

RICHTLINIE 2000/33/EG DER KOMMISSION**vom 25. April 2000****zur siebenundzwanzigsten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt (*)****(Text von Bedeutung für den EWR)**

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 67/548/EWG des Rates vom 27. Juni 1967 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 1999/33/EG des Europäischen Parlaments und des Rates⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 28,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) In Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG sind die Methoden zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, Toxizität und Ökotoxizität von Stoffen und Zubereitungen festgelegt. Dieser Anhang bedarf einer Anpassung an den technischen Fortschritt.
- (2) Gemäß Artikel 7 Absatz 2 der Richtlinie 86/609/EWG des Rates⁽³⁾ zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere „darf ein Versuch nicht unternommen werden, wenn zur Erreichung des angestrebten Ergebnisses eine wissenschaftlich zufriedenstellende, vertretbare und praktikable Alternative zur Verfügung steht, bei der kein Tier verwendet werden muß“.
- (3) Die Kommission beabsichtigt, Alternativ-Prüfmethoden in Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG einzuführen, die keine Verwendung von Tieren erfordern; damit werden diese Methoden für die Prüfung chemischer Stoffe gemäß Artikel 3 Absatz 1 der Richtlinie 67/548/EWG verfügbar gemacht.
- (4) Die in dieser Richtlinie vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ausschusses zur Anpassung der Richtlinien zur Beseitigung der technischen Handelshemmnisse für gefährliche Stoffe und Zubereitungen an den technischen Fortschritt —

Artikel 1

Der Wortlaut in Anhang I und II dieser Richtlinie wird dem Teil B von Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG hinzugefügt.

Artikel 2

(1) Die Mitgliedstaaten erlassen spätestens bis 1. Oktober 2001 die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie nachzukommen. Sie setzen die Kommission unverzüglich davon in Kenntnis.

Wenn die Mitgliedstaaten die Vorschriften nach Absatz 1 erlassen, nehmen sie in diesen Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

(2) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission ihre Rechts- und Verwaltungsvorschriften zur Anwendung dieser Richtlinie mit und übermitteln ihr eine Tabelle, aus der die Übereinstimmung zwischen den Anforderungen dieser Richtlinie und den erlassenen einzelstaatlichen Bestimmungen hervorgeht.

Artikel 3

Diese Richtlinie tritt am dritten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

Artikel 4

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 25. April 2000

Für die Kommission
Margot WALLSTRÖM
Mitglied der Kommission

(*) Angenommen vor der 26. Anpassung.

⁽¹⁾ ABl. 196 vom 16.8.1967, S. 1.

⁽²⁾ ABl. L 199 vom 30.7.1999, S. 57.

⁽³⁾ ABl. L 358 vom 18.12.1986, S. 1.

ANHANG I

„B.40. PRÜFUNG AUF HAUTÄTZENDE WIRKUNGEN

1 **METHODE**1.1 **Einleitung**

Zwei *In-vitro*-Tests zur Prüfung auf hautätzende Wirkung — der TER-Test (TER = transcutaneous electrical resistance) an Rattenhaut und ein Test mit einem menschlichen Hautmodell — wurden vom Europäischen Zentrum zur Validierung von Alternativmethoden (ECVAM, Gemeinsame Forschungsstelle der Europäischen Kommission) (1) (2) (3) als wissenschaftlich validierte Tests anerkannt. Die Validierungsstudie des ECVAM hat gezeigt, daß beide Tests in der Lage sind, zuverlässig zwischen hautätzenden Stoffen und solchen, die diese Eigenschaften nicht aufweisen, zu unterscheiden. Darüber hinaus ermöglichte der Test auf der Grundlage eines Modells der menschlichen Haut eine korrekte Klassifizierung unterschiedlicher ätzender Wirkungsstärken (bekannte Stoffe, die zu schweren Verätzungen führen, R35, und sonstige hautätzende Stoffe, R34) (2). Beide Testmethoden werden beschrieben; die Wahl des geeigneten Test hängt von den spezifischen Anforderungen und Präferenzen der Anwender ab.

Siehe auch ‚Allgemeine Einleitung‘ Teil B.

1.2 **Begriffsbestimmung**

Hautätzende Wirkung: irreversible Schädigung des Hautgewebes nach Anwendung eines Testmaterials.

1.3 **Referenzstoffe**

Nicht spezifiziert, siehe jedoch Ziffern 1.5.3.4 und 1.7.2.3.

1.4 **Prinzip der Testmethode — TER-Test an Rattenhaut**

Die Testsubstanz wird bis zu 24 Stunden topisch auf die Epidermis von Hautstücken aus dem Fell von Jung- ratten appliziert, die vorher tierschutzgerecht getötet wurden. Hautätzende Stoffe werden dabei durch ihre Fähigkeit, die Unversehrtheit der Hornhaut und ihrer Schutzfunktion zu zerstören, identifiziert, und zwar, indem die Verringerung des inhärenten transkutanen Hautwiderstands (TER) unter einen Schwellenwert (5 k Ω) gemessen wird (4) (5). Reizende und nicht-reizende Stoffe bewirken keinen Rückgang des TER unter den Schwellenwert. Bei Testung von oberflächenaktiven Stoffen und neutralen organischen Stoffen (Begriffsbestimmung s. (6)) kann das Testverfahren durch einen Farbbindungsschritt ergänzt werden, um die Anzahl der speziell mit diesen Chemikaliertypen erzielten falsch positiven Ergebnisse zu reduzieren (2) (7).

1.5 **Beschreibung der Testmethode — TER-Test an Rattenhaut**1.5.1 *Versuchstiere*

Für die Herstellung der Hautstücke sind Jungratten im Alter von 20-23 Tagen (Wistar oder vergleichbarer Stamm) erforderlich. Das Fell am Rücken und an den Flanken wird mit einem für Kleintiere geeigneten Instrument sorgfältig geschoren. Die Tiere werden dann mit vorsichtigen Wischbewegungen gewaschen, wobei diese Fläche in eine Antibiotikallösung getaucht werden (die Lösung enthält z. B. Streptomycin, Penicillin, Chloramphenicol und Amphotericin in Konzentrationen, die ein bakterielles Wachstum verhindern). Die Tiere werden dann am dritten oder vierten Tag nach dem ersten Waschvorgang erneut mit der Antibiotikallösung gewaschen und innerhalb von drei Tagen verwendet (die Tiere dürfen für die Hauptpräparationen nicht älter als 31 Tage sein).

1.5.2 *Herstellung der Hautstücke*

Die Versuchstiere werden tierschutzgerecht getötet. Sodann wird die Rückenhaut jedes Tieres entfernt, und von übermäßigem Fett befreit, das von der Haut sorgfältig abgeschält wird. Die Haut wird so über das Ende eines PTFE (Polytetrafluorethylen)-Rohres gelegt, daß die Epidermisoberfläche auf dem Ende des Rohres aufliegt. Zur Fixierung des Hautstücks wird ein ‚O‘-Ring aus Gummi straff über das Rohrende gezogen, und überflüssiges Hautgewebe wird abgeschnitten. Die Abmessungen des Rohrs und des ‚O‘-Rings sind in Abbildung 1 angegeben. Der ‚O‘-Ring wird sodann mit gereinigter Naturvaseline zum Ende des PTFE-Rohrs hin gründlich abgedichtet. Das Rohr wird durch eine Federklemme in einer Rezeptorkammer gehalten, die Magnesiumsulfatlösung (154 mM) enthält (Abbildung 2).

1.5.3 *Testverfahren*1.5.3.1 **Aufbringung der Testsubstanzen**

Flüssige Testsubstanzen (150 μ l) werden auf die Epidermisoberfläche innerhalb des Rohrs gebracht (Abbildung 2). Zur Testung von Feststoffen wird eine ausreichende Menge auf das Hautstück aufgebracht, wobei darauf zu achten ist, daß die gesamte Oberfläche der Epidermis bedeckt ist. Sodann wird entionisiertes Wasser (150 μ l) auf den Feststoff gebracht und das Rohr zur Verteilung des Feststoffes leicht bewegt. Die Testsubstanzen sollten mit der Haut optimal in Kontakt kommen. Bei einigen Feststoffen kann dies durch Erwärmung bis zu 30 °C zwecks Schmelzen oder durch Zermahlen zu einem Granulat oder Pulver erreicht werden.

Für jede Testsubstanz werden drei Hautstücke verwendet. Die Testsubstanz wird 24 Stunden lang aufgebracht (siehe auch 1.5.3.4), sodann durch Waschen unter fließendem Wasser bei maximal 30 °C abgewaschen und vollständig entfernt. Zur leichteren Entfernung von evt. im Rohr fest gewordenen Testsubstanzen kann ein Wasserstrahl von ca. 30 °C eingesetzt werden.

1.5.3.2 TER-Messungen

Der TER wird mit einer Wheastonschen-Wechselstrom-Meßbrücke mit niedriger Spannung gemessen (z. B. AIM 401 oder 6401 oder gleichwertige Meßbrücke). Vor der Messung des elektrischen Widerstands wird die Oberflächenspannung der Haut durch Auftrag von 70%igem Äthanol verringert, wobei die Menge ausreichen soll, um die gesamte Epidermis zu bedecken. Nach einigen Sekunden wird das Äthanol durch Kippen des Rohrs entfernt, und das Gewebe wird durch Hinzufügen von 3 ml Magnesiumsulfatlösung (154 mM) befeuchtet. Zur Messung des Widerstands in $k\Omega$ /Hautstück werden die Elektroden der Meßbrücke beidseitig des Hautstücks plaziert (Abbildung 2). Die Gesamtmessungen der Elektroden und die Länge der Elektroden unterhalb der Abgreifklemmen sind in Abbildung 1 angegeben. Die Abgreifklemme der inneren (dicken) Elektrode liegt während der Widerstandsmessung oben auf dem PTFE-Rohr auf, um sicherzustellen, daß stets eine gleichbleibende Elektrodenlänge in die Magnesiumsulfatlösung getaucht bleibt. Die äußere (dünne) Elektrode befindet sich innerhalb der Rezeptorkammer an deren Boden. Der Abstand zwischen dem unteren Ende der Federklemme und dem unteren Ende des PTFE-Rohrs konstant (Abbildung 1), da dieser Abstand den erzielten Widerstandswert beeinflusst.

Anmerkung: Wenn der gemessene Widerstandswert über 20 $k\Omega$ liegt, so kann dies an einem Rest der Testsubstanz liegen, der die Epidermisoberfläche des Hautstücks bedeckt. Zur Entfernung dieser Schicht kann versucht werden, das mit einem durch Gummihandschuh geschützten Daumen verschlossene PTFE-Rohr ca. 10 Sekunden zu schütteln. Die Magnesiumsulfatlösung wird dann verworfen, und die Widerstandsmessung wird mit frischem Magnesiumsulfat wiederholt.

Die TER-Ergebnisse (Mittelwerte) einer Testsubstanz werden nur angenommen, sofern die Ergebnisse der gleichzeitig getesteten Positivkontrollen und Negativkontrollen innerhalb definierter Akzeptanzgrenzen liegen. Für die beschriebene Methodik und Versuchsanordnung werden folgende Kontrollsubstanzen und dazugehörige TER-Akzeptanzbereiche vorgeschlagen:

Kontrolle	Substanz	Widerstandsbereich ($k\Omega$)
Positiv	10 M Salzsäure (36 %)	0,5-1,0
Negativ	Destilliertes Wasser	10-25

1.5.3.3 Testvariante für oberflächenaktive Stoffe und neutrale organische Stoffe

Wenn die TER-Werte bei oberflächenaktiven oder neutralen organischen Testsubstanzen 5 $k\Omega$ oder weniger betragen, kann eine Beurteilung der Penetration eines Farbstoffes an den Geweben durchgeführt werden. Dieses Verfahren zeigt an, ob die Ergebnisse falsch positiv sind (2).

1.5.3.3.1 Anwendung und Entfernung von Sulforhodamine B-Farbstoff

Nach der Applikation der Testsubstanz zur Bestimmung des TER werden 150 μ l Sulforhodamin B-Farbstoff in 10%iger (w/v) Verdünnung in destilliertem Wasser für zwei Stunden topisch auf jedes Hautstück aufgebracht. Die Hautstücke werden sodann unter fließendem Wasser von höchstens Raumtemperatur etwa 10 Sekunden lang mit einem Wasserstrahl gewaschen, um überschüssige/ungebundene Farbe zu entfernen. Jedes Hautstück wird sorgfältig vom PTFE-Rohr entfernt und in ein geeignetes verschließbares Gefäß (z. B. ein 20-ml-Scintillationsfläschchen) mit entionisiertem Wasser (8 ml) gebracht. Die Fläschchen werden 5 Minuten lang vorsichtig geschüttelt, um überschüssige/ungebundene Farbe zu entfernen. Nach Wiederholung des Spülvorgangs werden die Hautstücke in Fläschchen mit 5 ml 30%igem (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in destilliertem Wasser überführt und über Nacht bei 60 °C im Brutschrank aufbewahrt. Nach der Inkubation wird jedes Hautstück entfernt und verworfen, und die verbleibende Lösung wird 8 Minuten lang bei 21 °C zentrifugiert (relative Zentrifugalkraft \sim 175). Eine 1-ml-Probe des oberflächenaktiven Stoffs wird sodann 1:5 (v/v) [d. h. 1 ml + 4 ml] mit 30%iger (w/v) SDS-Lösung in destilliertem Wasser verdünnt. Die optische Dichte (OD) der Lösung wird bei ca. 565 nm gemessen.

1.5.3.3.2 Berechnung des Farbgehalts

Der Gehalt an Sulforhodamin B-Farbstoff je Hautstück wird mittels der OD-Werte berechnet (molarer Extinktionskoeffizient von Sulforhodamin B bei 565 nm = $8,7 \times 10^4$, Molekulargewicht = 580). Der Gehalt an Sulforhodamin B wird für jedes der drei Hautstücke bestimmt und dann der Mittelwert berechnet. Die erhaltenen Mittelwerte der Farbbindung einer Testsubstanz werden nur angenommen, sofern die Ergebnisse der gleichzeitig getesteten Kontrollen innerhalb definierter Akzeptanzgrenzen liegen. Für die beschriebene Methodik und Versuchsanordnung werden folgende Akzeptanzbereiche vorgeschlagen:

Kontrolle	Substanz	Farbgehaltsbereich (µg/Hautstück)
Positiv	10 M Salzsäure (36%)	40-100
Negativ	Destilliertes Wasser	15-35

1.5.3.4 Zusatzinformation

Testsubstanzen können auf die Hautstücke auch für kürzere Zeiträume (z. B. 2 Stunden) aufgebracht werden, um Materialien zu identifizieren, die hochgradig ätzend sind. In der Validierungsstudie zeigte sich jedoch, daß der TER-Test das ätzende Potential mehrerer Testchemikalien nach zweistündiger Einwirkung auf die Hautstücke (2) überbewertet, wenngleich er eine korrekte Identifizierung ätzender und nicht ätzender Stoffe nach 24stündiger Einwirkung gestattet.

Die Eigenschaften und Abmessungen der Versuchsanlage und die angewandte Testmethode können die TER-Werte beeinflussen. Der Schwellenwert von 5 kΩ zur Vorhersage hautätzender Eigenschaften eines Stoffes wurde aufgrund von Daten ermittelt, die mit den hier beschriebenen spezifischen Geräten und Verfahren erzielt wurden. Im Falle einer signifikanten Änderung der Testbedingungen können andere Schwellen- und Kontrollwerte gelten. In diesem Fall empfiehlt es sich, die Methodik und die Widerstandsschwellenwerte durch Austestung einer Reihe von Referenzstandards zu kalibrieren, die aus den in der Validierungsstudie (3) verwendeten Chemikalien auszuwählen sind.

1.6 Prinzip der Testmethode — Test mit menschlichem Hautmodell

Die Testsubstanz wird bis zu 4 Stunden topisch auf ein dreidimensionales Modell menschlicher Haut aufgebracht, das eine rekonstruierte Epidermis mit funktionaler Hornhaut besitzt. Ätzende Materialien werden aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert, eine Abnahme der Viabilität (Lebensfähigkeit) der Zellen (dies kann beispielsweise durch Anwendung des MTT-Reduktionstests festgestellt werden) unter festgelegte Schwellenwerte bei einer spezifischen Expositionsdauer zu bewirken. Dieses Testprinzip basiert auf der Hypothese, daß ätzende Chemikalien in der Lage sind, (durch Diffusion oder Erosion) die Hornhaut zu durchdringen und darüber hinaus ausreichend zytotoxisch sind, um in den darunterliegenden Zellschichten das Absterben von Zellen zu bewirken.

1.7 Beschreibung der Testmethode — Test mit menschlichem Hautmodell

1.7.1 Modelle menschlicher Haut

Modelle rekonstruierter menschlicher Haut können aus unterschiedlichen Quellen stammen, müssen jedoch bestimmten Kriterien genügen. Das Modell muß eine funktionale Hornhaut mit einer darunter liegenden Schicht lebender Zellen aufweisen. Die Barrierefunktion der Hornhaut muß angemessen sein. Dies kann durch Nachweis der Widerstandsfähigkeit des Modells gegenüber Substanzen aufgezeigt werden, von denen bekannt ist, daß sie Zellen gegenüber toxisch sind, jedoch normalerweise die Hornhaut nicht durchdringen. Bei Einhaltung definierter Versuchsbedingungen muß das Modell nachweislich reproduzierbare Ergebnisse erbringen.

Die Viabilität der vitalen Zellen des Hautmodells muß hinreichend groß sein, um gut zwischen Positivkontrollen und Negativkontrollen unterscheiden zu können. Die Viabilität der Zellen (z. B. bestimmt durch MTT-Reduktion und gemessen als OD-Wert) nach Exposition mit der Negativkontrolle muß innerhalb der für das jeweilige Modell definierten Akzeptanzgrenzen liegen. Ebenso müssen die Viabilitätswerte nach Exposition mit der Positivkontrolle (ausgedrückt in % der Viabilität der Negativkontrolle) innerhalb der definierten Akzeptanzgrenzen liegen. Es ist unbedingt erforderlich, daß das eingesetzte Modell zur Vorhersage hautätzender Eigenschaften (Prädiktionsmodell) internationalen Validierungsstandards entspricht (2).

1.7.2 Testverfahren

1.7.2.1 Anwendung der Testsubstanzen

Bei flüssigen Materialien muß genügend Testsubstanz appliziert werden, damit die Hautoberfläche ganz bedeckt ist (mindestens 25 µl/cm²). Bei der Prüfung von Feststoffen muß soviel Testsubstanz aufgebracht werden, daß die Haut ganz bedeckt ist. Diese sind dann anzufeuchten, damit ein guter Kontakt mit der Haut gewährleistet ist. Falls erforderlich sollten Feststoffe vor der Anwendung zu Pulver zermahlen werden. Die Methodik der Applikation muß nachweislich auf ein breites Spektrum unterschiedlicher Chemikaliertypen (2) anwendbar sein. Zum Ende der Expositionszeit muß das Testmaterial sorgfältig mit einer gepufferten isotonischen Salzlösung von der Hautoberfläche abgewaschen werden.

1.7.2.2 Messung der Zellviabilität

Jede validierte quantitative Methode kann zur Messung der Zellviabilität angewendet werden. Die am häufigsten angewandte Methode ist die MTT-Reduktion, die nachweislich in verschiedenen Laboratorien genaue und reproduzierbare Ergebnisse erbracht hat (2). Das Hautstück wird 3 Stunden lang in eine MTT-Lösung von 0,3 mg/ml bei 20-28°C gelegt. Der blaue Formazan-Niederschlag wird sodann extrahiert (Lösemittelextraktion), und die Formazankonzentration wird durch Bestimmung des OD-Werts bei einer Wellenlänge zwischen 545 und 595 nm gemessen.

1.7.2.3 Zusatzinformation

Das verwendete Hautmodell und das genaue Protokoll der Expositionszeit, der Waschverfahren usw. haben einen großen Einfluß auf die erzielten Ergebnisse der Zellviabilität. Es wird daher empfohlen, Methodik und Modell zur Vorhersage hautätzender Eigenschaften durch Austestung einer Reihe von Referenzstandards zu kalibrieren, die aus den in der ECVAM-Validierungsstudie (3) verwendeten Chemikalien auszuwählen sind. Es ist von entscheidender Bedeutung, daß sich die angewandte Methodik nachweislich reproduzierbar zeigt, d. h. für ein breites Spektrum von Chemikalien sowohl innerhalb eines Laboratoriums, als auch zwischen verschiedenen Laboratorien im Einklang mit internationalen Standards vergleichbare Ergebnisse liefert. Die Methode sollte mindestens den bereits publizierten Kriterien für die wissenschaftliche Validität (2) entsprechen, und die Ergebnisse einer solchen Validierungsstudie müssen in einer unabhängig referierten wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht werden.

2 DATEN

2.1 Darlegung der Ergebnisse

2.1.1 TER-Test an Rattenhaut

Die Widerstandswerte ($k\Omega$) für die Testsubstanz, Positivkontrolle, Negativkontrolle sowie alle Standard-Referenzchemikalien, einschließlich der Einzeldaten von Mehrfachbestimmungen und Wiederholungstests, der Mittelwerte und der davon abgeleiteten Klassifizierung, sollten in Tabellenform aufgeführt werden.

2.1.2 Test mit menschlichem Hautmodell

Die OD-Werte und die relativen Werte der Zellviabilität für die Testsubstanz, die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sowie für alle Standard-Referenzchemikalien, einschließlich der Einzeldaten von Mehrfachbestimmungen und Wiederholungstests, der Mittelwerte und der davon abgeleiteten Klassifizierung, sollten in Tabellenform aufgeführt werden.

2.2 Bewertung und Interpretation der Ergebnisse

2.2.1 TER-Test an Rattenhaut

Wenn der für die Testsubstanz erzielte mittlere TER-Wert über 5 $k\Omega$ liegt, ist die Substanz nicht ätzend. Beträgt der TER-Wert jedoch 5 $k\Omega$ oder weniger, und handelt es sich bei der Testsubstanz nicht um einen oberflächenaktiven oder einen neutralen organischen Stoff, so ist die Testsubstanz ätzend.

Bei oberflächenaktiven oder neutralen organischen Stoffen, die TER-Werte von über 5 $k\Omega$ oder weniger ergeben, kann ein Test auf Farbstoffpenetration durchgeführt werden. Ist der mittlere Farbgehalt des Hautstücks gleich groß oder größer als der gleichzeitig bestimmte mittlere Farbgehalt des Hautstücks der 36%igen HCl-Positiv-Kontrolle, so ist die Testsubstanz falsch positiv und daher nicht ätzend.

2.2.2 Test mit menschlichem Hautmodell

Der gemessene OD-Wert der Negativkontrolle wird mit einer 100%igen Zellviabilität gleichgesetzt. Folglich können die für jede Testprobe erzielten OD-Werte zur Berechnung einer prozentualen Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle herangezogen werden. Der Schwellenwert der prozentualen Zellviabilität, der zur Unterscheidung zwischen ätzenden und nicht ätzenden Testsubstanzen verwendet wird (oder die Schwellenwerte zur Differenzierung des ätzenden Potentials in weitere Unterklassen), müssen in einem Prädiktionsmodell vor der Validierung der Methode klar definiert sein, und die anschließende Validierungsstudie muß die Richtigkeit dieser Werte bestätigen (2).

3 BERICHTERSTATTUNG

Test-Bericht

Der Prüfbericht muß mindestens folgende Informationen enthalten:

Testsubstanz:

- Kenndaten, physikalische Eigenschaften und gegebenenfalls physikalisch-chemische Eigenschaften. Ähnliche Informationen sollten für Referenzsubstanzen vorgelegt werden, sofern sie verwendet werden.

Testbedingungen:

- Einzelheiten der angewandten Testmethode;
- Beschreibung und Begründung jeglicher Änderungen.

Ergebnisse:

- Tabellarische Anordnung der Widerstandswerte (TER-Test) oder der prozentualen Zellviabilität (Test mit menschlichem Hautmodell) für die Testsubstanz, die Positivkontrollen und Negativkontrollen sowie für alle Standard-Referenzchemikalien, einschließlich der Einzeldaten von Mehrfachbestimmungen und Wiederholungsversuchen sowie deren Mittelwerte;
- Beschreibung aller sonstigen beobachteten Wirkungen.

*Diskussion der Ergebnisse.**Schlußfolgerungen.*

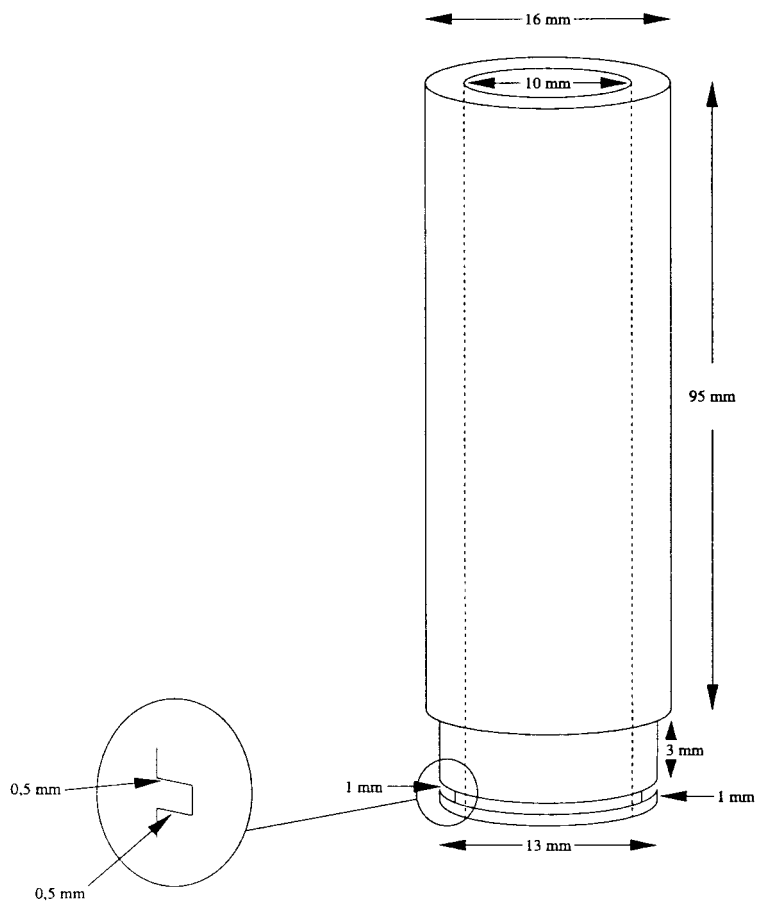
4

LITERATUR

- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, S. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhtter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, S. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, S. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, S. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, S. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, S. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, S. 219-255.

Abbildung 1

Abmessungen des PTFE-Rohrs



Abmessungen der Elektrode

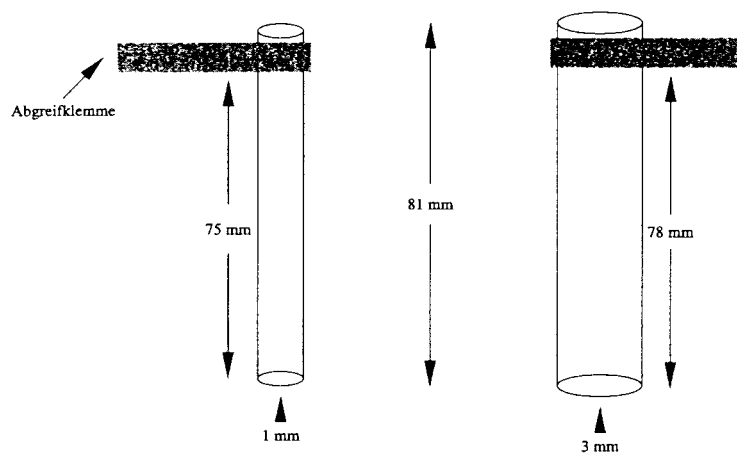
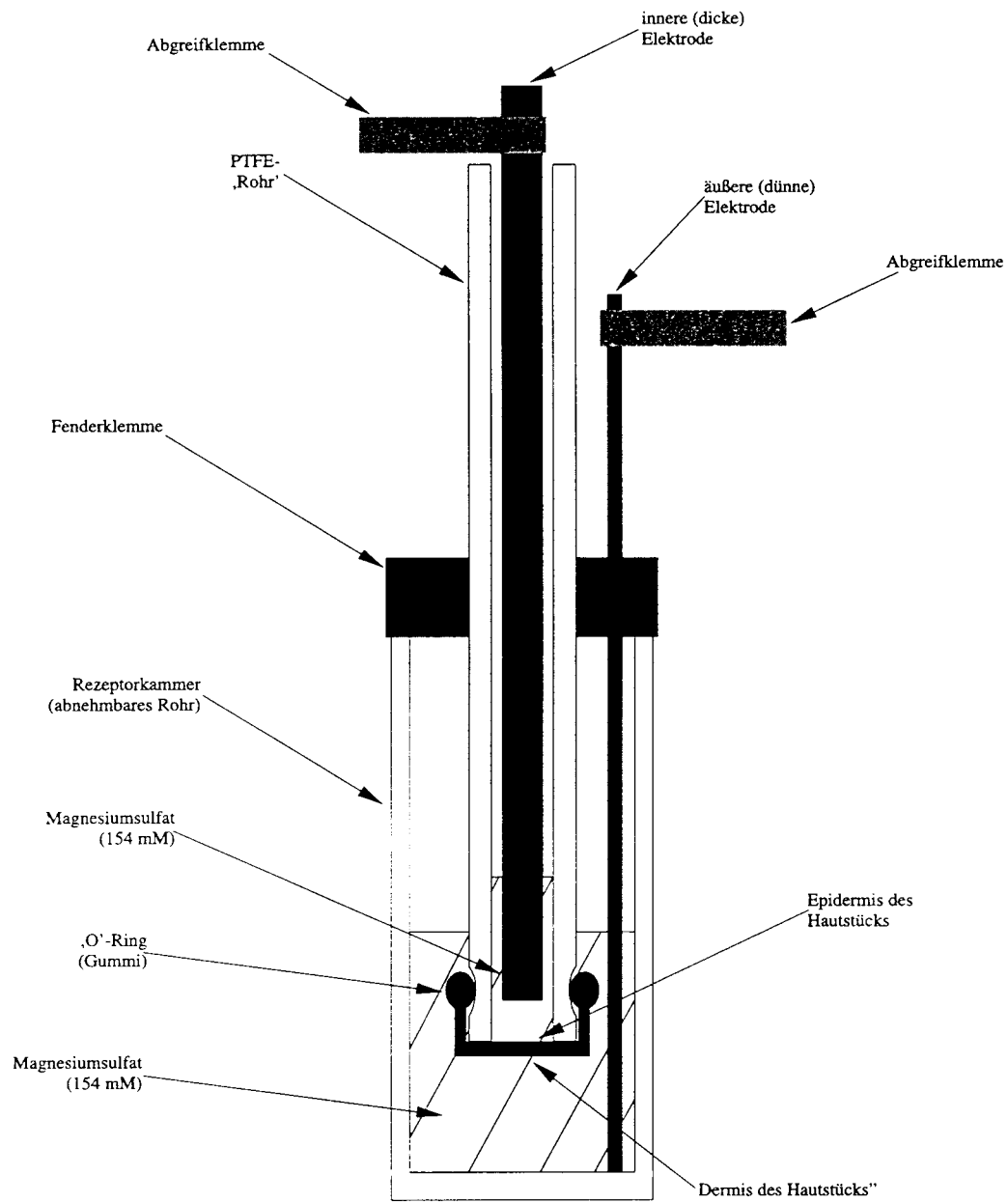


Abbildung 2

Apparatur für den TER-Test mit Rattenhaut



ANHANG II

„B.41. PHOTOTOXIZITÄT — *IN-VITRO*-3T3-NRU-PHOTOTOXIZITÄTSTEST1 **METHODE**1.1 **Einleitung**

Phototoxizität wird als toxische Reaktion definiert, die nach der ersten Exposition der Haut mit bestimmten Chemikalien bei nachfolgender Lichtexposition entsteht oder auf ähnliche Weise durch Bestrahlung der Haut nach systemischer Verabreichung eines chemischen Stoffes induziert wird.

Die aus dem *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest gewonnenen Informationen dienen der Erfassung des phototoxischen Potentials einer Testsubstanz, d. h. des Vorhandenseins bzw. Nicht-Vorhandenseins möglicher Gefahren durch eine Testsubstanz in Verbindung mit einer Exposition mit UV- und sichtbarem Licht.

Da der toxikologische Endpunkt des *In-vitro*-Tests die Bestimmung der durch die kombinierte Wirkung eines chemischen Stoffes und von Licht induzierten *Photozytotoxizität* ist, können sowohl Verbindungen, die nach systemischer Verabreichung und Aufbringung auf die Haut *in vivo* phototoxisch sind, als auch Verbindungen, die nach topischer Anwendung auf der Haut phototoxische Wirkung (Photoirritation) zeigen, durch den Test erfaßt werden.

Der *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest wurde im Zeitraum 1992-1997 (1) (2) (3) in einem gemeinsamen EU/COLIPA-Projekt entwickelt und validiert, um eine valide *In-vitro*-Alternative zu den verschiedenen gebräuchlichen *In-vivo*-Tests zu etablieren. 1996 empfahl ein OECD-Workshop ein *In-vitro*-Stufen-Testkonzept für die Beurteilung der Phototoxizität (4).

Die Ergebnisse des *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstests wurden mit akuten Phototoxizitäts-/Photoirritationswirkungen *in vivo* bei Tieren und Menschen verglichen, und es zeigte sich, daß der Test in bezug auf diese Wirkungen ausgezeichnete Vorhersagen macht. Der Test ist nicht dazu bestimmt, sonstige negative Wirkungen vorherzusagen, die sich aus der kombinierten Wirkung von Licht und einem chemischen Stoff ergeben können, wie *Photogenotoxizität*, Photoallergie und Photokarzinogenität, wenngleich viele chemische Stoffe, die diese spezifischen Eigenschaften aufweisen, in dem *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest positiv reagieren werden. Folglich ist der Test nicht für die Beurteilung der *phototoxischen* Potenz bestimmt.

Eine sequentielle Prüfstrategie zur Phototoxizitätstestung mit Chemikalien ist in Anlage 1 enthalten.

1.2 **Begriffsbestimmungen**

Bestrahlungsstärke: die Intensität des auf eine Oberfläche auftreffenden ultravioletten (UV) oder sichtbaren Lichts, gemessen in W/m^2 oder mW/cm^2 .

Lichtdosis: die Menge (= Intensität \times Zeit) der auf eine Oberfläche auftreffenden ultravioletten (UV) oder sichtbaren Strahlung, ausgedrückt in Joules (= $W \times s$) je Oberflächenbereich, z. B. J/m^2 oder J/cm^2 .

UV Licht, Bandbreiten: Die von der Internationalen Beleuchtungskommission (CIE) empfohlenen Bezeichnungen sind: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) und UVC (100-280 nm). Andere Bezeichnungen werden ebenfalls verwendet: die Trennung zwischen UVB und UVA erfolgt oft bei 320 nm; UVA kann in UV-A1 und UV-A2 unterteilt werden, wobei die Trennung bei ca. 340 nm liegt.

Zell-Viabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation (z. B. Aufnahme des Vitalfarbstoffs „Neutralrot“ in Zell-Lysosomen), die je nach dem gemessenen Endpunkt und der angewandten Versuchsauslegung mit der Gesamtzahl und/oder der Vitalität der Zellen korreliert.

Relative Zell-Viabilität: ausgedrückt in Relation zu Negativkontrollen (Lösemittel), die das gesamte Testverfahren (entweder + UV oder - UV) durchlaufen, jedoch nicht mit einer Testchemikalie behandelt wurden.

Prädiktionsmodell: Ein zur Umwandlung der Ergebnisse eines Toxizitätstests in eine Vorhersage des toxischen Potentials angewandter Algorithmus. Im vorliegenden Test können PIF und MPE für die Umwandlung der Ergebnisse des *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstests in eine Vorhersage des phototoxischen Potentials verwendet werden.

PIF (Photoirritationsfaktor): ein Faktor, der durch Vergleich von zwei gleich wirksamen zytotoxischen Konzentrationen (EC_{50}) der chemischen Testsubstanz in Abwesenheit (- UV) und in Anwesenheit (+ UV) nicht-zytotoxischer Strahlung mit UVA/vis-Licht erlangt wird.

MPE (Mean Photo Effect): eine neuartige Meßgröße, die von einer mathematischen Analyse der kompletten Form von zwei Konzentrations-Wirkungskurven hergeleitet wurde, die in Abwesenheit (- UV) und in Anwesenheit (+ UV) nicht-zytotoxischer Strahlung mit UVA/vis-Licht erzielt wurden.

Phototoxizität: eine akute toxische Reaktion, die nach der ersten Exposition der Haut mit bestimmten chemischen Stoffen bei anschließender Lichtexposition entsteht oder die auf ähnliche Weise durch Bestrahlung der Haut nach systemischer Verabreichung eines chemischen Stoffs induziert wird.

Photoirritation: ein Unterbegriff von ‚Phototoxizität‘, der verwendet wird, um nur jene phototoxischen Reaktionen zu beschreiben, die auf der Haut nach Exposition mit chemischen Stoffen (topische oder orale Verabreichung) auftreten. Diese phototoxischen Reaktionen führen stets zu nicht-spezifischen Zellschäden (sonnenbrandähnliche Reaktionen).

Photoallergie: eine erworbene immunologische Reaktion, die nicht bei der ersten Behandlung mit chemischen Stoffen und Licht auftritt und eine Induktionszeit von einer oder zwei Wochen benötigt, bevor eine Hautreaktion nachgewiesen werden kann.

Photogenotoxizität: eine bei einem genetischen Endpunkt beobachtete genotoxische Reaktion, die nach der Exposition von Zellen mit einer nicht-genotoxischen Dosis von UV/sichtbarem Licht und einem nichtgenotoxischen chemischen Stoff auftritt.

Photokarzinogenität: durch wiederholte Anwendung von Licht und chemischen Stoffen induzierte Karzinogenität. Der Begriff ‚Photo-Co-Karzinogenese‘ wird verwendet, wenn UV-induzierte Tumorigenese durch einen chemischen Stoff verstärkt wird.

1.3 Referenzsubstanzen

Abgesehen von der Positivkontroll-Chemikalie *Chlorpromazin*, die in jedem Test gleichzeitig mitgetestet werden sollte, wird für die Neuetablierung des 3T3-NRU-Phototoxizitätstests empfohlen, als Referenzchemikalien einige Vertreter der bei diesem Test in den Ringversuchen benutzten Chemikalien zu verwenden (1) (3) (13).

1.4 Vorbemerkungen

Bei vielen Klassen von Chemikalien wurde festgestellt, daß sie phototoxische Wirkungen induzieren (5) (6) (7) (8). Ihr einziges gemeinsames Merkmal ist ihre Fähigkeit, Lichtenergie im Sonnenlichtbereich zu absorbieren. Gemäß dem ersten photochemischen Gesetz (dem Grotthaus-Draperschen Gesetz), erfordert die Photoreaktion ausreichende Lichtquantenabsorption. Folglich sollte, bevor eine biologische Testung gemäß der vorliegenden Prüfrichtlinie in Betracht gezogen wird, ein UV/vis-Absorptionsspektrum der Testchemikalie bestimmt werden (z. B. gemäß der OECD-Test Guideline 101). Sofern der molare Extinktions-/Absorptionskoeffizient unter $10 \text{ Liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ liegt, besitzt der chemische Stoff kein photoreaktives Potential und braucht nicht im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest oder einem anderen biologischen Test auf schädliche photochemische Wirkungen (Anlage 1) getestet zu werden.

1.5 Prinzip der Testmethode

Vier Mechanismen wurden identifiziert, durch die Lichtabsorption mittels eines (chemischen) Chromophors zu einer phototoxischen Reaktion führen kann (7). Sie alle haben Zellschädigung zur Folge. Daher basiert der *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest auf einem Vergleich der Zytotoxizität eines chemischen Stoffs, die er mit Exposition und ohne Exposition einer nicht-zytotoxischen Dosis UVA/vis-Licht aufweist. Zytotoxizität in diesem Test wird ausgedrückt als konzentrationsabhängige Reduzierung der Aufnahme des Vitalfarbstoffs Neutralrot (NR, (9)) 24 Stunden nach der Bestrahlung und Behandlung mit der Testchemikalie.

Balb/c-3T3-Zellen werden zwecks Bildung eines Monolayers 24 Stunden kultiviert. Zwei ‚96-well‘-Platten je Testchemikalie werden sodann mit acht verschiedenen Konzentrationen der Chemikalie eine Stunde lang vorinkubiert. Daraufhin wird eine der zwei Platten mit einer nicht-toxischen UVA/vis-Lichtdosis von 5 J/cm^2 UVA (+ UV-Versuch) bestrahlt, während die andere Platte im Dunkeln aufbewahrt wird (- UV-Versuch). In beiden Platten wird dann das Behandlungsmedium durch ein Kulturmedium ersetzt, und nach weiteren 24 Stunden Inkubation wird die Zellviabilität durch Neutralrot-Aufnahme (‚Neutral Red Uptake‘, NRU) drei Stunden lang bestimmt. Die relative Zellviabilität, ausgedrückt als Prozentsatz unbehandelter Negativkontrollen, wird für jede der acht Testkonzentrationen berechnet. Um das phototoxische Potential vorherzusagen, wird in der Regel der EC_{50} -Wert (d. h. die Konzentration, die die Zellviabilität gegenüber unbehandelten Kontrollen um 50% vermindert) der, mit (+ UV) und ohne (- UV) Strahlung erzielten Konzentrations-Wirkungskurve verglichen.

1.6 Qualitätskriterien

UVA-Sensitivität der Zellen, historische Daten: Die Zellen sollten regelmäßig auf ihre Empfindlichkeit gegenüber UVA geprüft werden. Die Zellen werden in der im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest angewandten Dichte ausgesät, am darauffolgenden Tag mit UVA-Dosen von $1-9 \text{ J/cm}^2$ bestrahlt, und die Zell-Viabilität wird einen Tag später im NRU-Test bestimmt. Die Zellen entsprechen den Qualitätskriterien, sofern ihre Viabilität nach Bestrahlung mit 5 J/cm^2 UVA nicht weniger als 80% der Viabilität der Dunkelkontrollen beträgt. Bei der höchsten UVA-Dosis von 9 J/cm^2 sollte die Viabilität nicht weniger als 50% der Dunkelkontrollen betragen. Diese Prüfung sollte ca. bei jeder zehnten Passage der Zellen wiederholt werden.

UVA-Sensitivität der Negativkontroll-Zellen, im einzelnen Test: Der Test entspricht den Qualitätskriterien, wenn Negativkontrollen (Zellen in EBSS (Earl's Balanced Salt Solution)) mit oder ohne 1% Dimethylsulfoxid (DMSO) oder 1% Ethanol (EtOH) in dem + UVA-Versuch eine Viabilität von weniger als 80% der Viabilität nicht-be-strahlter Zellen in demselben Lösemittel des gleichzeitig durchgeführten Dunkelversuchs (- UVA) aufzeigen.

Viabilität von Negativkontrollen: Die absolute optische Dichte ($OD_{540\text{ NRU}}$), gemessen im NR-Extrakt der Negativkontrollen zeigt, ob die 1×10^4 Zellen die je ‚well‘ ausgesät wurden, bei normaler Verdopplungszeit während der zwei Tage des Tests gut gewachsen sind. Ein Test entspricht den Akzeptanzkriterien, wenn die mittlere $OD_{540\text{ NRU}}$ unbehandelter Kontrollen $\geq 0,2$ beträgt.

Positivkontrolle: Ein bekannter phototoxischer chemischer Stoff soll gleichzeitig mit jedem *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest getestet werden. Chlorpromazin (CPZ) wurde als Positivkontrolle in der EU/COLIPA-Validierungsstudie verwendet und wird daher empfohlen. Für mit dem Standardprotokoll im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest getestetes CPZ wurden folgende Test-Akzeptanzkriterien festgelegt: *bestrahltes* CPZ (+ UVA): $EC_{50} = 0,1$ bis $2,0 \mu\text{g/ml}$, *nicht-bestrahltes* CPZ (- UVA): $EC_{50} = 7,0$ bis $90,0 \mu\text{g/ml}$. Der Photoirritationsfaktor (PIF), d. h. die Verschiebung der EC_{50} sollte mindestens 6 betragen.

Andere bekannte, für die Chemikalienklasse oder Löslichkeitsmerkmale der bewerteten Testchemikalie geeignete phototoxische Chemikalien, können an Stelle von CPZ als gleichzeitige Positivkontrollen verwendet werden. In diesem Fall sollten die Bereiche der EC_{50} -Werte sowie PIF oder MPE auf der Grundlage von historischen Daten in angemessener Form als Akzeptanzkriterien für den Test festgelegt

1.7 Beschreibung der Testmethode

1.7.1 Zubereitungen

1.7.1.1 Zellen

Eine permanente Mäuse-Fibroblastenzelllinie — Balb/c 3T3, Klon 31 — entweder von ATCC oder ECACC — wurde in der Validierungsstudie verwendet und wird daher empfohlen. Andere Zellen oder Zelllinien können erfolgreich mit demselben Testprotokoll verwendet werden, wenn die Kulturbedingungen den spezifischen Bedürfnissen der Zellen angepaßt werden, jedoch muß die gleichwertige Eignung der Zellen nachgewiesen werden.

Zellen sollten regelmäßig auf die Abwesenheit von Mykoplasma-Kontamination hin geprüft und nur verwendet werden, sofern die Ergebnisse solcher Prüfungen zufriedenstellend sind.

Da die UVA-Sensitivität von Zellen mit der erreichbaren Passagenzahl zunehmen kann, sollten Balb/c 3T3-Zellen der niedrigsten Passagenzahl, vorzugsweise weniger als 100, verwendet werden. Es ist wichtig, daß die UVA-Sensitivität der Balb/c-3T3-Zellen regelmäßig entsprechend dem in der vorliegenden Prüfrichtlinie beschriebenen Qualitätskontrollverfahren geprüft wird.

1.7.1.2 Medien und Kulturbedingungen

Für Routine-Zellpassagen und während des Testverfahrens sollten geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen angewendet werden. Für Balb/c-3T3-Zellen sind dies DMEM mit einem Zusatz von 10% Serum neugeborener Kälber, 4 mM Glutamin, Penicillin und Streptomycin sowie Feuchtinkubation bei $37^\circ\text{C}/7,5\% \text{CO}_2$. Es ist dabei besonders wichtig, daß die Zell-Kulturbedingungen eine Zellzyklus-Zeit innerhalb des normalen historischen Bereichs der verwendeten Zellen oder Zelllinien sicherstellen.

1.7.1.3 Zubereitung von Kulturen

Zellen aus der Tiefkühlagerung werden in einem Kulturmedium in angemessener Dichte ausgesät und mindestens einmal vor ihrer Verwendung im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest passagiert.

Für den Phototoxizitätstest werden Zellen in einem Kulturmedium in einer Dichte ausgesät, die sicherstellt, daß die Kulturen zum Ende des Tests, d. h. wenn die Zellviabilität 48 Stunden nach dem Aussäen der Zellen bestimmt wird, ihre maximale Dichte (Konfluenz) noch nicht erreicht haben. Für Balb/c-3T3-Zellen, die in ‚96-well‘-Platten kultiviert werden, beträgt die empfohlene Zelldichte 1×10^4 Zellen je ‚well‘.

Für jede Testchemikalie werden Zellen identisch in zwei separate ‚96-well‘-Platten gesät, die sodann gleichzeitig während des gesamten Testverfahrens unter identischen Kulturbedingungen behandelt werden, abgesehen von dem Zeitraum, in dem eine der Platten (+ UVA/vis) bestrahlt und die andere im Dunkeln (- UVA/vis) aufbewahrt wird.

1.7.1.4 Stoffwechselaktivierung

Während die Verwendung metabolisierender Systeme eine allgemeine Voraussetzung für alle *In-vitro*-Tests für die Vorhersage von genotoxischem und karzinogenem Potential ist, ist bisher im Falle der Phototoxikologie kein chemischer Stoff bekannt, für den eine metabolische Umwandlung erforderlich ist, um *in vivo* oder *in vitro* phototoxische Wirkung zu zeigen. Somit wird es weder als notwendig noch als wissenschaftlich gerechtfertigt erachtet, daß dieser Test mit einem Stoffwechselaktivierungssystem durchgeführt wird.

1.7.1.5 Testsubstanz/Zubereitung

Testchemikalien müssen unmittelbar vor ihrer Verwendung frisch zubereitet werden, es sei denn, Haltbarkeitsdaten rechtfertigen eine Lagerung der Präparation. Eine Zubereitung unter Rotlicht kann erforderlich sein, wenn mit einer raschen Photodegradation zu rechnen ist.

Die Testchemikalien sollten in einer gepufferten Salzlösung, z. B. EBSS oder PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), gelöst werden, die, um Interferenzen während der Bestrahlung zu vermeiden, frei sein muß von Proteinbestandteilen und lichtabsorbierenden pH-Indikationsfarben.

Testchemikalien mit eingeschränkter Wasserlöslichkeit sollten in geeigneten Lösemitteln in einem Hundertfachen der gewünschten Endkonzentration gelöst und dann 1:100 mit der gepufferten Salzlösung verdünnt werden. Wenn ein Lösemittel verwendet wird, muß es mit einem konstanten Volumen von 1% (v/v) in allen Kulturen anwesend sein, d. h. sowohl in den Negativkontrollen als auch in allen Konzentrationen der Testchemikalie.

Dimethylsulphoxid (DMSO) und Ethanol (EtOH) sind die empfohlenen Lösemittel. Andere Lösemittel von geringer Zytotoxizität (z. B. Aceton) können angemessen sein, doch sollten sie sorgfältig auf spezifische Eigenschaften, wie Reaktion mit der Testchemikalie, Auslöschten der phototoxischen Wirkung, Einfangen von Radikalen, geprüft werden.

Wirbelmischung (Vortex) und/oder Anwendung von Ultraschall und/oder Erwärmung auf 37°C können, sofern erforderlich, verwendet werden, um die Löslichkeit zu fördern.

1.7.1.6 UV-Bestrahlung

Lichtquelle: Die Wahl der geeigneten Lichtquelle und geeigneter Filter ist der kritischste Faktor bei der Phototoxizitätstestung. Für Photosensibilisierung sind in der Regel UVA und sichtbare Bereiche verantwortlich (7) (10), während UVB weniger relevant und selbst hochgradig zytotoxisch ist, da es seine Zytotoxizität um ein Tausendfaches zwischen 313 und 280 nm erhöht (11). Kriterien für die Wahl einer geeigneten Lichtquelle sollten die wesentliche Voraussetzung haben, daß die Lichtquelle Wellenlängen aussendet, die von der chemischen Testsubstanz absorbiert werden und daß die (in einer akzeptablen Zeit erreichbare) Lichtdosis für den Nachweis bekannter Photosensibilisatoren ausreicht. Darüber hinaus sollten die jeweils verwendeten Wellenlängen und Dosen, einschließlich der Wärmeemission (Infrarotbereich), für das Testsystem nicht unnötig schädlich sein.

Die Simulierung von Sonnenlicht mit Solarsimulatoren wird als optimale Lichtquelle betrachtet. Sowohl Xenon-Lichtbogenlampen als auch (dotierte) Quecksilber-Metallhalogenid-Lichtbogenlampen werden in Solarsimulatoren verwendet. Letztere haben den Vorteil, daß sie weniger Wärme emittieren und preiswerter sind, doch ist die Übereinstimmung mit dem Sonnenlicht nicht perfekt. Da alle Solarsimulatoren signifikante Mengen UVB aussenden, sollten sie angemessen gefiltert sein, um die hoch zytotoxischen UVB-Wellenlängen zu mindern.

Für den *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest sollte ein Strahlungsspektrum verwendet werden, das praktisch frei von UVB ist (UVA:UVB ~ 1:20). Die spektrale Energieverteilung des in der Validierungsstudie zum *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest verwendeten gefilterten Solarsimulators wurde als Beispiel veröffentlicht (3).

Dosimetrie: Die Lichtintensität (Bestrahlungsstärke) sollte regelmäßig vor jedem Phototoxizitätstest unter Verwendung eines geeigneten Breitband-UV-Meters geprüft werden. Das UV-Meter muß für die Lichtquelle kalibriert sein. Die Leistungsfähigkeit des UV-Meters ist sicherzustellen. Zu diesem Zweck wird die Verwendung eines zweiten Referenz-UV-Meters des gleichen Typs und dergleichen Kalibrierung empfohlen. Im Idealfall sollte in größeren Abständen ein Spektroradiometer zur Messung der spektralen Energieverteilung der gefilterten Lichtquelle und zur Prüfung der Kalibrierung des Breitband-UV-Meters verwendet werden, doch erfordern solche Instrumente fachkundige Bedienung durch entsprechend geschultes Personal.

Eine Dosis von 5 J/cm² (UVA) wurde in der Validierungsstudie als nicht-zytotoxisch gegenüber Balb/c-3T3-Zellen und als ausreichend stark ermittelt, um selbst schwach phototoxische Chemikalien zu erkennen. Um innerhalb von 50 Minuten 5 J/cm² zu erreichen, muß die Bestrahlungsstärke auf 1666 mW/cm² eingestellt werden. Wenn eine andere Zelllinie oder eine unterschiedliche Lichtquelle verwendet werden, kann die UVA-Dosis bei Berücksichtigung der Kriterien der Unschädlichkeit gegenüber Zellen und der ausreichenden Stärke zur Erkennung von Standardphototoxinen geringfügig angepaßt werden. Die Zeit der Lichtexposition wird auf folgendem Wege berechnet:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{Strahlungsdosis (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{Strahlung (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2 Testbedingungen

Die maximale Konzentration einer Testchemikalie sollte 100 µg/ml nicht überschreiten, da alle phototoxischen Chemikalien bei niedrigeren Konzentrationen erfaßt wurden, während die Inzidenz von falsch positiven Werten bei höheren Konzentrationen zunimmt (13). Der pH der höchsten Konzentration der Testchemikalie sollte zufriedenstellend sein (pH-Bereich: 6,5-7,8).

Die in Anwesenheit (+ UVA) und in Abwesenheit (- UVA) von Licht zu testenden Konzentrationsbereiche eines chemischen Stoffs sollten angemessen in vorangehenden Vorversuchen ermittelt werden. Bereich und Abstand einer Konzentrationsreihe müssen so gewählt werden, daß Konzentrations-Wirkungskurven ausrei-

chend durch experimentelle Daten gestützt werden. Dazu wird die Verwendung von geometrischen Konzentrationsreihen (mit einem konstanten Verdünnungsfaktor) empfohlen.

1.7.3 Testverfahren⁽¹⁾

1.7.3.1 1. Tag

Eine Zellsuspension von 1×10^5 Zellen/ml wird in einem Kulturmedium zubereitet, und 100 µL Kulturmedium werden nur in die peripheren ‚wells‘ einer ‚96-well‘-Gewebskultur Mikrotiterplatte gegeben (= Blindproben). In die übrigen ‚wells‘ werden 100 µL der Zellsuspension von 1×10^5 Zellen/ml (= 1×10^4 Zellen/well) pipettiert. Für jede Testchemikalie werden zwei Platten zubereitet: eine zur Bestimmung von Zytotoxizität (- UVA) und die andere zur Bestimmung von Photozytotoxizität (+ UVA).

Die Zellen werden 24 Stunden lang (7,5% CO₂, 37°C) inkubiert, bis sie einen halbkongruenten Monolayer bilden. Diese Inkubationszeit stellt die Erholung der Zellen, das Anheften und ein exponentielles Wachstum sicher.

1.7.3.2 2. Tag

Nach der Inkubation wird das Kulturmedium abgesaugt. Darauf folgen zwei Waschgänge mit 150 µL EBSS/PBS je ‚well‘, und 100 µL EBSS/PBS, die die geeignete Konzentration der Testchemikalie oder einfach nur Lösemittel (Negativkontrolle) enthält, werden hinzugefügt. Es sind 8 verschiedene Konzentrationen der Testchemikalie zu verwenden. Die Zellen werden mit der Testchemikalie im Dunkeln 60 Minuten lang inkubiert (7,5% CO₂, 37°C).

Zur Durchführung des (+ UVA)-Teils des Tests werden die Zellen bei Raumtemperatur 50 Minuten lang durch den Deckel der ‚96-well‘-Platte mit 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²) bestrahlt. Zur Vermeidung von H₂O-Kondensierung unter dem Deckel wird ein Ventilator eingesetzt. Duplikatplatten (- UVA) werden 50 Minuten lang (= UVA-Expositionszeit) bei Raumtemperatur in einem dunklen Kasten gehalten.

Die Testflüssigkeit wird abgesaugt. Es folgen zwei Waschgänge mit 150 µL EBSS/PBS wird durch ein Kulturmedium ersetzt und über Nacht (18-22 h) inkubiert (7,5% CO₂, 37°C).

1.7.3.3 3. Tag

Mikroskopische Bewertung

Die Zellen werden unter einem Phasen-Kontrast-Mikroskop untersucht. Eventuelle morphologische Veränderungen der Zelle durch zytotoxische Wirkungen der Testchemikalie werden aufgezeichnet. Diese Prüfung wird empfohlen, um Versuchsirrtümer auszuschalten, doch werden diese Aufzeichnungen nicht für die Bewertung der Zytotoxizität oder Phototoxizität verwendet.

Neutralrot-Aufnahme-Test

Die Zellen werden mit 150 µL vorgewärmter EBSS/PBS gewaschen. Die Waschlösung wird durch vorsichtiges Absaugen entfernt. 100 µL des NR-Mediums werden hinzugefügt und bei 37°C, in feuchter Atmosphäre von 7,5% CO₂, 3 Stunden lang inkubiert.

Nach der Inkubation wird das NR-Medium entfernt, und die Zellen werden mit 150 µL EBSS/PBS gewaschen. Die EBSS/PBS wird vollkommen abgesaugt, und die 96-well-Platten umgekehrt auf ‚blotting paper‘ getrocknet. (Wahlweise kann die Platte umgekehrt (d. h. mit den wells nach außen) zentrifugiert werden.)

Es werden genau 150 µL NR Desorptionslösung (frisch zubereitete Ethanol/Essigsäure) hinzugefügt.

Die Mikrotiter-Platte wird 10 Minuten lang auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler rasch geschüttelt, bis das NR aus den Zellen extrahiert ist und eine homogene Lösung bildet.

Die optische Dichte der NR-Extrakte wird bei 540 nm in einem Spektralphotometer gemessen, wobei die Blindproben als Referenz verwendet werden. Die Daten sind in angemessenem Format (z. B. ASCII) für spätere Analysen aufzuzeichnen.

⁽¹⁾ Für weitere Einzelheiten siehe Literaturverzeichnis (12).

2 DATEN

2.1 Qualität und Quantität von Daten

Die Daten sollten eine sinnvolle Analyse der in Anwesenheit und in Abwesenheit von UVA/vis-Strahlung erhaltenen Konzentrations-Wirkungsreaktionen gestatten. Sofern Zytotoxizität ermittelt wird, sollten sowohl der Konzentrationsbereich als auch der Abstand einzelner Konzentrationen so gewählt sein, dass die experimentellen Daten in einer Kurve dargestellt werden können. Da eine Testchemikalie bis zu der festgelegten Konzentrationsgrenze von 100 µg/ml im Dunkelversuch (- UVA) nicht zytotoxisch, bei Bestrahlung (+ UVA) jedoch hochgradig zytotoxisch sein könnte, ist es möglich, daß die zu prüfenden Konzentrationsbereiche in beiden Teilen des Versuchs einen unterschiedlichen Bereich abdecken müssen, um den Anforderungen zufriedenstellender Datenqualität zu entsprechen. Wenn in beiden Versuchsteilen (- UVA und + UVA) keine Zytotoxizität ermittelt werden kann, ist jedoch ein großer Abstand zwischen den einzelnen Konzentrationen bis zur höchsten Konzentration ausreichend.

Üblicherweise ist die Verifizierung eines klar positiven Ergebnisses durch eine Versuchswiederholung nicht erforderlich. Darüber hinaus müssen klar negative Ergebnisse ebenfalls nicht verifiziert werden, vorausgesetzt, daß die Testchemikalie in genügend hohen Konzentrationen getestet wurde. In solchen Fällen ist ein Hauptversuch zusammen mit einem oder mehreren Vorversuchen ausreichend.

Tests mit Grenzergebnissen nahe der Klassifizierungsgrenze des Prädiktionsmodells sollten zur Überprüfung wiederholt werden.

Wenn Wiederholungstests für erforderlich gehalten werden, können Variationen der Versuchsbedingungen wichtig sein, um zu einem klaren Ergebnis zu gelangen. Eine Schlüsselrolle hat dabei die Zubereitung von Lösungen der Testchemikalie. Folglich können Variationen dieser Bedingungen (zweites Lösemittel, Schütteln, Anwendung von Ultraschall) bei der Wiederholung eines Tests äußerst relevant sein. Als Alternative kann auch eine Änderung der Inkubationszeit vor der Bestrahlung in Betracht gezogen werden, wie z. B. kürzere Zeit für in Wasser instabile Chemikalien.

2.2 Behandlung der Ergebnisse

Sofern möglich, wird die Konzentration einer Testchemikalie bestimmt, die eine 50%ige Hemmung der zellulären Neutral-Rot-Aufnahme (EC_{50}) repräsentiert. Dies kann durch Anwendung geeigneter nichtlinearer Regressionsverfahren (vorzugsweise einer Hill-Funktion oder einer logistischen Regression) auf die Konzentrations-Wirkungsdaten oder durch Anwendung sonstiger Fitting-Verfahren (14) erfolgen. Vor Verwendung eines EC_{50} -Wertes für weitere Berechnungen sollte die Qualität der Kurvenanpassung angemessen geprüft werden. Als Alternative können graphische Fitting-Methoden zur Berechnung des EC_{50} angewendet werden. In diesem Fall wird die Verwendung von Wahrscheinlichkeitspapier (x-Achse: log, y-Achse: probit) empfohlen, da in vielen Fällen die Konzentrations-Wirkungsfunktion nach dieser Umwandlung nahezu linear wird.

2.3 Ergebnisbewertung (Prädiktionsmodelle)

2.3.1 Prädiktionsmodell-Version 1: Photo-Irritationsfaktor (PIF)

Wenn sowohl in Anwesenheit (+ UVA) als auch in Abwesenheit (- UVA) von Licht komplette Konzentrations-Wirkungskurven erzielt werden, wird ein Photoirritationsfaktor (PIF) durch folgende Formel berechnet:

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

Ein $PIF < 5$, sagt kein phototoxisches Potential voraus, während ein $PIF \geq 5$ ein phototoxisches Potential voraussagt.

Stellt sich ein chemischer Stoff in einem Test nur als zytotoxisch + UVA und als nicht-zytotoxisch - UVA heraus, kann der PIF nicht berechnet werden, auch wenn dies ein Ergebnis darstellt, das auf ein phototoxisches Potential hindeutet. In derartigen Fällen kann ein $> PIF$ berechnet werden, wenn der (- UV) Zytotoxizitätstest bis zur höchsten Testkonzentration (C_{max}) durchgeführt und dieser Wert für die Berechnung des $> PIF$ verwendet wird:

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

Wenn nur ein $> PIF$ erzielt werden kann, sagt jeglicher Wert > 1 ein phototoxisches Potential voraus.

Wenn sowohl die $EC_{50}(-UV)$ als auch die $EC_{50}(+UV)$ nicht berechnet werden können, weil ein chemischer Stoff bis zur höchsten Testkonzentration keine Zytotoxizität aufweist, deutet dies darauf hin, daß kein phototoxisches Potential vorliegt. In derartigen Fällen wird ein formaler $PIF = *1$ zur Charakterisierung des Ergebnisses des Ergebnisses angewandt:

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

Wenn nur ein ‚PIF = *1‘ erzielt werden kann, sagt dies voraus, daß kein phototoxisches Potential vorliegt

In den Fällen b) und c), sollten die im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest maximal erreichten Konzentrationen der Testchemikalie bei der Vorhersage des phototoxischen Potentials sorgfältig in Betracht gezogen werden.

2.3.2 Prädiktionsmodell-Version 2: Mean-Photo-Effect (MPE)

Als Alternative kann eine neue Version des Modells zur Vorhersage eines phototoxischen Potentials angewandt werden, das mit den Daten der EU/COLIPA-Validierungsstudie (15) entwickelt und unter blinden Bedingungen in einer anschließenden Studie über die *In-vitro*-Phototoxizität von UV-Filter-Chemikalien getestet wurde (13). Dieses Modell hat nicht die Beschränkungen des PIF-Modells in den Fällen, in denen kein EC₅₀ erzielt werden kann. Das Modell wendet den ‚Mean Photo Effect‘ (MPE) an, einen Meßwert, der auf einem Vergleich der kompletten Konzentrations-Wirkungskurven basiert. Für die Anwendung des MPE-Modells wurde eine spezielle Computer-Software an der Humboldt-Universität (Berlin, D.) entwickelt die kostenlos bezogen werden kann.

2.4 Interpretation der Ergebnisse

Ein positives Ergebnis im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest (PIF \geq 5 oder MPE \geq 0,1) deutet darauf hin, daß die Testsubstanz ein phototoxisches Potential aufweist. Wenn dieses Ergebnis bei Konzentrationen unter 10 µg/ml erzielt wurde, ist zu vermuten, daß die Testchemikalie auch unter verschiedenen Expositionsbedingungen *in vivo* phototoxisch wirkt. Wenn ein positives Ergebnis nur bei der höchsten Testkonzentration von 100 µg/ml erzielt wird, können weitere Überlegungen für die Beurteilung der Gefährlichkeit oder der phototoxischen Potenz erforderlich sein. Dies können Daten über die Penetration, Absorption und mögliche Akkumulation des chemischen Stoffs in der Haut oder die Testung des chemischen Stoffs in einem konfirmativen Alternativtest, wie dem *In-vitro*-Test mit einem menschlichen Hautmodell, sein.

Ein negatives Ergebnis im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest (PIF < 5 oder MPE < 0,1) bedeutet, daß die Testsubstanz für kultivierte Säugerzellen unter den angewandten Versuchsbedingungen nicht phototoxisch war. In Fällen, in denen der chemische Stoff bis zur höchsten Konzentration von 100 µg/ml getestet werden konnte, deutet ein negatives Ergebnis an, daß der chemische Stoff kein phototoxisches Potential besitzt und daß Phototoxizität *in vivo* als unwahrscheinlich gelten kann. In Fällen, in denen identische Konzentrations-Toxizitätsreaktionen (EC₅₀ + UV und EC₅₀- UV) bei niedrigeren Konzentrationen erhalten wurden, wäre die Interpretation der Daten dieselbe. Wenn dagegen + UV und - UV keinerlei Toxizität nachgewiesen wurde und gleichzeitig die Konzentrationswerte auf weniger als 100 µg/ml durch eine eingeschränkte Löslichkeit in wässrigen Systemen beschränkt waren, sollte die Eignung des Tests für die Testsubstanz in Frage gestellt und ein Bestätigungstest erwogen werden (z. B. Verwendung eines *In-vitro*-Hautmodells oder eines *Ex-vivo*-Hautmodells oder eines *In-vivo*-Tests).

3 BERICHTERSTATTUNG

Test-Bericht

Der Test-Bericht muß folgende Informationen enthalten:

Testchemikalie:

- Kenndaten und CAS-Nr., sofern bekannt,
- physikalische Eigenschaften und Reinheit,
- physikalisch-chemische Eigenschaften, die für die Durchführung der Studie relevant sind,
- Stabilität und Photostabilität, sofern bekannt.

Lösemittel:

- Begründung der Wahl des Lösemittels,
- Löslichkeit der Testchemikalie in diesem Lösemittel,
- Prozentsatz des in dem Behandlungsmedium (EBSS oder PBS) vorhandenen Lösemittels.

Zellen:

- Art und Quelle der Zellen,
- Abwesenheit von Mykoplasma,
- Zahl der Zellpassagen, sofern bekannt,
- UVA-Sensitivität von Zellen, bestimmt mit dem im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest verwendeten Bestrahlungsgerät.

Testbedingungen a); Inkubation vor und nach der Behandlung:

- Art und Zusammensetzung des Kulturmediums,
- Inkubationsbedingungen (CO₂-Konzentration, Temperatur, Feuchtigkeit),
- Inkubationsdauer (Vorbehandlung, Nachbehandlung).

Testbedingungen b); Behandlung mit der Chemikalie:

- Begründung der Wahl der in Anwesenheit und in Abwesenheit von UV/vis-Strahlung verwendeten Konzentrationen der Testchemikalie,
- im Falle beschränkter Löslichkeit der Testchemikalie und bei Abwesenheit von Zytotoxizität Begründung der höchsten getesteten Konzentration,
- Art und Zusammensetzung des Behandlungsmediums (gepufferte Salzlösung),
- Dauer der chemischen Behandlung.

Testbedingungen c); Bestrahlung:

- Begründung der Wahl der verwendeten Lichtquelle,
- Charakterisierung der spektralen Energieverteilung der Lichtquelle,
- Durchlass-/Absorptionsmerkmale des bzw. der verwendeten Filter,
- Merkmale des Strahlenmessgeräts und Einzelheiten der Kalibrierung,
- Abstand der Lichtquelle vom Testsystem,
- UVA-Strahlung bei dieser Entfernung, ausgedrückt in mW/cm^2 ,
- Dauer der UV/vis-Lichtexposition,
- UVA-Dosis (Strahlung \times Zeit), ausgedrückt in J/cm^2 ,
- Temperatur der Zellkulturen während der Bestrahlung und der gleichzeitig im Dunkeln gehaltenen Zellkulturen.

Testbedingungen d); NRU-Test:

- Zusammensetzung des NR-Mediums,
- Dauer der NR-Inkubation,
- Inkubationsbedingungen (CO_2 -Konzentration, Temperatur, Feuchtigkeit),
- NR-Extraktionsbedingungen (Extraktionsmittel, Dauer),
- Wellenlänge, die für die photometrische Messung der optischen Dichte von NR verwendet wurde,
- zweite Referenzwellenlänge, sofern verwendet,
- Inhalt der photometrischen Referenz (Blindprobe), sofern verwendet.

Ergebnisse:

- bei jeder Konzentration der Testchemikalie erhaltene Zell-Viabilität, ausgedrückt als Prozentsatz der mittleren Viabilität der Kontrollen,
- Konzentrations-Wirkungskurven (Konzentration der Testchemikalie vs. relative Zell-Viabilität), der gleichzeitig durchgeführten + UVA- und - UVA-Versuche,
- Analyse der Konzentrations-Wirkungskurven: sofern möglich, Angabe der EC_{50} (+ UVA)- und EC_{50} (- UVA)-Werte (berechnet mit Computer oder durch anderweitige Verfahren),
- Vergleich der zwei in Anwesenheit und in Abwesenheit von UVA/vis-Bestrahlung erhaltenen Konzentrations-Wirkungskurven entweder durch Berechnung des Photo-Irritationsfaktors (PIF) oder durch Berechnung des Mean Photo Effects (MPE),
- Klassifizierung des phototoxischen Potentials,
- Testakzeptanzkriterien (a), *Negativkontrolle des Tests:*
 - absolute Viabilität (optische Dichte des NR-Extrakts) von bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen,
 - historische Daten zur Negativkontrolle, Mittelwerte und Standardabweichungen
- Testakzeptanzkriterien (b), *Positivkontrolle des Tests:*
 - EC_{50} (+ UVA) und EC_{50} (- UVA) und PIF der Positivkontroll-Chemikalie,
 - historische Daten zur Positivkontroll-Chemikalie: EC_{50} (+ UVA) und EC_{50} (- UVA) und PIF, Mittelwerte und Standardabweichungen

*Diskussion der Ergebnisse**Schlußfolgerungen*

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, S. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, S. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA 'In vitro phototoxicity' validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, S. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, S. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, S. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, S. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, S. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, S. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, S. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, S. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project 'In Vitro Photoirritation'.
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, S. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, S. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, S. 445-462.

Anlage

Rolle des 3T3-NRU PT in einer sequentiellen Prüfstrategie zur Phototoxizitätstestung von Chemikalien

