

사람유래의 섬유아세포 배양을 이용하여 NRU(neutral red uptake) 시험법에 의한 *in vitro* 광독성 대체시험연구

이종권* · 이은희 · 김형수 · 홍진태 · 류승렬 · 박기숙
김대병 · 김부영 · 조대현 · 이선희
식품의약품안전청 국립독성연구소 독성부

In vitro Alternative Study of Phototoxicity by Neutral Red Uptake Assay Using Human Fibroblast

Jong Kwon Lee*, Eun Hee Lee, Hyung Soo Kim, Jin Tae Hong, Seung Rel Ryu
Ki Sook Park, Dai Byung Kim, Pu Young Kim
Dae Hyun Cho and Sun Hee Lee

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration 5 Nokbun-Dong,
Eunpyung-Gu, Seoul, 122-704, Korea
(Received February 16, 2000)
(Accepted March 28, 2000)

ABSTRACT: This study was conducted to assess a possible alternative method as replacements for *in vivo* test. The human fibroblasts were exposed to several phototoxic chemicals (promethazine, neutral red, chlorotetracycline, amitodarone, bithionol, 8-methoxypsoralen) and non-phototoxic substance, ammonium laur-eth sulfate and irradiated with 5 J/cm² of UVA (320~400 nm). The cell viability was measured by NRU(neutral red uptake) assay. The phototoxic potential of test chemicals in the NRU PT (phototoxicity test) was assessed by determining the PIF (photoirritancy Factor) by using a cut-off value of 5. The NRU PT responses of most chemicals showed a close agreement with *in vivo* response except bithionol. There was a relatively good agreement between *in vitro* NRU assay and *in vivo* data. These results suggest that NRU assay using fibroblast could be used to predict the phototoxicity.

Key Words: Phototoxicity, NRU, UVA, Fibroblast, Cytotoxicity

I. 서 론

화학물질의 광독성 평가는 기니피, 마우스, 토끼등을 이용한 *in vivo* 시험으로 수행하여 왔으나 동물을 이용한 시험방법은 관리비용이나 인력, 시간등이 많이 소요되는 단점이 있다 최근 유럽을 중심으로 화장품의 안전성 평가시 동물실험을 금지하는 추세에 있고 인도적 차원에서 실험을 하는 동물대체시험, 동물사용감소, 시험방법증진 즉 3Rs 운동이 확산되는 추세여서 동물을 이용하지 않는 광독성 대체시험법 개발이 요구되고 있다(Annette 등, 1997). 광독성 대체시험방법으로는 3T3 NRU(neutral red uptake), *Candida albicans*를 이용한 방법, human keratinocyte,

human lymphocyte 이용방법, histidine oxidation test, photohemolysis and hemoglobin oxidation, SOLATEX PI(photoirritation) assay, SKIN² PI 등이 있는데, Balb/c 유래의 3T3 세포를 이용한 NRU 시험이 다른 시험방법보다 *in vivo* 시험과의 상관성이 높다고 하였다(Spielmann 등, 1995). 최근에는 3T3 NRU PT(phototoxicity test) 시험에 대하여 여러기관이 참여하는 validation 시험을 실시한 결과 *in vivo*와의 상관관계가 높고 validation 가능성이 있다고 하였다(Spielmann 등, 1998a, b). 한편 Lasarow 등(1992)는 chlorpromazine, tetracycline의 광독성 평가시 사람유래의 섬유아세포(fibroblast)를 이용하였고, Lee 등(1999a, 1999b)은 사람의 피부자극 대체시험방법으로 사람유래의 섬유아세포를 사용하는 것이 *in vivo*와의 상관관계가 높다고 하였으며 Chung 등(1998)은 시험관내 광독성

*To whom correspondence should be addressed

측정에 있어서 사람유래의 섬유아세포 이용시 MTT 시험법 보다는 NRU 시험법이 더 민감하다고 하였다. NRU 시험법은 살아있는 세포의 lysosome(endosome)으로 NR dye가 유입되는 양을 측정함으로써 세포생존율을 측정하는 방법이다(Borenfreund and Puerner, 1986). 따라서 기존에 주로 수행된 대체시험방법은 마우스 유래의 섬유아세포를 사용하였는데 사람의 광독성을 예측하는 측면에서는 사람 유래의 섬유아세포를 사용하는 것이 광독성예측으로 더 좋은 가능성이 있을 것으로 사료되어 본 연구에서는 사람 유래의 섬유아세포를 이용하고 NRU 시험을 사용하여 대체시험법의 가능성을 파악하고자 하였다. 본 연구에 사용된 시험물질은 광독성이 있다고 알려진 물질중 대표적인 6종(chlortetracycline, amiodarone, bithionol, neutral red, promethazine, 8-methoxypsoralen)을 선정하였고 음성대조군으로는 광독성을 유발하지 않는 ammonium laureth sulfate를 사용하였다. 자외선은 크게 UVA(320~400 nm), UVB(280~320 nm), UVC(<280 nm)로 분류하는데 자외선에 의해 피부의 홍반을 일으키는 원인은 주로 UVA에 의해 유발되는 것으로 알려져 있어(Spielmann 등, 1994b), 본 연구에서는 UVA를 사용하였으며 광량은 예비실험을 통하여 얻은 5 J/cm²으로 하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험에 사용한 chlortetracycline, amiodarone, bithionol, neutral red, promethazine, 8-methoxypsoralen는 Sigma(USA)에서 구입하였고 ALES(ammonium laureth sulfate)는 태평양화학(Korea)에서 구입하였으며 시험물질의 구조는 Fig. 1과 같다. 시험물질 중 ALES, chlortetracycline은 EBSS(Earle's balanced salts, Sigma, USA)에 용해하여 사용하였으며, 기타 다른물질은 EBSS에 잘 용해되지 않아서 1% 이하의 DMSO(dimethyl sulfoxide, (Sigma, USA))가 포함된 EBSS를 사용하였다. 그 외 다른 시약들은 표준시약 제조회사로부터 reagent grade급의 시약을 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

시험세포는 신생아의 포피(foreskin)에서 분리한 사람의 섬유아세포를 이용하였다. 사람의 포피조직을 잘게 자른 다음 배양접시에 넣고 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한후 collagenase(1 mg/ml)와 dispase(2 mg/ml) 용액을 넣어준 후 37°C에서 20분 배양시킨후 입체현미경하에서 진피(dermis)와 표피(epidermis)를 분리하였다. 분리된

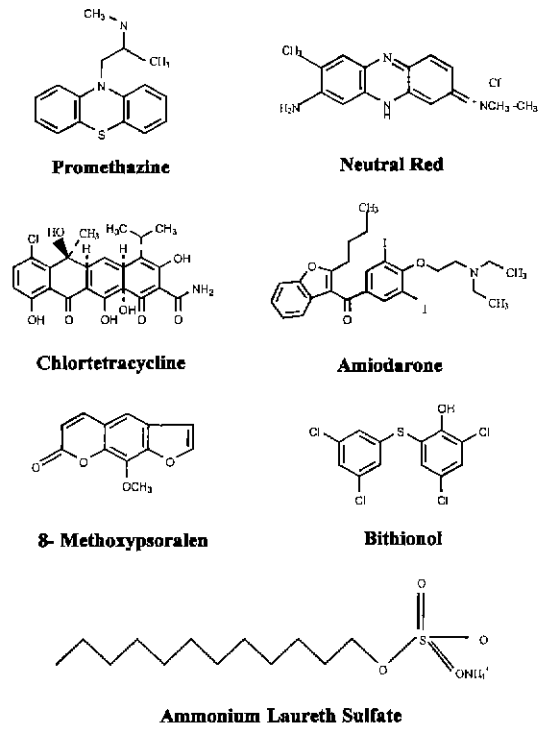


Fig. 1. Structure of the test chemicals.

진피를 칼로 세절한 다음 0.25% trypsin 용액에 넣어 30분간 배양하여 1500 rpm으로 10분간 원심분리하여 조직에서 유리된 세포를 모아 분리하였다. 분리된 섬유아세포를 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, 10% FBS (fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM에 1차배양한 다음 수차례 계대배양한(5-11 계대) 세포를 본 실험에 사용하였다(Lee 등, 1998; Lee 등, 1999a).

3. 자외선 조사

96 well microtiter plate에 각 well 마다 1×10⁴개의 섬유아세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 시험세포가 배양된 plate의 각 well의 배양액을 제거한 후 시험물질이 용해되어 있는 EBSS를 넣은 다음 37°C 조건에서 1시간 동안 시험물질에 노출시킨후 예비실험을 통하여 얻은 5 J/cm² 광도로 UVA를 조사한 다음 각 well의 시험물질을 제거하고 EBSS로 세척하여 overnight 배양을 하였다.

4. NRU(neutral red uptake) assay

Borenfreund와 Puerner(1985)의 방법을 변형하여 96 well pate에 각 well당 1×10⁴개의 섬유아세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 배양하였다. 배지를 교환한

다음 각 시험물질을 예비실험을 통하여 정해진 농도(0~1 mg/ml)로 1시간 노출 시킨후 UVA(5 J/cm²)를 조사하였다. UV 조사 후 EBSS를 제거한 다음 배양액을 다시 넣어서 약 24시간 배양한 다음 배양액을 제거하고 neutral red 200 μ를 각 well에 넣어 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 3시간 반응시킨후 제거하였다. Formal-calcium 용액(1% formalin과 1% CaCl₂)으로 세척한후 1% glacial acetic acid-50% ethanol 용액으로 10분간 추출한 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 O.D.를 측정하였다.

5. 광독성 유무의 판정

각 시험물질에 대하여 UVA를 조사한 경우와 UVA를 조사하지 않은 경우에 대한 세포독성을 측정하여 Prediction model(Spielmann 등, 1998a)로 제시된 PIF(photoirradiation factor)를 구하였다.

$$PIF = \frac{IC_{30}(UV-)}{IC_{50}(UV+)}$$

광독성의 판정은 Spielmann 등(1998a, b)의 보고에 따라 PIF가 5 이상인 경우를 광독성이 있다고 판정하였으며 UVA 비조사군에서 IC₅₀을 구할수 없고 UVA 조사시의 IC₅₀이 계산되었을 경우에는 Spielmann 등(1998a, b)의 보고에 따라 IC₃₀(UV-) 대신 C_{max}로 계산하여 PIF를 계산

하여 광독성 가능성이 있는 물질로 결정하였다.

6. 통계처리

세포의 성장을 50%(10%, 20%, 80%) 감소시키는 농도인 IC₅₀(IC₁₀, IC₂₀, IC₈₀) 값은 단순회귀방정식에 의하여 계산하였다(Litchfield & Wilcoxon, 1949).

III. 결 과

1. In vitro NRU assay 결과

Promethazine, amiodarone, bithionol, neutral red, chlortetracycline, 8-methoxypsoralen 등 6종의 광독성 유발물질과 1종(ammonium laureth sulfate)의 광독성이 유발되지 않는 시험물질을 사용하여 사람의 섬유아세포에 1시간 노출시킨 후 한쪽 plate는 UVA 5 J/cm²를 조사하고 다른쪽 plate는 암실에 두어 NRU assay를 실시하여 대조군과 비교하여 세포독성을 측정한 결과를 Tables 1, 2 및 Figs. 2, 3에 제시하였다.

2. Prediction model(PIF) 을 이용한 광독성 평가

Promethazine은 UV를 조사하였을 때의 IC₅₀가 0.085±

Table 1. *In vitro* cytotoxicities of the test substances with UV exposed for 1 hour by the Neutral red reduction method with human fibroblast cells, listed in order of IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ values^{a)} (μg/ml)

Chemicals	IC ₁₀	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀
Promethazine	0.0103±0.0004	0.0212±0.0008	0.0845±0.006	0.34±0.05
Neutral red	0.0005±0.00002	0.0019±0.00008	0.03±0.0008	0.40±0.01
Chlortetracycline	1.16±0.11	2.46±0.24	10.30±0.96	43.40±8.85
Amiodarone	2.40±0.24	4.67±0.49	16.40±1.34	57.90±5.04
8-MOP	0.14±0.056	0.42±0.02	3.40±0.28	27.40±3.20
Bithionol	0.24±0.017	0.41±0.03	1.12±0.05	3.05±0.21
ALES	14.84±0.019	21.59±3.20	44.17±6.10	90.38±7.68

Each value represents Mean±S.E.

^{a)}IC_{10,20,50,80} values are the concentrations producing 10(20, 50, 80)% inhibition of cell growth compared to the control (n = 6).

Table 2. *In vitro* cytotoxicities of the test substances without UV exposed for 1 hour by the Neutral red reduction method with human fibroblast cells, listed in order of IC₁₀, IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ values^{a)} (μg/ml)

Chemicals	IC ₁₀	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀
Promethazine	90.85±5.63	100.49±8.74	121.82±8.04	147.69±26.43
Neutral red	98.70±6.81	168.0±23.52	464.20±38.90	1282.80±87.2
Chlortetracycline	45.00±2.57	60.80±6.62	108.00±10.37	191.70±39.11
Amiodarone	-	-	-	-
8-MOP	-	-	-	-
Bithionol	0.47±0.03	0.88±0.10	2.95±0.26	9.83±2.40
ALES	23.29±1.39	29.31±2.96	45.49±4.00	70.58±9.74

- - not determined. Each value represents Mean±S.E.

^{a)}IC_{10,20,50,80} values are the concentrations producing 10(20, 50, 80)% inhibition of cell growth compared to the control (n = 6).

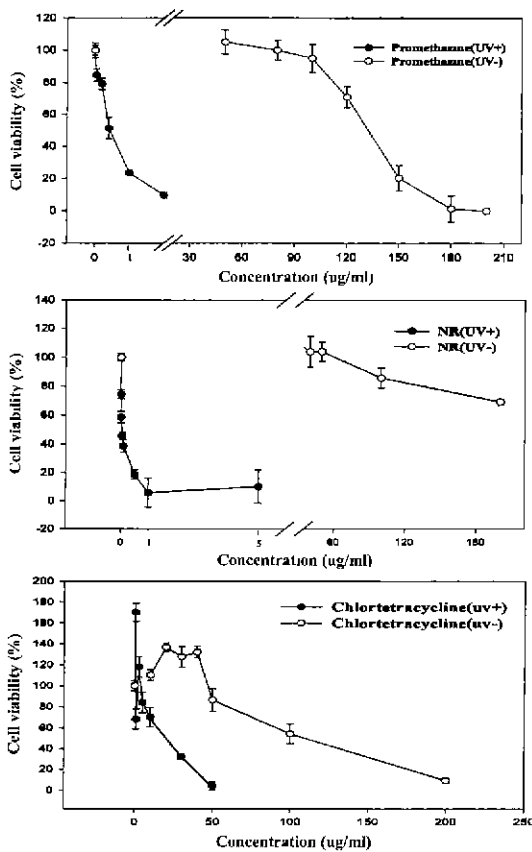


Fig. 2. *In vitro* cytotoxic effects of Promethazine, Neutral Red and Chlorpromazine for 1 hour exposure on cultured human fibroblasts using neutral red uptake assay.

0.006 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이고 조사하지 않았을때가 121.824 \pm 8.04 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 으로 PIF 값이 1.433이었다. Neutral red는 UV 조사시에 0.03 \pm 0.0008 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이고 비조사시에는 464.20 \pm 38.9 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 으로 PIF 값이 15,473을 보였으며 chlortetracycline의

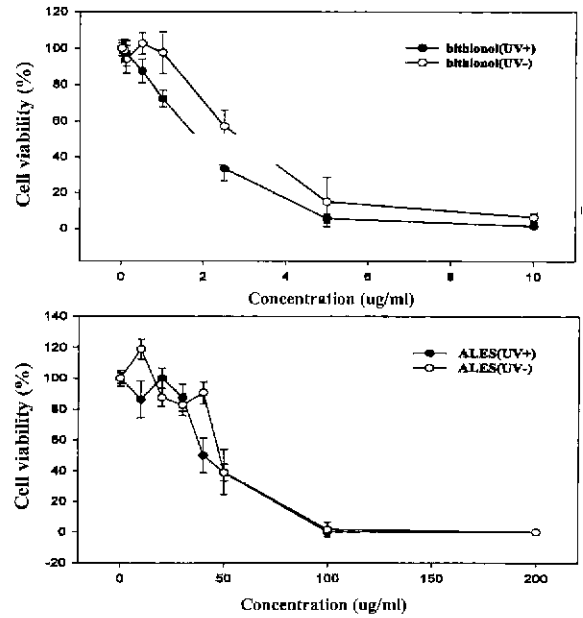


Fig. 3. *In vitro* cytotoxic effects of Bithionol and ALES for 1 hour exposure on cultured human fibroblasts using neutral red uptake assay.

경우에는 UV 조사시에 10.30 \pm 0.096 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이었고 UV 비조사시에는 108.00 \pm 10.37 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 으로 PIF 값이 10이었다. Amiodarone과 8-MOP는 UV 조사시에 IC₅₀이 16.40 \pm 1.34 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 3.40 \pm 0.28 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 으로 각각 나타났고 UV를 조사하지 않았을 때 IC₅₀ 값을 결정할 수 없어서 최고 용해농도인 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 으로 계산하면 각각 PIF 값이 30과 18로 나타났다. Bithionol의 경우는 UV 조사시에는 1.12 \pm 1.34 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 으로 나타났으며 UV 비조사시에는 2.95 \pm 0.26 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 로 나타나 PIF 값은 3을 보여 Prediction model의 5의 기준에는 미치지 못했다. 음성대조군으로 설정한 ALES에서는 UV 조사시에는 44.17 \pm 6.10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 비조사시에는

Table 3. *In vitro* alternatives to phototoxicity of chemicals in the human fibroblast cell by NRU cytotoxicity assay

Ch no	Chemicals	Phototoxicity data*		human fibroblast NRU cytotoxicity				
		in vivo animals	humans	Mean IC ₅₀ -UV ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Mean IC ₅₀ +UV ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	PIF -UV/+UV	n	result
1	Promethazine	+	+	121.824 \pm 8.04	0.085 \pm 0.006	1,433	6	+
2	Neutral red	+	+	464.20 \pm 38.9	0.03 \pm 0.0008	15,473	6	+
3	Chlortetracycline	+	+	108.00 \pm 10.37	10.30 \pm 0.096	10	6	+
4	Amiodarone	+	+	§	16.40 \pm 1.34	§	6	+
5	8-MOP	+	+	§	3.40 \pm 0.28	§	6	+
6	Bithionol	+/-	+	2.95 \pm 0.26	1.12 \pm 1.34	3	6	-
7	ALES	-	-	45.49 \pm 4.00	44.17 \pm 6.10	1	6	-

Each value represents Mean \pm S.E.

+: Phototoxicity positive.

-. Phototoxicity negative.

§: not determined.

*: Data collected from Spielmann *et al* (1994a, 1998b).

45.49±4.0 µg/m로 나타나 PIF 값은 1이었다. 이상의 결과를 Table 3에 나타내었다.

IV. 고 찰

본 실험은 화학물질의 광독성을 평가하는데 대체시험방법으로 사람유래의 섬유아세포를 이용하여 개발하고자 실시한 결과 1종의 광독성 비유발물질에 대하여는 음성으로 나타났고 6종의 광독성 물질에 대하여는 5종에서 광독성이 있는 것으로 나타나 사람유래의 섬유아세포를 이용한 *in vitro* 광독성 시험법은 *in vivo*와의 상관성이 높은 것으로 나타났다. 화학물질에 의해 광독성을 일으키는 기전은 일반적으로 다음과 같이 설명되고 있다(Spielmann 등, 1994a, b; Kim 등, 1999). 빛이 광독성 물질에 조사되면 여러물질과 반응성이 큰 triplet state로 전환되는데 세포내의 인접한 기질로부터 제공된 전자에 의하여 free radical이 형성됨으로써 세포에 손상을 주는 Type I과 반응성이 높은 singlet oxygen이 형성됨으로써 지질, 단백질, DNA 등의 세포내 물질을 산화시켜 세포손상을 주는 type II가 있다. *In vivo* 광독성 시험법은 1995년 OECD에서 광독성 시험 가이드라인을 제안하였는데 시험물질이 부식성이 있는 경우(예를 들어 pH 2 이하의 강산이거나 pH 11.5 이상의 강알칼리성인 경우)이거나 구조상 또는 물리화학적 성질상 피부자극이 큰 경우, 파장 310~420 nm에서 빛을 흡수하지 않는 경우는 동물의 복지 차원에서 *in vivo* 시험을 실시하지 않도록 권장하고 있다. 실험동물은 토끼(2.0~3.5 kg) 또는 기니픽(300~500 g) 3마리를 사용하여 광량은 UVA의 경우는 10 J/cm², UVB의 경우는 0.1 J/cm²로 하고 도포량은 0.025 ml로 하며 Draize법(1944)에 의하여 평가하고 UV 조사 30분 후, 4, 24, 48, 72시간째 관찰하여 평가하도록 되어 있다. *In vitro* 광독성 시험방법은 검색방법(screening)과 기전 평가(mechanism)로 연구되고 있는데 검색방법으로는 3T3 NRU PT assay, human keratinocytes, Hepatocytes, Candida yeast test, human lymphocytes, Jurkat human lymphoma cells, SOLATEX-PITM, SKIN^{2TM} PT assay 등이 있으며 기전평가로는 RBC hemolysis, Hemoglobin photooxidation, Histidine photooxidation, Photobinding to protein(HSA), Linoleic acid peroxidation, Complement PT assay등이 연구되고있다(Spielmann 등, 1994b; Spielmann 등 1999; Kim 등, 1999). 본 실험에서 설정한 광량은 3T3 NRU PT 시험시에도 적용되는 양과 같으며 예비실험으로 1~9 J/cm²로 노출시킨후 90% 이상의 세포성장을 나타낸 5J/cm²로 설정하여 실험하였다. *In vitro* 시험법 중 NRU를 이용한 시험방법의 Prediction model로는 UV 조사시와 UV 조사하지 않았을때의 IC₅₀ 값을 비교하는 PIF 값이 5 이상일 때 광독성물질로 분류

하며 용량반응곡선을 참조하는 MPE(mean photoeffect)를 적용할 때는 MPE 값이 0.1 이상일 때 광독성물질로 분류하는 것이 일반적이다(Okamoto 등, 1999; Spielmann 등, 1998a, b; Holzhutter 등, 1997). 본 시험에서는 7개의 실험물질중 6개의 *in vivo*상의 양성물질중에서 bithionol를 제외한 5개의 물질이 PIF 값이 5 이상인 양성으로 나타났으며 광독성을 유발시키지 않는 대조물질에서는 음성으로 관찰되었다. 따라서 기존의 마우스 유래의 3T3 세포를 이용한 실험결과와 유사하게 나타났지만 결과 해석상에 마우스 유래의 세포를 이용한 것보다는 사람유래의 세포를 이용한 것이 해석상 사람으로의 외삽과정에 의미가 있을 것으로 사료된다. Clothier 등(1999)은 사람의 keratinocyte를 이용하고 Prediction model로는 PIF 5 이상, MPE 0.1 이상으로하여 광독성 대체시험법의 가능성을 연구하였는데 28개의 *in vivo*에서의 광독성물질중 26개의 물질이 양성물질로 파악되었다고 하였는데 음성으로 나타난 것 중에 하나가 bithionol이라고 하였다. 본 시험에서 음성으로 나타난 bithionol의 경우에는 마우스유래의 3T3 세포를 이용한 광독성 시험계의 양성 결과와는(Spielmann 등, 1998b) 상이하게 나타났지만 Clothier 등(1999)이 보고한 사람유래의 keratinocyte를 이용한 NRU 모델에서 음성으로 나타난 결과와 일치하였다. Spielmann 등(1998b)은 3T3 NRU PT 시험에 대하여 30여개의 화학물질을 대상으로 11여개의 서로 다른 실험실간에 validation 연구를 실시하였는데 prediction model로 PIF는 88%의 정확성과 MPE는 92%의 정확성을 나타내었다고 한다. 따라서 향후에는 여러 실험실이 참여하고 prediction model도 MPE를 고려하는 광독성 시험대체시험법 개발을 실시하는 validation 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

“본 연구는 보건복지부 보건의료기술개발사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다(HMP-97-0-5-0033)”.

참고문헌

- Annette, J., Margot, D.O., Krysz, B., Barbara, G. and David, C.A. (1997): Current status and future developments of databases on alternative methods. *ATLA*, **25**, 411-422.
- Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1997): Toxicity determined *in vitro* by Morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.*, **24**, 119-124.
- Chung, S.T., Han, H.M., Kim, J.H., Kim, P.S., Kang, S.K., Kim, H.S. and Kim, J.I. (1998): Comparison of MTT assay with neutral red uptake assay in measuring

- phototoxicity *in vitro*. *J. Toxicol. Pub Health*, **14**(1), 33-39.
- Clothier, R., Willshaw, A., Cox, H., Garle, M., Bowler, H. and Combes, R. (1999): The use of human keratinocytes in the EU/COLIPA international *in vitro* phototoxicity test validation study and the ECVAM/COLIPA study on UV filter chemicals. *ATLA*, **27**, 247-259.
- Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. (1944): Methods for study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **83**, 377-390.
- Holzutter, 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**, 445-462.
- Kim, Y.O., Chung, H.J., Chung, S.T. and Cho, D.H. (1999): Alternative methods in phototoxicity. *J. Toxicol. Pub Health*, **15**(3), 263-273.
- Lasarow, R.M., Isseroff, R. and Gomez, E.C. (1992): Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay. *J. Invest Dermatol.*, **98**, 725-729.
- Lee, J.K., Kim, D.B., Lee, E.H., Lee, S.H., Choi, K.H., Kim, Y.J. and Kim, P.Y. (1998): *In vitro* skin irritation test of anti-inflammatory drugs. *J. Toxicol. Pub Health*, **14**(3), 315-320.
- Lee, J.K., Kim, D.B., Lee, E.H., Lee, H. and Kim, P.Y. (1999a): Comparison of cultured fibroblasts and HaCaT cells by Alamar Blue assay to predict skin irritation potential of surfactants. *J. Toxicol. Pub Health*, **15**(2), 163-167.
- Lee, J.K., Kim, D.B., Lee, E.H., Ryu, S.R., Kim, Y.J., An, S.S., Lee, B.M., Lee, Y.S. and Kim, P.Y. (1999b): *In vitro* skin irritation test of humectants with human skin fibroblasts. *J. Toxicol. Pub Health*, **15**(2), 177-181.
- Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949): A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99-113.
- OECD Guideline for testing of chemicals (1995): Draft proposal for a new guideline-Acute dermal photoirritation screening test.
- Okamoto, Y., Ryu, A. and Ohkoshi, K. (1999): *In vitro* alternatives and phototoxicity testing. I. Evaluation of *in vitro* phototoxicity assays. *ATLA*, **27**, 639-664.
- Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Doring, B., Holzutter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., Eplattener, H.L., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W.J.W., Pfannenbecker, U., Potthast, J.M., O. De. Silva O.D., Casto, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994a): EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic in vitro*, **8**(4), 793-796.
- Spielmann, H., Lovell, W.W., Holze, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapore, O. and Sladowski, D. (1994b): *In vitro* phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 2. *ATLA*, **22**, 314-348.
- Spielmann, H., Liebsch, M., Pape, W.J.W., Balls, M., Dupuis, J., Klecak, G., Lovell, W.W., Maurer, T., De Silva O. and Steiling, W. (1995): EEC/COLIPA *in vitro* photoirritancy program: Results of the first stage of validation. *Curr. Probl. Dermatol.*, **23**, 256-264.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., de Silva O., Holzutter, H., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W. and Pfannenbecker, U. (1998a): A study on UV filter chemicals from annex VII of European union directive 76/768/EEC. in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA*, **26**, 679-708.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G., De Silva O., Holzutter, H., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J.M., Casto, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998b): The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: Results of phase II (blind trial). Part I: The 3T3 NRU Phototoxicity. *Toxic in vitro*, **12**, 305-327.