurde dabei auf Testsysteme gelegt, die eine lokale Applikation von Feststoffen und schwer wasserlöslichen Prüfmaterialien erlauben, wie z. B. künstliche menschliche Haut (SKIN²™).

Zur Standardisierung wurde außerdem ein einfacher *in vitro* Phototoxizitätstest mit einer permanenten Säugetierzelllinie entwickelt und in allen Labors durchgeführt. Man einigte sich auf die Mäuse-Fibroblastenzelllinie Balb/c 3T3, da sie gut charakterisiert und einfach zu beschaffen und zu kultivieren ist. Für die Phototoxizitätsprüfung wurde aufgrund der Vorarbeiten von Dr. W. Pape (Beiersdorf AG, Hamburg) ein einfacher Zytotoxizitätstest (Spielmann et al., 1991) so modifiziert, daß während einer zusätzlichen UV-Bestrahlung als Kulturmedium EBSS (Earle's balanced salt solution) verwendet und vor der Bestrah-

Tabelle 1: *In vitro* Methoden zur Erfassung phototoxischer Eigenschaften und spezifischer phototoxischer Mechanismen

Unspezifische Erfassung phototoxischer Effekte

Bakterien und Einzeller:

Bakterien	<i>Bacillus subtilis</i>
Hefen	<i>Candida albicans</i>
Einzeller	<i>Paramecium aurelia</i>

Primärzellkulturen:

menschliche Keratinozyten
Lymphozyten und Mastzellen

permanente Zelllinien:

Keratinozytenlinie des Menschen, z. B. A 431
Fibroblasten der Maus, z. B. 3T3-Zellen

Haut-Organkultur:

künstliche menschliche Haut-Skin²™ und Testskin™

Identifizierung spezifischer phototoxischer Mechanismen

Wirkung am Zellkern:

Hefezellen – z. B. Candida albicans

Wirkung an Zellmembranen:

Erythrozyten-Photohämolyse
SOLATEX PI™

Energieübertragung auf andere Modelle:

Histidin-Oxidation
Hämoglobin-Oxidation

Bildung von Reaktionsprodukten mit Lipiden und Proteinen:

Histaminfreisetzung aus Mastzellen
Photo-Protein-Bindung

Tabelle 2 : EG-COLIPA Validierungsstudie von *in vitro* Phototoxizitätstests

Teilnehmende Laboratorien und Testverfahren

Laboratorien:

HOFFMANN LA ROCHE	CIBA GEIGY	UNILEVER	L'OREAL	BEIERSDORF AG	HENKEL KGaA	FRAME	ZEBET-BGA
Basel	Basel	Sharnbrook	Aulnay-Sous- Bois	Hamburg	Düsseldorf	Nottingham	Berlin
Schweiz	Schweiz	England	Frankreich	Deutschland	Deutschland	England	Deutschland

In vitro Tests:

- 1) in allen Laboratorien: 3T3-Neutralrot-Aufnahme
- 2) in den teilnehmenden Laboratorien etablierte Tests:
 - mechanische Tests: Zellkern: Candida albicans-Hefetest
Histidin Photo-Oxidation
Erythrozyten-Photohämolyse
Erythrozyten-Hämoglobinoxidation
Photo-Proteinbindung
 - Zellkultur-Tests: Human-Lymphozyten
Human-Keratinozyten
P 815 Maus Lymphom Zellen
- 3) neue kommerzielle Tests: SOLATEX PI™
Hautmodell: Skin²™
Hautmodell: Testskin™

lung ein zusätzlicher Inkubationsschritt mit der Testsubstanz eingeführt wurde. Das von der Lampe produzierte Sonnenlichtspektrum wurde durch Filterung auf den UV-A-Bereich und das sichtbare Licht begrenzt. Auf die sehr zytotoxische UV-B-Strahlung wurde bewußt verzichtet, um eine möglichst hohe Dosierung mit der für die Phototoxizität relevanteren UV-A-Strahlung zu erzielen. Zur Ausschaltung möglicher Unterschiede bei der UV-Bestrahlung arbeiteten alle Arbeitsgruppen mit einer identischen Lichtquelle und mit geeichten UV-Meßgeräten (UV-Meter) desselben Herstellers.

Es werden hier einerseits die Ergebnisse vorgestellt, die in allen acht Laboratorien mit dem 3T3 Zell Neutralrot-Test bei der *in vitro* Phototoxizitätsprüfung erzielt wurden. Andererseits wird über die bei ZEBET unter Verwendung derselben Testchemikalien durchgeführte Prüfung mit den beiden neuen kommerziellen Testsystemen Skin²™ und SOLATEX PI™ berichtet.

Material und Methoden

Auswahl und Verteilung der Testchemikalien

Bei Validierungsstudien kommt der Qualität der *in vivo* Daten eine besondere Bedeutung zu, d. h. die Stoffauswahl für die Prüfung hat auf den Ausgang der Validierung einen entscheidenden Einfluß (Balls et al., 1990). Auf dem Gebiet der Phototoxizität ist die Beurteilung der Qualität der *in vivo* Daten oft schwierig, da im Vergleich zu anderen Gebieten der Toxikologie die Empfindlichkeit des Menschen starken individuellen Abweichungen unterliegt. Die Ergebnisse aus Tierversuchen stimmen hier deutlich seltener als auf anderen Gebieten der Toxikologie mit den vom Menschen her bekannten Ergebnissen überein.

Vor diesem Hintergrund haben Mitgliedsfirmen der COLIPA aufgrund der vom Menschen und aus Tierversuchen bekannten Daten (Berger und Pryzibilla, 1993) 20 Testchemikalien für die Validierung der *in vitro* Phototoxizitätstests ausgewählt, die drei

Klassen zuzuordnen sind (Tabelle 3):

Klasse I – 12 phototoxische Stoffe (PT)

Klasse II – 4 Stoffe, die UV-Licht absorbieren, aber nicht PT sind, einige besitzen photoallergene Eigenschaften

Klasse III – 4 Stoffe, die weder UV absorbieren noch PT sind

Alle Testchemikalien wurden von ZEBET beschafft und vor Beginn der Validierung an alle teilnehmenden Arbeitsgruppen verschickt. Es wurden daher alle Tests mit identischen Stoffen geprüft, aber in dieser ersten Phase wurde das Testprogramm nicht unter blinden Bedingungen durchgeführt.

3T3 -Neutralrot-Aufnahmetest (3T3 NRA-Test)

UV-A-Lichtquelle, UV-A-Meßgerät
Da bei *in vitro* und *in vivo* Phototoxizitätstests häufig unterschiedliche UV-Bestrahlungsbedingungen verwendet werden und die Ergebnisse daher nicht vergleichbar sind (unter-

Tabelle 3: Phototoxizität von 20 Stoffen: Ergebnisse im Neutralrot-Aufnahmetest (NRA) an 3T3-Zellen

	<i>in vivo</i> Daten**			<i>in vitro</i> Daten im 3T3 NRA Phototoxizitätstest			n	Ergebnis	
	CAS Nr.	Mensch	Tier	Mittelwert IC50 -UV µg/ml	Mittelwert IC50 +UV µg/ml	Mittelwert des Faktors -UV/+UV			
Klasse I: UV absorbierende, phototoxische Stoffe									
1	Promethazin	58-33-3	+	+/-	45,9	0,8	78,5	13	+
2	Chlorpromazin	69-09-0	++	++	24,6	0,6	46,6	13	+
3	6-Methylkumarin	92-48-8	a	a	*	32,7		13	+
4	Tetrachlorsalizylanilid	1154-59-2	a	+	19,8	0,4	55,6	12	+
5	Doxocyclin	100 929-47-3	+	+	1182	6,4	255	4	+
6	8-Methoxyypsoralen	298-81-7	++	++	*	14,7		11	+
7	Tetracyclin	64-75-5	+	+	1916	16,8	374	9	+
8	Piroxicam §	36322-904	(+)	-	*	*		11	-
9	Amiodaron	1951-25-3	+	+	24,3	4,1	6	9	+
10	Bithionol	97-18-7	+	+	13,9	3,9	7	13	+
11	Neutralrot	553-24-2	+	+	*	0,01		14	+
12	Bengal Rosa	632-69-9	+/-	-	4,2	0,2	70,2	13	+
Klasse II: UV absorbierende, nicht phototoxische Stoffe									
13	Zimtaldehyd	104-55-2	a	a	32,8	10,6	3,6	8	-
14	Chlorhexidin	3697-42-5			61,5	74,4	1,5	11	-
15	Uvinul MS 40	4065-45-6	+/-		15958	11577	1,4	11	-
16	Paraaminobenzoesäure	150-13-0	a		10463	9780	1	7	-
Klasse III: Stoffe, die weder UV absorbieren noch phototoxisch sind									
17	Penicillin G	69-57-8			53914	49755	1,1	8	-
18	L-Histidin §	71-00-1			*	*		12	-
19	Thioharnstoff	62-56-6	a		17651	16944	1	13	-
20	Laurylsulfat	151-21-3			35,6	24,2	1,5	14	-

§ höchste Testkonzentration: 2,4 mg/ml; § höchste Testkonzentration: 46,4 mg/ml; ++,+ phototoxisch - nicht phototoxisch; +/- widersprüchliche Datenlage; a (photo)allergen; * es konnte keine Zytotoxizität (IC50) ermittelt werden; n: Zahl der Bestimmungen; Mittelwerte: arithmetische Mittel von n Bestimmungen (Standardabweichung nicht aufgeführt); ** *in vivo* Daten: Berger und Pryzibilla (1993)

schiedliche UV-Spektren und -Bestrahlungsintensität), benutzten alle Labors die gleiche Quecksilber-Metall-Halogenidlampe desselben Herstellers (SOL 500, Fa. Dr. Hönle, Martinsried, D). Diese Lampe ahmt die Spektralverteilung des natürlichen Sonnenlichtes nach. Die Ausschaltung von UV-B wurde durch einen Filter mit 50% Durchlässigkeit bei 325 nm Wellenlänge erreicht. Die Energie dieser Lichtquelle wurde in allen Labors mit dem gleichen einfachen UV-A-Meter (Typ Nr. 37, Dr. Hönle) ermittelt. Bei Bedarf wurde dessen Kalibrierung mit einem Referenz-UV-A-Meter desselben Typs kontrolliert, das nur bei diesen Kontrollmessungen benutzt werden durfte und sonst im Dunkeln aufbewahrt wurde.

Versuchsdurchführung

Der Neutralrot-Aufnahmetest (NRA-Test) zur Bestimmung der Zytotoxizität mit Balb/c 3T3 Fibroblasten der Maus (Borenfreund und Puerner, 1985) wurde für die Phototoxizitätsprüfung wie folgt abgeändert: BalBb/c 3T3 Zellen, Klon 31 (ICN-Flow Laboratories, London), wurden in „96-well“-Platten (NUNC, Dänemark) kultiviert, wie bereits früher beschrieben (Spielmann et al., 1991). Nach 24 Std. wurde das Kulturmedium DMEM entfernt, und nach zweimaligem Waschen mit EBSS wurden die darin gelösten Testchemikalien in jeweils acht Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Unlösliche bzw. schwerlösliche Testchemikalien wurden in DMSO gelöst und mit einer Endkonzentration von 1% DMSO in EBSS zu den Zellen gege-

ben. Im Anschluß an eine einstündige Vorinkubation mit den Testchemikalien wurden die 96-well-Platten mit UV-A (1,6 mW/cm²) 50 Minuten lang durch den Styroldeckel bestrahlt (= 5 J/cm²). Während der Exposition wurde ein zweiter Plattensatz mit denselben Stoffen und Testkonzentrationen im Dunkeln aufbewahrt. Nach der UV-A-Bestrahlung wurde EBSS wieder durch DMEM ersetzt (ohne die Testchemikalien) und die NRA 24 Std. später bestimmt, wie bereits früher beschrieben (Spielmann et al., 1991). Der Test wurde in insgesamt acht Labors durchgeführt.

Auswertung und statistische Analyse der *in vitro* Daten

Zur Analyse der Ergebnisse wurden die Konzentrationen für die Testchemikalien im NRA-Test bestimmt, bei

denen jeweils 50% der Zellen mit und ohne UV-A-Bestrahlung überleben (IC 50). Sofern in beiden Fällen eine IC 50 ermittelt werden konnte, wurde das Verhältnis der Zytotoxizitätswerte durch einen UV-Faktor ausgedrückt:

$$\text{UV-Faktor} = \frac{\text{IC 50 (-UV)}}{\text{IC 50 (+UV)}}$$

Der Grenzwert für diesen Faktor, der eine Unterscheidung zwischen PT-Stoffen und nicht-PT-Stoffen ermöglichen soll, wurde biometrisch mittels Diskriminanzanalyse bestimmt (Abbildung 2), und zwar unter Verwendung der in allen Labors mit allen Prüfsubstanzen bestimmten UV-Faktoren. Wegen der besseren Übersichtlichkeit sind im Ergebnisteil in Tabelle 3 nur die in Abbildung 2 aufgeführten Mittelwerte wiedergegeben.

SOLATEX-PI-Test

Prinzip des Tests:

Das Testsystem ist ein Zweikompartimentmodell für Hautreizungen, das unter dem Namen SKINTEX (In Vitro International, Irvine, U.S.A.) bekannt ist. In diesem physikochemischen Zweikompartiment-Modell werden hautirritierende Eigenschaften anhand von zwei Reaktionen gemessen. Als Reaktionsparameter werden dabei einerseits Schäden an einer Biomembran durch Freisetzung des in die Membran eingeschlossenen Farbstoffes Neutralrot erfaßt (Kompartiment 1), und andererseits wird die Reaktion mit Proteinen durch die Denaturierung einer geordneten, makromolekularen Matrix (Kompartiment 2) erfaßt. Beide Parameter (Freisetzung von Neutralrot und Trübung der Proteinmatrix) werden gemeinsam photometrisch bestimmt. Der SOLATEX-PI-Test ba-

siert auf einem Vergleich dieser Effekte mit und ohne zusätzliche UV Bestrahlung. Dabei darf die höchste getestete Stoffkonzentration im SOLATEX-PI System ohne Bestrahlung nur minimal irritierend wirken.

Versuchsdurchführung:

Die Prüfsubstanzen werden in Propylenglycol, Ethanol/Propylenglycol (1 + 1) oder in Wasser gelöst und zu je 100 µl in mehreren Konzentrationen von 0,01% bis maximal 10% auf die Membranen pipettiert. Die Membranen werden danach auf die mit aktiviertem Reagenz gefüllten Reaktionsgefäße aufgebracht und mit einer UV-durchlässigen, dünnen Folie verschlossen. Nach 30 Min. Vorinkubation ohne Bestrahlung wird während 23 Std. mit UV-A-Fluoreszenzröhren (General Electric, Typ F20T12/BL) bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ mit einer Energie von $800\text{--}950 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ($= 69\text{--}82 \text{ J}/\text{cm}^2$) bestrahlt und dann 30 Min. ohne Bestrahlung nachinkubiert. Parallel dazu werden unbestrahlte Kontrollen während 24 Std. im Dunkeln bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert. Die photometrische Messung erfolgt bei 400 nm gegen Lösungsmittel-Leerwerte.

Berechnung und Klassifizierung der Ergebnisse:

Die UV-A-induzierte prozentuale Extinktionszunahme im Vergleich zu der Dunkel-Kontrolle wird mit einer speziell für den Test entwickelten Software errechnet (DAQC. SL, In Vitro International, USA), die auch eine Qualitätskontrolle umfaßt. Ein *in vitro* Phototoxizitätstest wird nur dann als Meßwert akzeptiert, wenn die gleichzeitig mitgeprüften Negativkontrollen und Positivkontrollen sowie der Lösungsmittelleffekt innerhalb festgelegter Grenzwerte liegen.

Die Ergebnisse werden aufgrund folgender Grenzwerte klassifiziert:

OD-Steigerung durch UV-A-Exposition: -50% bis 20% = nicht photoirritierend

OD-Steigerung durch UV-A-Exposition: 21% bis 40% = Grenzbereich

UVA-Empfindlichkeit von 3T3-Fibroblasten in 7 Laboratorien

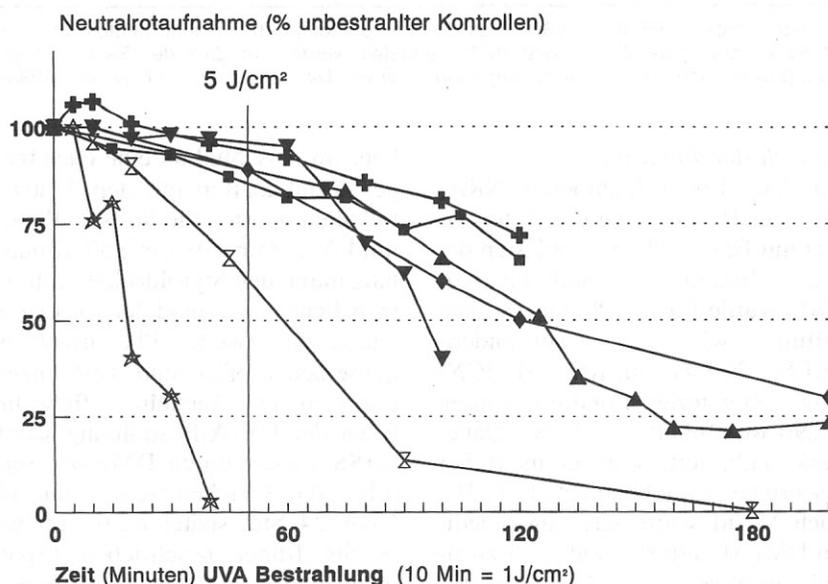


Abbildung 1: 3T3-Zellen wurden mit UVA (SOL 500: $1,6 \text{ mW}/\text{cm}^2$) in „96-well“ Mikrottestplatten bis zu 180 Minuten bestrahlt, um ihre UV-A-Empfindlichkeit zu bestimmen und die für den Phototoxizitätstest zu verwendende höchstmögliche UV-A-Dosis zu ermitteln. Diese Dosis ($5 \text{ J}/\text{cm}^2$, entsprechend einer Bestrahlungszeit von 50 Minuten) ist durch die vertikale Linie gekennzeichnet. Die sieben Einzelkurven wurden in sieben Laboratorien ermittelt. Die Kurven mit geschlossenen Symbolen wurden mit 3T3-Zellen von Flow-Deutschland, die beiden Kurven mit offenen Symbolen wurden mit 3T3-Zellen von Flow-Großbritannien erzielt.

OD-Steigerung durch UV-A-Exposition: 41% bis 99% = photoirritierend

Skin²™ ZK 1350 Phototoxizitätstest

Prinzip des Tests:

Das Modell Skin²™ ZK 1350 (Advanced Tissue Sciences, La Jolla, U.S.A.) ist ein für die pharmakologisch-toxikologische Prüfung künstlich hergestelltes, komplettes Modell der menschlichen Haut. Es besteht aus menschlichen, neonatalen, primären Fibroblasten, die auf einem Trägernetz aus Nylon wachsen und dann mit Keratinozyten besät werden, die eine mehrschichtige Epidermis und schließlich an der Grenzschicht zwischen Medium und Luft ein Stratum corneum aufbauen. In dieser Form wird das Modell mit Laser in Stücke von 9 × 9 mm geschnitten. Es wird auf Agaroseträgern steril verschweißt und per Luftfracht weltweit verschickt. Die Transportfähigkeit beträgt sechs Tage, an die sich eine Kultivierungsdauer von bis zu sechs Tagen anschließt. Nach Ankunft im Labor wird jedes der Gewebestücke in Gefäße mit halbdurchlässigem Boden überführt; darin erfolgt eine Versorgung mit Kulturmedium von der Unterseite (Dermis) her. Der Phototoxizitätstest basiert auf einem Vergleich der zytotoxischen Eigenschaften einer Prüfsubstanz mit oder ohne Exposition mit UV-A-Licht in der höchsten für das Modell ZK 1350 nicht toxischen UV-A-Dosis. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgt mit der MTT-Methode, dabei wird das gelbe Tetrazolium-Salz MTT durch die Stoffwechselaktivität mitochondrialer Dehydrogenasen in Gegenwart lebender Zellen in einen blauen Formazanfarbstoff überführt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird (Mosmann, 1983).

Versuchsdurchführung:

Am Tag vor dem Test werden die Gewebestücke in serumfreies Testmedium überführt, mit dem sie über die halbdurchlässige Membran von

3T3-Zytotoxizitätstest: UV - Faktoren für 15 Stoffe

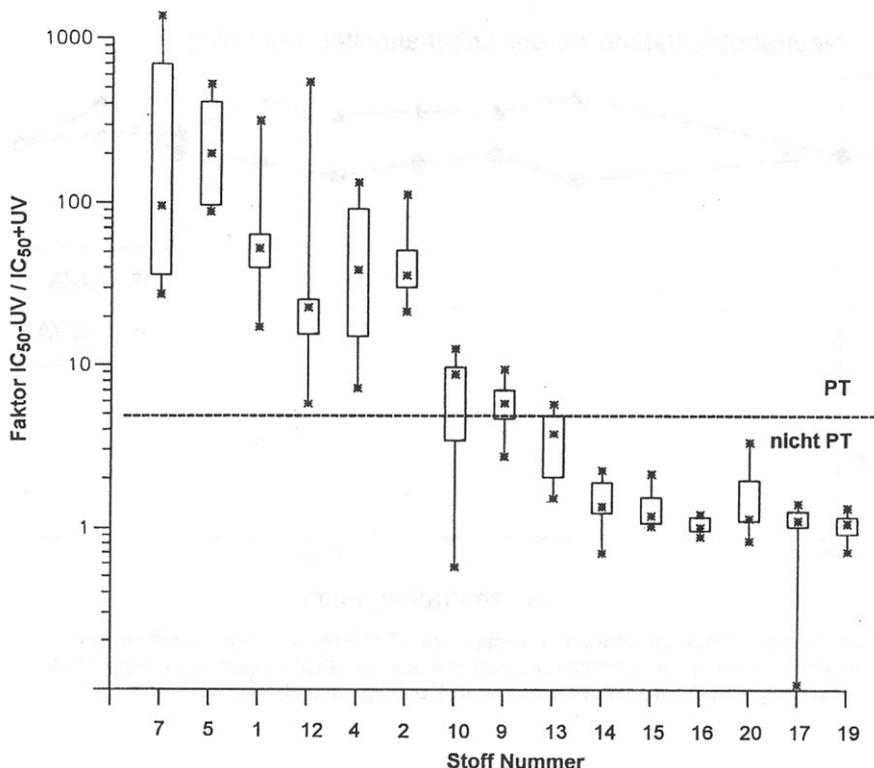


Abbildung 2: UV-Faktoren (IC₅₀ - UV/IC₅₀ + UV) für die 15 Stoffe, bei denen in Abwesenheit von UV-A-Bestrahlung die Zytotoxizität bestimmbar war. Die Stoffnummern entsprechen der Nummerierung in Tabelle 3. Zur Veranschaulichung wurden die Stoffe entsprechend der Größe ihrer UV-Faktoren geordnet. Die UV-Faktoren sind als Mittelwert mit 95% Vertrauensbereich (Boxplot) und Minimum- und Maximumwerten dargestellt. Die gestrichelte Linie gibt den per Diskriminanzanalyse ermittelten Grenzwert von 5,1 für eine Unterscheidung von phototoxischen und nicht-phototoxischen Stoffen wieder.

Millicell™-Platten (Millipore, U.S.A.) auf der Unterseite in Kontakt stehen. Diese Versorgung bleibt während des gesamten Tests erhalten. Die Testsubstanz wird in jeweils drei Konzentrationen auf je drei Gewebeproben pro Konzentration appliziert. Dazu wird die Prüfsubstanz entweder in Wasser gelöst oder als homogene Verreibung in Keimöl zu je 50 µl auf ein Filterpapier von 9 × 9 mm pipettiert und auf die Oberseite der Gewebe gelegt. Nach 24 Std. Inkubation bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank wird das Filterpapier entfernt. Die anschließende Bestrahlung erfolgt während 30 Minuten mit 1,6 mW/cm² UV-A (= 3 J/cm²) mit dem beim 3T3 NRA-Test beschriebenen Sonnensimulator SOL 500,

der mit denselben Filtern ausgestattet ist. Ein zweiter Satz Platten mit den gleichen Prüfkonzentrationen verbleibt während der Bestrahlung abgedunkelt. Nach Ablauf einer 30-minütigen Nachinkubation werden die Gewebe in PBS gewaschen, mit in Testmedium angesetzter MTT-Lösung versetzt und für zwei Std. bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird das gebildete Formazan mit 4 ml Isopropanol über eine Std. bei langsamer Bewegung extrahiert und bei 540 nm photometrisch bestimmt.

Berechnung und Klassifizierung der Ergebnisse:

Für jede Konzentration einer Testsubstanz wird die mitochondriale

Phototoxizität von L-Histidin im 3T3-Test

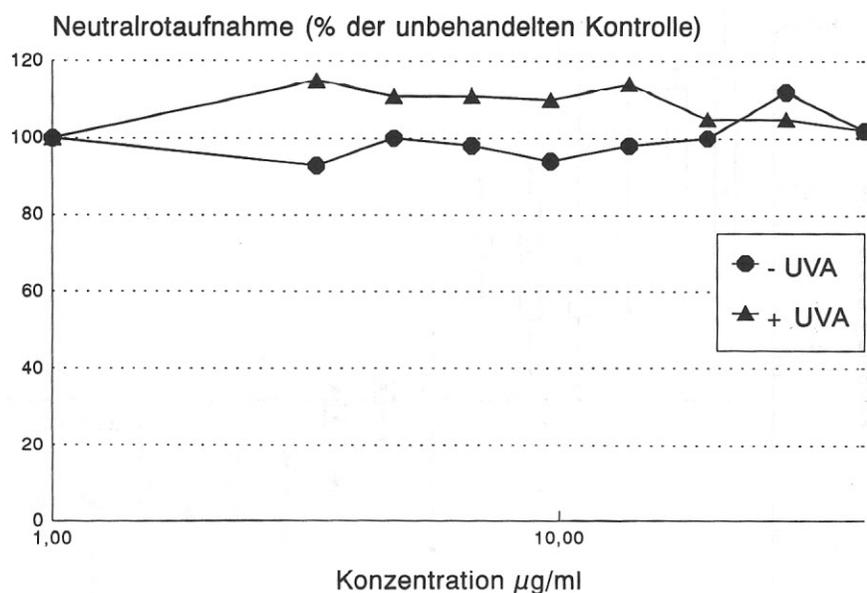


Abbildung 3: Phototoxizität von L-Histidin im 3T3-NRA-Test. Mit dem Stoff war in Konzentrationen bis zur Löslichkeitsgrenze weder in Abwesenheit, noch nach UVA-Bestrahlung eine Zytotoxizität bestimmbar. Der Stoff ist nicht phototoxisch.

Dehydrogenaseaktivität sowohl mit als auch ohne UV-A-Bestrahlung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (= 100%) errechnet. Eine Prüfsubstanz wird als phototoxisch klassifiziert, wenn nach UV-A-Bestrahlung die Dehydrogenaseaktivität im MTT-Test gegenüber den nur mit der Testsubstanz behandelten, unbestrahlten Hautstücken um mehr als 30% vermindert ist.

Ergebnisse

3T3-NRA-Zytotoxizitätstest

UV-A-Empfindlichkeit der 3T3-Zelllinie

Zu Beginn der Versuche wurde die Empfindlichkeit der Mäusefibroblastenzelllinie Balb/c 3T3 gegenüber UV-A-Bestrahlung mit der SOL 500 Lampe in sieben Laboratorien ohne die Einwirkung einer Testsubstanz im NRA-Zytotoxizitätstest geprüft. Es zeigte sich dabei, daß in fünf Laboratorien das Wachstum der 3T3 Zellen im Bereich von 0–5 J/cm² im

Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen nicht beeinträchtigt war (Abbildung 1). Da Unterschiede hinsichtlich der UV-A-Bestrahlung ausgeschlossen werden konnten, wurde die Qualität der in den einzelnen Labors verwendeten 3T3 Zellen überprüft. Es zeigte sich dabei, daß die beiden englischen Labors zwar 3T3 Zellen derselben Firma (Flow-England) eingesetzt hatten, daß sich diese Zellen aber bereits in der 130.-140. Passage befanden, während die übrigen Labors mit derselben Zelllinie in der 70.–80. Passage von Flow-Deutschland beliefert worden waren. Bekanntermaßen sind „ältere“ Zellen, die sich in einer höheren Passage befinden, wie die in den englischen Labors verwendeten, gegenüber UV-Bestrahlung empfindlicher als „jüngere“ Zellen aus niedrigen Passagen (Johnson et al., 1986), wie die 3T3 Zellen in den übrigen Labors. In der Validierungstudie wurden daher einheitlich „jüngere“, weniger UV-empfindliche 3T3 Zellen (Passage < 100) eingesetzt.

Abbildung 1 zeigt, daß bei den „jüngeren“ 3T3 Zellen als höchste

nicht-zytotoxische UV-A-Dosis 5 J/cm² (entsprechend 50 Minuten Bestrahlungszeit mit einer Intensität von 1,6 mW/cm²) ermittelt wurde. Daher wurde diese UV-A-Dosis für die *in vitro* Phototoxizitätstestung eingesetzt.

Phototoxizitätsprüfung im 3T3 NRA-Zytotoxizitätstest

Tabelle 3 zeigt, daß nur bei 15 der 20 Stoffe ein UV-Faktor ermittelt werden konnte. In Abbildung 2 sind die UV-Faktoren für diese 15 Stoffe graphisch wiedergegeben. Die biometrische Diskriminanzanalyse dieser in allen acht Labors ermittelten UV-Faktoren ergab einen Wert von 5,1 für die Unterscheidung von PT- und nicht PT-Stoffen. Abbildung 2 macht unter Berücksichtigung der logarithmischen Skala für den UV-Faktor deutlich, daß aufgrund der Streuung der Meßdaten im Bereich dieses Diskriminierungsfaktors die Zuordnung von drei der 15 Stoffe nur mit geringer Sicherheit (Stoffe 3, 10 und 13) möglich ist.

In der Gruppe dieser 15 Stoffe, bei denen der UV-Faktor ermittelt werden konnte, und unter Verwendung des Diskriminierungsfaktors von 5,1 wurden acht von acht *in vivo* phototoxischen UV absorbierenden Stoffe der Klasse I richtig als positiv erkannt, d.h. als phototoxisch. Die jeweils vier *in vivo* nicht phototoxischen Stoffe der Klasse II (UV absorbierend) und drei von drei Stoffen der Klasse III (nicht UV absorbierend) wurden richtig als negativ, d.h. als nicht phototoxisch erkannt.

Bei fünf Stoffen (Nr. 3, 6, 8, 11 und 18) konnte der Faktor nicht ermittelt werden, da sie auch in der höchsten testbaren Konzentration ohne Bestrahlung (–UV) nicht zytotoxisch für die 3T3 Zellen waren. Bei zwei dieser fünf Stoffe (Nr. 8, Piroxicam und Nr. 18, L-Histidin) waren selbst nach Bestrahlung (+UV) keine zytotoxischen Effekte zu messen. Piroxicam (Klasse I) wurde daher falsch als negativ klassifiziert, während L-Histidin (Klasse III) richtig als negativ klassifiziert

wurde. Abbildung 3 verdeutlicht graphisch das Ergebnis für L-Histidin.

Die verbleibenden drei *in vivo* phototoxischen Stoffe der Klasse I, bei denen wegen fehlender Zytotoxizität in Abwesenheit von UV-A-Bestrahlung kein UV-Faktor errechnet werden konnte (Nr. 3, 6 und 11) wurden dennoch richtig positiv erkannt, da sie bei UV-A-Bestrahlung eine ausgeprägte Zytotoxizität zeigten. Abbildung 4 verdeutlicht beispielhaft für diese Gruppe das Ergebnis für 8-Methoxypsoralen.

SOLATEX-PI-Test

Die Bestimmung der Phototoxizität mit diesem Test weist einige technische Schwierigkeiten auf, da im Rahmen der Qualitätskontrolle durch das Softwareprogramm sehr häufig die Ergebnisse als „nicht-qualifiziert“ abgelehnt werden. Vielfach war die Messung nur nach intensiven Konsultationen mit der Herstellerfirma möglich, denn der Test ist bisher für routinemäßige Prüfungen noch nicht hinreichend ausgereift.

Tabelle 4 zeigt die erzielten Meßergebnisse mit den entsprechend den im Methodenteil angegebenen Grenzen für die Klassifizierung phototoxischer Stoffe. Danach wurden in der *Klasse I* neun von 12 Stoffen richtig positiv klassifiziert. Ein Stoff (Bithionol) lag im Grenzbereich und zwei Stoffe (Piroxicam und 8-Methoxypsoralen) wurden nicht erkannt. In der *Klasse II* wurde einer der vier Stoffe (Uvinul MS 40) falsch positiv eingestuft und in der *Klasse III* war einer der vier Stoffe (Thioharnstoff) nicht testbar.

Skin² Z-K 1350 PT

Aus Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß neun von 12 Stoffen der *Klasse I* in diesem Test richtig positiv als phototoxisch erkannt wurden. Die in dieser Klasse falsch negativ eingestuftten Stoffe sind 6-Methylkumarin, sowie Piroxicam und Bithionol. Die jeweils vier Stoffe in den *Klassen II und III* wurden alle richtig negativ eingestuft, d.h. als nicht phototoxisch erkannt.

Tabelle 4: Kommerzielle Phototoxizitätstests im Vergleich mit dem 3T3-Test

	SOLATEX PI	skin-ZK 1350 PT	3T3-NRA Test
Klasse I: UV absorbierende, phototoxische Stoffe			
Promethazin	+	+	+
Chlorpromazin	+	+	+
6-Methylkumarin	+	-	+
Tetrachlorsalicylanilid	+	+	+
Doxycyclin	+	+	+
8-Methoxypsoralen	-	+	+
Tetracyclin	+	+	+
Piroxicam	-	-	-
Amiodaron	+	+	+
Bithionol	+/-	-	+
Neutral Rot	+	+	+
Bengal Rosa	+	+	+
Klasse II: UV absorbierende, nicht phototoxische Stoffe			
Zimtaldehyd	-	-	-
Chlorhexidin	-	-	-
Uvinul MS 40	+	-	-
Paraaminobenzoessäure	-	-	-
Klasse III: Stoffe, die weder UV absorbieren noch phototoxisch sind			
Penicillin G	-	-	-
L-Histidin	-	-	-
Thioharnstoff	n.t.	-	-
Laurylsulfat	-	-	-

+ phototoxisch; - nicht phototoxisch; +/- Grenzbereich; n.t. nicht testbar

Phototoxizität von 8-Methoxypsoralen im 3T3-Test

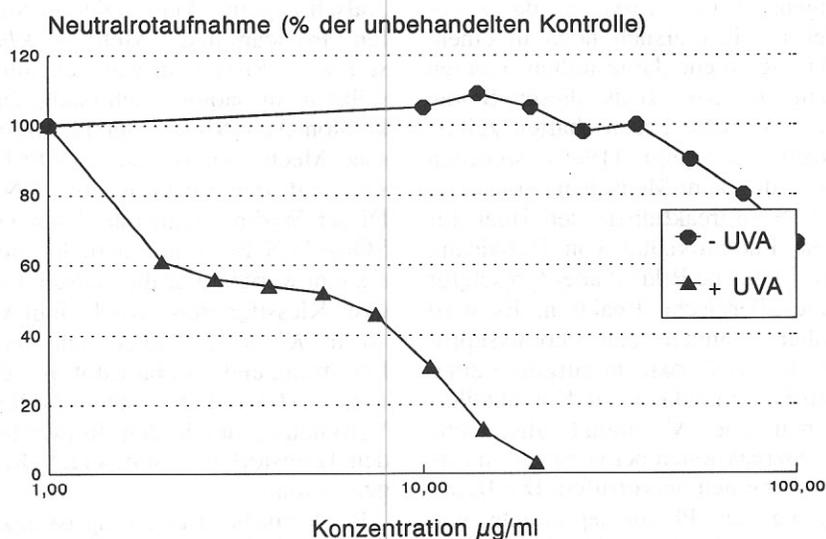


Abbildung 4: Phototoxizität von 8-Methoxypsoralen im 3T3 NRA-Test. Ohne UVA-Bestrahlung war bis zur Löslichkeitsgrenze keine Zytotoxizität (IC 50) bestimmbar. Nach UV-A-Bestrahlung ist eindeutig ein zytotoxischer Effekt zu sehen. Der Stoff wirkt auch *in vivo* phototoxisch.

Diskussion

In dieser Validierungsstudie von *in vitro* Methoden zur Phototoxizitätsprüfung ist bemerkenswert, daß von allen Teilnehmern identische UV-Bestrahlungsbedingungen gewählt wurden. Weiterhin war wichtig, daß vor der Validierung die Qualität, d.h. in diesem Fall die UV-Empfindlichkeit der 3T3 Zellen verglichen wurde, die alle Labors von derselben Firma bezogen hatten. Denn bei Prüfung der UV-Empfindlichkeit der 3T3 Zellen stellten sich Unterschiede heraus, die auf ein unterschiedliches Alter der Zellen zurückzuführen waren. Nur aufgrund der Standardisierung dieser wichtigen Faktoren konnten die in allen Labors überraschend gut übereinstimmenden Ergebnisse bei der Phototoxizitätsprüfung von 20 Testchemikalien im 3T3 NRA-Test erreicht werden.

Zur Auswahl der Prüfsubstanzen ist zu bemerken, daß die Beurteilung der Qualität der *in vivo* Daten der Prüfsubstanzen bei der Phototoxizität schwierig ist, da beim Menschen individuelle Faktoren zu sehr unterschiedlichen Empfindlichkeiten führen und Ergebnisse von Tierversuchen speziesabhängig stärker als auf anderen Gebieten der Toxikologie variieren. Schwierigkeiten bereitete eigentlich nur Piroxicam, da es weder im Tierversuch noch in einem der hier nicht dargestellten anderen acht *in vitro* Tests dieser Studie phototoxische Eigenschaften zeigte. Nach Ljunggren (1989) sprechen zwar die beim Menschen beobachteten Sofortreaktionen der Haut für eine Phototoxizität von Piroxicam, das klinische Bild ist aber typisch für eine allergische Reaktion. Es wird daher vermutet, daß Photolyseprodukte von Piroxicam aufgrund einer Strukturähnlichkeit zu Kontaktallergenen wie Merthiolat allergische Kreuzreaktionen bei vorsensibilisierten Personen hervorrufen. Die Beteiligung der Photolyseprodukte von Piroxicam ist inzwischen nachgewiesen (Serrano et al., 1992). Nach Hölzle et al. (1993) sind die am Menschen bei Piroxicam beobachte-

ten Reaktionen als falsch positiv phototoxisch zu werten. Aus diesem Grunde hätte Piroxicam nicht zum Vergleich der Übereinstimmung der *in vivo* mit den *in vitro* Daten herangezogen werden sollen.

3T3-Zell-NRA-Zytotoxizitätstest

Mit Ausnahme des als fraglich phototoxisch anzusehenden Stoffes Piroxicam wurden mit dem vorliegenden 3T3 Testprotokoll alle übrigen 19 getesteten Stoffe richtig eingestuft. Der Test zeigte damit eine besonders gute Voraussage sowohl im Rahmen der im gesamten Projektes geprüften *in vitro* Tests (Tabelle 2), als auch im Vergleich zu anderen *in vitro* Tests, die mit permanenten Zelllinien arbeiten (z.B. Duffy et al., 1987). Aufgrund dieses Ergebnisses und der im Rahmen dieser Studie erarbeiteten Standardisierung erscheint der *in vitro* Phototoxizitätstest auf der Grundlage des 3T3-NRA-Zytotoxizitätstests vielversprechend für die weitere Validierung unter „blinden“ Bedingungen.

SOLATEX-PI-Test

Von den beiden mit diesem Test „falsch negativ“ klassifizierten Stoffen Piroxicam und 8-MOP der Klasse I wirkt Piroxicam wahrscheinlich selbst nicht phototoxisch (siehe Diskussion 3T3 NRA). Der phototoxische Mechanismus von 8-MOP basiert auf der Reaktion mit DNA. Dieser Wirkmechanismus kann von SOLATEX-PI grundsätzlich nicht erkannt werden. Für die „falsch positive“ Klassifizierung von Uvinul MS 40 in Klasse II bietet sich keine Erklärung, und Thioharnstoff aus der Klasse III war nicht testbar, da diese Verbindung durch den freiwerdenden Harnstoff das SOLATEX Reagenz hemmt.

Bei kritischer Bewertung ist anzumerken, daß die in Tabelle 4 dargestellten, mit SOLATEX-PI erhaltenen Ergebnisse größtenteils erst nach mehreren Wiederholungsexperimen-

ten erzielt werden konnten, obwohl die Ergebnisse gemäß den Testkriterien der vom Hersteller entwickelten Software als „qualifiziert“ bewertet worden waren. Unter blinden Bedingungen wäre das Ergebnis deutlich schlechter ausgefallen. Derzeit arbeitet der Hersteller von SOLATEX-PI in Zusammenarbeit mit ZEBET an einer Verbesserung des Testprotokolls.

Skin²-ZK 1350 PT

Betrachtet man die „falsch negativ“ klassifizierten Stoffe der Klasse I, fällt wiederum auf, daß Piroxicam nicht als phototoxisch klassifiziert wurde. Der Stoff Bithionol (10) führte in allen drei Prüfkonzentrationen zu einer um 12% - 18% verminderter Stoffwechselaktivität im MTT-Test, die aber nicht zu einer Klassifizierung reichte. Im übrigen zeigte Bithionol in allen im EG/COLIPA-Projekt geprüften *in vitro* Tests nur eine schwach positive phototoxische Reaktion.

Für den dritten „falsch negativen“ Stoff, 6-Methylcoumarin (6-MC), gab es zunächst keine Erklärung des Ergebnisses. In einem zusätzlichen Experiment wurde daher dieser Stoff, in DMSO gelöst, nicht auf die Hautproben gegeben, sondern dem unter der „künstlichen Haut“ befindlichen Testmedium zugesetzt, um ihn auf diesem Weg direkt an die empfindlichen Fibroblasten der Dermis zu bringen. Auf diese Weise wird der systemische Applikationsweg nachgeahmt. 6-MC erwies sich dabei als phototoxisch. Aufgrund dieses Ergebnisses sollte diese Applikationsart bei Stoffen in die Prüfung einbezogen werden, die das Stratum Corneum der Haut nur schwer passieren können.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich das Skin²-Testsystem als gut reproduzierbar sowohl in den drei parallel getesteten Hautproben als auch in den parallel bei der Herstellerfirma ATS in den USA durchgeführten Prüfungen (Daten bisher nicht publiziert) erwiesen hat.

Ein Vorteil gegenüber allen anderen *in vitro* Testsystemen liegt in der Möglichkeit, mit Erfolg wasserunlösliche Stoffe als ölige Suspension in gleicher Weise wie an der Haut *in vivo* zu testen. Außerdem handelt es sich um ein kommerzielles Testsystem, das keine besonderen Anforderungen an Labor und Personal stellt. Als kritische Faktoren bei diesem Testsystem sind die bisher nur begrenzten Erfahrungen in einzelnen Arbeitsgruppen zu nennen, sowie das Transportproblem, die begrenzte Haltbarkeit und der hohe Preis.

Danksagung

Für die Gestaltung des Manuskriptes sind wir Frau S. Boy und Herrn D. Traue zu Dank verpflichtet.

Korrespondenzadresse

H. Spielmann, ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch)
 Robert von Ostertag Institut
 Postfach 480 44 ;
 Tel: +49-30-7076-2270
 D-12254 Berlin, Germany
 Fax: +49-30-7076-2958

Literatur

- Balls, M., Blaauboer, B., Brusick, D., Frazier, J., Lamp, D., Pemberton, M., Reinhardt, C., Roberfroid, M., Rosenkranz, H., Schmid, B., Spielmann, H., Stamatii, A.-L. und Walum, E. (1990). Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *Atla* 18, 313–337
- Berger, T. und Pryzibilla, B. (1993). Phototoxizität. In E. Macher, G. Kolde und E. B. Bröcker (Hrsg.), *Jahrbuch der Dermatologie: Licht und Haut* (101–133). Zülrich: Biermann Verlag.
- Borenfreund, E. und Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and Neutral Red absorption. *Toxicology Lett.* 24, 119–124
- Duffy, P. A., Bennet, A., Roberts, M. und Flint, O. P. (1987). Prediction of phototoxic potential using human A431 cells and mouse 3T3 cells. *Molecular Toxicology* 1, 579–587
- Hölzle, E., Neumann, N. und Goertz, G. (1993). Photoallergie – Mechanismus und Diagnostik. In E. Macher, G. Kolde und E. B. Bröcker (Hrsg.), *Jahrbuch der Dermatologie: Licht und Haut*. Zülrich: Biermann Verlag.
- Johnson, B. E., Walker, E. M. und Hetherington, A. M. (1986). *In vitro* models for cutaneous phototoxicity. In R. Maks and G. Plewing (eds.), *Skin models – models to study function and dysfunction of skin* (265–281). Berlin/Heidelberg/New York: Springer Verlag.
- Ljunggren, B. (1989). The piroxicam enigma. *Photodermatology* 6, 151–154
- Mosmann, T. (1993). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63
- Nilsson, R., Maurer, T. und Redmond, N. (1993). A standard protocol for phototoxicity testing. Results from an interlaboratory study. *Contact Dermatitis* 28, 285–290
- Pape, W. J. W., Band, M. und Pfannenbecker, U. (1994). Combined *in vitro* assay for photohaemolysis and haemoglobin oxidation as part of a photoirritancy test system examined on different phototoxic substances. *Toxicol. In Vitro*, in press
- Serrano, G., Fortea, J. M., San Martin, O., Bonillo, J. und Miranda, M. A. (1992). Oxicam-induced photosensitivity. Patch and photopatch testing studies with tenoxicam and proxicam photoproducts in normal subjects and in piroxicam-droxicam photosensitive patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 26, 545–548
- Spielmann, H., Gerner, I., Kalweit, S., Moog, R., Wirnsberger, T., Krauser, K., Kreiling, R., Kreuzer, H., Lüpke, N.-P., Miltenburger, H. G., Müller, N., Mürmann, P., Pape, W., Siegemund, B., Spengler, J., Steiling, W. und Wiebel, F. J. (1991). Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany. *Toxicol. In Vitro* 5, 539–542



ALTERER FOTOTOXIZITÄTSTEST NACH PROF. BAEDERER