



ZELLKULTURMETHODEN ZUR ABSCHÄTZUNG DER REIZWIRKUNG VON CHEMIKALIEN AUF HAUT- UND SCHLEIMHAUT

Ch. A. Reinhardt

Institut für Toxikologie, ETH und Uni Zürich, Schwerzenbach

ZUSAMMENFASSUNG

Bei starken akuten Reizwirkungen von Chemikalien auf Haut und Schleimhaut sind im Tierversuch und nach klinischen Beobachtungen schwere Zellschädigungen festzustellen. Solche zytotoxische Effekte können auch in Zellkulturen ausgelöst werden, was zur Ansicht geführt hat, dass die Routinetests an Versuchstieren (zur Abschätzung einer potentiellen Reizwirkung am Menschen) durch in vitro Alternativen ersetzt werden könnten.

Drei verschiedene Zytotoxizitätstests wurden evaluiert anhand von 55 Substanzen (anorg. & org. Metallsalze, Lösungsmittel, Detergentien, Reagenzien, Arzneimittel) welche sehr unterschiedliche toxische Wirkungsmechanismen aufweisen. Hamster Fibroblasten (BHK 21-C13) und zwei Zellstämme von Humanfibroblasten (Keller, MRC-5) wurden verwendet, um die drei Endpunkte "Zellablösung", "Wachstumshemmung" und "Klonbildung" zu untersuchen. Die Beziehung zwischen Daten aus dem ersten mit dem zweiten oder dritten Test war für jede Substanz charakteristisch und deutete auf deren Wirkungsmechanismus hin.

Die Substanzen wurden nach ihrer jeweiligen niedrigsten Wirkkonzentration geordnet. Die Rangordnung der Substanzen war bei allen drei Tests und bei allen drei Zelltypen sehr ähnlich, obwohl die Empfindlichkeit des Zellablösungstests bis drei Grössenordnungen niedriger als diejenige der zwei anderen Tests war.

Beim Vergleich dieser in vitro Resultate mit in vivo Daten aus der Literatur wurde eine bessere Korrelation für Arbeitsplatzbelastungswerte (TLV, $r=0.73$) als für LD₅₀-Werte (Ratte, oral, $r=0.52$) festgestellt. Korrelationen mit Daten aus Haut- und Schleimhaut-Reiztests nach Draize sind nicht sinnvoll, da diese in vivo Tests unter sehr variablen Testbedingungen durchgeführt werden.

Es ist jedoch möglich und sinnvoll, Substanzen aufgrund von Human-Erfahrungswerten aus der Medizin und der Arbeitsplatzbelastung bezüglich Haut- und Augenreizung in drei grobe Klassen einzuteilen (nicht reizend / schwach-mässig reizend / stark reizend oder korrosiv). Diese Klasseneinteilung ist auch mit den hier vorgestellten in vitro Tests möglich; bei richtiger Schrankensetzung ist die Übereinstimmung in mehr als 80% der Substanzen richtig. Innerhalb einzelner Substanzgruppen wie Organozinn- und Alkohole sind weitergehende Korrelationen möglich, welche zu Voraussagen möglicher in vivo Effekte dienen können.



EINLEITUNG

Die Interpretation von Zytotoxizitäts-Testdaten aus in vitro Zellkultur-Versuchen ist mit einer Reihe von bestens bekannten Schwierigkeiten verbunden, wenn eine Voraussagekraft für mögliche in vivo Effekte verlangt wird. Eine solche Voraussage ist aber nötig für Screening-Systeme jeder Art, speziell auch im Falle von Toxizitätstests, wie sie bisher mit Tierversuchen zur Voraussage von möglichen Schädigungen beim Menschen verwendet worden sind. Hier soll versucht werden, einen eingebürgerten Toxizitätstest an Versuchstieren mit in vitro Methoden durch geeignetes Vorsortieren von Testsubstanzen ("Prescreening") zu reduzieren und die Möglichkeiten zu dessen totalem Ersatz aufzuzeigen. Dabei ist zu beachten, dass die meisten toxikologischen Vorgänge erst in neuester Zeit langsam beginnen, verstanden zu werden und zwar hauptsächlich aufgrund von Tierversuchen.

Im Falle der Reizwirkungstests nach Draize et al. (1944), die v.a. an Kaninchenhaut und -augen durchgeführt werden, ist die Ausgangslage für erfolgreiche in vitro Alternativen noch speziell günstig, da die Testsubstanz in direktem Kontakt mit dem Zielgewebe steht, d.h. mit Cornea- und Conjunctiva-Zellen, bzw. via Hornhaut mit Epithelzellen und darunterliegenden Fibroblasten. Ausserdem werden die Draize-Tests stark kritisiert wegen ihrer mangelhaften Reproduzierbarkeit, welche zum Teil auf der individuell sehr unterschiedlichen Empfindlichkeit der Kaninchen beruht (Bosshard, 1985; Schlatter & Reinhardt, 1985).

Die Bestimmung der Zytotoxizität in vitro ist mittels vieler verschiedener Endpunkte und anhand unzähliger Zellsysteme beschrieben (Review in Stamatii et al., 1980, Bridges et al., 1983) und auch als mögliche Ersatzmethoden zu den Draizetests vorgeschlagen worden (siehe in Reinhardt et al., 1985 a). Ein brauchbarer in vitro Screeningversuch muss folgende Eigenschaften haben: Reproduzierbarkeit in unabhängigen Laboratorien, Anwendbarkeit für eine grosse Zahl von Testsubstanzen aus unterschiedlichsten chemischen Klassen, Quantifizierbarkeit. Screeningversuche dieser Art sind nicht gedacht als Beitrag zur Aufklärung von toxikologischen Vorgängen, sondern



als Testsystem zur Erkennung von allgemeinen biologischen Veränderungen, welche sofort oder kurz nach Kontakt mit Substanzen auftreten. Deshalb sind Endpunkte der Zytotoxizität zu verwenden, welche als Resultat unterschiedlichster chemischer Reaktionen auftreten können. Als solche Endpunkte können Zellmorphologie, Zellverhalten und Wachstumseigenschaften gelten.

Die Auswahl von Zelltyp und Kulturmethode sollte aus praktischen Gründen erfolgen, d.h. leicht reproduzierbar sein. Dies spricht für etablierte Methoden wie Fibroblasten-Zellkulturen in serumhaltigem Medium. Die Verwendung serumfreier Methoden (Fischer & Wieser, 1983) würde zwar die bekannte Serumvariabilität umgehen, aber dafür andere technische Schwierigkeiten bringen, welche nur mit grosser Erfahrung gemeistert werden können. Ausserdem wachsen die meisten Fibroblasten Zellstämme in den meisten Serumtypen, und deren Einfluss kann bei kurzzeitigen Tests z.B. durch Weglassen des Serums oder durch Ersatz mit Serumalbumin abgeschätzt werden.

Jeder erfolgreiche in vitro Test muss durch den langwierigen Prozess der Validierung gehen, d.h. in mehreren Laboratorien mittels vieler Testsubstanzen durchgespielt werden. Deshalb sind rasche Screening--Tests von Vorteil, welche in grosser Anzahl und wenn möglich automatisch durchgeführt werden können. Zwei der hier beschriebenen Versuchsanordnungen lassen all dies zu.

1. Im "Zellablösungstest" wird die Anzahl Zellen bestimmt, welche sich nach 4 h Inkubation mit Testsubstanz von der Zellkulturschale ablösen.
2. Im "Wachstumshemmungstest" werden nach 2 d logarithmischen Wachstums und Inkubation mit Testsubstanz die Zunahme bzw. Abnahme der Zellzahl bestimmt.

Der dritte Test, "Klonbildung", braucht mehr Zeit (6-7 d) und grössere Kulturschalen, wenn eine gute Reproduzierbarkeit mit Fibroblasten erreicht werden soll.



EINLEITUNG

Die Interpretation von Zytotoxizitäts-Testdaten aus in vitro Zellkultur-Versuchen ist mit einer Reihe von bestens bekannten Schwierigkeiten verbunden, wenn eine Voraussagekraft für mögliche in vivo Effekte verlangt wird. Eine solche Voraussage ist aber nötig für Screening-Systeme jeder Art, speziell auch im Falle von Toxizitätstests, wie sie bisher mit Tierversuchen zur Voraussage von möglichen Schädigungen beim Menschen verwendet worden sind. Hier soll versucht werden, einen eingebürgerten Toxizitätstest an Versuchstieren mit in vitro Methoden durch geeignetes Vorsortieren von Testsubstanzen ("Prescreening") zu reduzieren und die Möglichkeiten zu dessen totalem Ersatz aufzuzeigen. Dabei ist zu beachten, dass die meisten toxikologischen Vorgänge erst in neuester Zeit langsam beginnen, verstanden zu werden und zwar hauptsächlich aufgrund von Tierversuchen.

Im Falle der Reizwirkungstests nach Draize et al. (1944), die v.a. an Kaninchenhaut und -augen durchgeführt werden, ist die Ausgangslage für erfolgreiche in vitro Alternativen noch speziell günstig, da die Testsubstanz in direktem Kontakt mit dem Zielgewebe steht, d.h. mit Cornea- und Conjunctiva-Zellen, bzw. via Hornhaut mit Epithelzellen und darunterliegenden Fibroblasten. Ausserdem werden die Draize-Tests stark kritisiert wegen ihrer mangelhaften Reproduzierbarkeit, welche zum Teil auf der individuell sehr unterschiedlichen Empfindlichkeit der Kaninchen beruht (Bosshard, 1985; Schlatter & Reinhardt, 1985).

Die Bestimmung der Zytotoxizität in vitro ist mittels vieler verschiedener Endpunkte und anhand unzähliger Zellsysteme beschrieben (Review in Stamatii et al., 1980, Bridges et al., 1983) und auch als mögliche Ersatzmethoden zu den Draizetests vorgeschlagen worden (siehe in Reinhardt et al., 1985 a). Ein brauchbarer in vitro Screeningversuch muss folgende Eigenschaften haben: Reproduzierbarkeit in unabhängigen Laboratorien, Anwendbarkeit für eine grosse Zahl von Testsubstanzen aus unterschiedlichsten chemischen Klassen, Quantifizierbarkeit. Screeningversuche dieser Art sind nicht gedacht als Beitrag zur Aufklärung von toxikologischen Vorgängen, sondern



EXPERIMENTELLES

Details über die verwendeten Methoden und Endpunktmessungen können in Publikationen in Fachzeitschriften eingesehen werden und sollen hier nur kurz zusammengefasst werden (Reinhardt et al., 1982, 1984, 1985 b). Hamster Fibroblasten (Baby Hamster Kidney cells, BHK 21-Cl3) wurden in Standardmedium (MEM) mit 10% Kälberserum (Normal O₂) gezüchtet und getestet. Humane, diploide Fibroblasten stammten aus einer Hautbiopsie (Keller, 10.-15. Passage) aus dem Universitätsspital Zürich (Dr. B. Steinmann) sowie aus einer kommerziellen Zellbank (MRC-5, 40.-45. Passage; BioMérieux, Genf) und wurden in reichem Standardmedium (DMEM) mit Serum unter reduziertem Sauerstoff (5 %) gezüchtet und getestet.

Für den Zellablöschungstest (Cell Detachment: CD_{low}) wurden normal auf der Petrischale angehaftete Zellen (5'000/cm²) für 4 h einer Verdünnungsreihe der Testsubstanz im Medium ausgesetzt und darauf alle sich ins Medium abgelöste Zellen mit einem elektronischen Partikelzähler (Coulter Counter) gezählt. 24-er Zellkulturplatten wurden verwendet, und die darin anhaften gebliebenen Zellen konnten als Dokument fixiert und gefärbt werden. Für den Wachstumshemmungstest (Growth Inhibition: GI_{low}) wurden 2'000 Zellen/cm² ausplattiert und für 2 d mit Testsubstanz inkubiert. Dann wurden alle Zellen mit Trypsin von der Kulturschale genommen und wie oben gezählt. Für den Klonbildungstest (Cloning Efficiency: CE_{low}) wurden nur 50 Zellen/cm² ausplattiert und nach 6-7 d Inkubation mit Testsubstanz das Wachstum anhand der Anzahl gebildeten Klone (>20 Zellen, gefärbt von Auge sichtbar) gezählt.

Die Daten wurden in einem PDP-11 Computer weiterverarbeitet, wobei als kritische Grösse die niedrigste, effektive Konzentration der Testsubstanz bestimmt wurde, welche noch ein signifikant verschiedenes Resultat im Vergleich mit der Kontrolle (Inkubation mit eventuell nötigem Lösungsmittel) zeigte. Als Signifikanzgrenzen (95 %) wurde der sogenannte graphische t-Test verwendet, welcher aus dem t-Test nach Student entwickelt wurde (Elsner & Knutti, 1981).



RESULTATE UND DISKUSSION

1. Zellablöschungstest mit BHK Zellen

Die 55 getesteten Chemikalien in Tabelle 1 zeigten effektive Konzentrationsbereiche verteilt über 6 Größenordnungen, bestimmt als niedrigste, signifikant wirksame Konzentration im Kulturmedium (CD_{low}). Da die CD_{low} -Werte höchstens auf eine halbe Größenordnung genau bestimmt wurden (= der kleinste Verdünnungsschritt beim Testansatz) scheint eine präzise Analyse der Rangfolge sinnlos. Deshalb wurden die 55 Testchemikalien in drei Gruppen eingeteilt (mit den in Tabelle 2 aufgeführten Schranken), was sich auch für den Vergleich mit in vivo Daten als sinnvoll erwies.

Die präzise Rangfolge kann jedoch sinnvoll sein, wenn nur innerhalb einer Klasse Substanzen mit einheitlichem Wirkungsmechanismus verglichen werden soll. Dies kann am Beispiel der Organozinn-, sowie der Gruppe der Alkohole gezeigt werden. In Ergänzung zu unserer früheren Arbeit (Reinhardt et al., 1982) unterscheiden sich die stark zytotoxischen Di- und Tributylzinnsalze deutlich von anderen Trialkylsalzen, sowie von Tetraalkylsalzen, was mit den für den Menschen bekannten Reizpotentialen an Haut und Schleimhaut ebenfalls korreliert. Auch die 10 getesteten Alkohole reihen sich in vitro ähnlich ein wie in vivo, mit Ausnahme von Xylol, welches relativ zu Allylalkohol im in vitro Versuch zu stark anspricht.

2. Vergleich der drei Zytotoxizitätstests anhand von BHK Zellen

Die Rangordnung der Substanzen war im allgemeinen bei allen drei Tests sehr ähnlich, obwohl die Empfindlichkeit des Zellablöschungstests bis drei Größenordnungen tiefer lag als bei den zwei andern Tests (Tabelle 1). Abweichungen von dieser Regel beruhen darauf, dass bestimmte Substanzen im einen Test kaum oder dann speziell stark ansprechen. Einerseits sind es diejenigen Substanzen, welche im Wachstumshemmungstest (GI_{low}), bzw. im Klonbildungstest (CE_{low}) relativ zum Zellablöschungstest (CD_{low}) schwach ansprechen, d.h. einen kleinen Unterschied ($<10 \times$) zwischen CD_{low} und GI_{low} (oder CE_{low}) zeigen, wie im Falle von Ethanolamin,



Capsaicin, Bardac-22 und Dibutylzinchlorid. All diese Substanzen sind bekannt für ihr starkes Reizpotential. Dies deutet darauf hin, dass eine spezifische Schädigung des Zellwachstums nicht eine Voraussetzung für eine Reizwirkung sein muss.

Andererseits fällt eine Gruppe von Substanzen auf, welche in den Wachstumstest (GI_{low} oder CE_{low}) stark ansprechen im Vergleich zum Zellablösungstest, d.h. einen grossen Unterschied ($>100 \times$) zwischen CD_{low} und GI_{low} (oder CE_{low}), wie im Falle von Kaliumdichromat, Quecksilberchlorid und dem T-2 Mycotoxin. Diese Substanzen hemmten ganz speziell das Zellwachstum und sind in ihrem Irritationspotential als extrem stark und schwer corrosiv einzustufen.

Für Chemikalien mit schlechter Löslichkeit im wässrigen Kulturmedium konnten Konzentrationsangaben natürlich nur bis zum Sättigungspunkt gemacht werden. Dies betrifft vorallem einige Werte für CD_{low} . Für die Rangordnung in Tabelle 1 konnte aber meist der Wert aus einem der empfindlicheren Wachstumstest verwendet werden. Der Wachstumshemmungstest (GI_{low}) war reproduzierbarer als der Klonbildungstest, was vorallem darauf beruht, dass die verwendeten Fibroblasten in den kleinen 24-er Kulturschalen zuwenig Zeit und Platz hatten, gut zählbare Klone auszubilden.

3. Vergleich der drei verschiedenen Zelltypen

Vierzehn Substanzen wurden mit den drei verschiedenen Fibroblasten-Zellstämmen (BHK, Keller, MRC-5) im Zellablösungstest sowie im Wachstumshemmungstest geprüft (Tabelle 3). Die Rangordnung war für alle Zelltypen gleich in beiden Tests mit Ausnahme der Salze von Cadmium, Quecksilber und Chrom. Im Falle von Cadmium und Quecksilber waren die BHK-Zellen $1000 \times$ empfindlicher im Wachstumshemmungstest als die zwei Humanfibroblasten, was mit der mindestens doppelt so raschen Wachstumsrate der BHK-Zellen erklärt werden könnte (Reinhardt et al., 1984). Warum die Humanfibroblasten aber im Zellablösungstest auf Kaliumdichromat viel empfindlicher sind als die BHK-Zellen, müsste noch näher abgeklärt werden. Zwischen den beiden Humanfibroblasten-Stämmen, den Keller-Zellen mit niedriger Passagenzahl und den MRC-5-Zellen mit hoher Passagenzahl wurde kein nennenswerter Unterschied in der Testempfindlichkeit gefunden.



4. Vergleich der in vitro Daten mit in vivo Daten

Die obige Analyse und Interpretation der in vitro Daten ist eine wichtige Voraussetzung für deren Verwendung zur Voraussage von möglichen Effekten beim Menschen. Dabei ist es besonders wichtig, Angaben aus dem menschlichen Erfahrungsbereich zum Vergleich und zur Eichung der in vitro Daten heranzuziehen, soweit diese überhaupt existieren. Aus der Literatur greifbare Daten von kontroversen Tierversuchen, wie dem LD₅₀-Test oder den Draize-Tests sollten weniger verwendet werden, auch wenn deren absolute Zahlenwerte eine genauere Einstufung von Chemikalien und eine bessere Eichung der in vitro Tests erlauben würden. Es wäre sicher in Frage zu stellen, ob eine solche Genauigkeit eine gute Voraussetzung für eine Risikoabschätzung beim Menschen bilden würde.

Als Beispiel dazu mag die Zusammenstellen in Tabelle 4 dienen, wo die Korrelationskoeffizienten zwischen den Resultaten aus den in vitro Tests mit den LD₅₀ Werten aus der Literatur verglichen sind. Dabei wird klar, dass die Korrelationen ($r = 0.36 - 0.52$) sehr schlecht sind mit Ausnahme von zwei i.p. Werten, welche aber auf einer zu kleinen Stichprobenzahl beruhen. Der Vergleich unserer in vitro Daten mit Literaturwerten aus den Draize-Tests (RTECS 1981-82) wurde nicht durchgeführt, weil zu grosse Unterschiede in den Testprotokollen eine vernünftige Analyse verunmöglichen. Wenn ein einheitliches Protokoll zur Erarbeitung dieser Daten befolgt würde, könnten parallel dazu entsprechende in vitro Versuche durchgeführt und auch korreliert werden, wie dies u.a. von Scaife (1982, 1985) und North-Root et al. (1982, 1985) in Industriebetrieben gezeigt worden ist. Das Problem der Interpolation von der Situation beim Kaninchen auf diejenige des Menschen bleibt jedoch bestehen.

Deshalb scheint uns ein direkter Vergleich mit Daten aus dem Erfahrungsbereich des Menschen am günstigsten für unsere Zwecke. In Tabelle 4 sind Korrelationskoeffizienten zwischen unseren in vitro Werten und den entsprechenden, erhältlichen TLV-Werten ("Threshold Limit Values", 1981) aufgeführt. TLV-Werte sind Grenzwertangaben über Arbeitsplatzbelastungen des Menschen und beruhen auf langjähriger Erfahrung mit Arbeitern mit akuter und kontinuierlicher Exposition, unter Berücksichtigung der Haut- und Schleimhaut--



Reizwirkung. Die Korrelationkoeffizienten sind erstaunlich hoch und sicher viel besser als diejenigen bei den LD₅₀-Werten. Die TLV-Werte basieren u.a. auf dem Reizwirkungspotential der eingestuften Industrie-Chemikalien. Deshalb kann argumentiert werden, dass eine gute Korrelation mit einem in vitro Test auf eine brauchbare Simulierung der potentiellen Reizwirkung am Menschen hinweist. Eine solche mögliche Voraussagekraft sollte doch ausgenutzt werden.

Ausserdem versuchten wir, die spärlich erhältlichen Daten über Haut- und Schleimhautreizung direkt am Menschen, wie in Tabelle 1 aufgeführt, zum Vergleich mit unseren in vitro Daten heranzuziehen. Obwohl diese Daten nicht so einfach zu korrelieren sind wie etwa die TLV-Werte, ist doch eine Klassierung in drei Gruppen möglich. Die Klassierung unserer in vitro Daten wurde aufgrund der Grenzwertschranken in Tabelle 2 durchgeführt. Von den 30 Substanzen, welche in vitro und beim Menschen klassierbar waren, sind doch 25 in die gleiche Klasse (nicht reizend /schwach oder mittel / stark reizend oder korrosiv) eingeteilt worden. Zu den Ausnahmen (mit ** bezeichnet, Tabelle 1) muss folgendes gesagt werden. Zinksulfat liegt an der Grenze zur mittleren Klasse und gehört, vermutlich mit Tetramethylzinn, Propanolol und Zinnchlorid in diese schwächere Klasse. Natriumhydroxid wurde in vitro unterschätzt, vermutlich aufgrund der höheren Pufferkapazität des Zellkulturmediums verglichen zur Tränenflüssigkeit. NaOH würde jedoch auch wegen seines hohen pH in wässriger Lösung als potentiell korrosiv wirkende Substanz entlarvt. Allylalkohol wurde auch unterschätzt, ist aber im Vergleich zu den anderen Alkoholen (mit Ausnahme von Xylol) richtigerweise als toxischer, bzw. mit höherem potentieller Reizwirkung eingestuft worden. Für Allylalkohol, sowohl als auch für 1-Pentanol fehlen zudem noch Daten über Wachstumshemmung. Diese Diskrepanzen zur in vivo Situation zeigen deutlich, dass ein einziger in vitro Test sicher ungenügend ist für eine sichere Risikoabschätzung beim Menschen.



SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die verwendeten Endpunkte klassierten die meisten Testsubstanzen in vitro in derselben Rangordnung, wobei auch die Empfindlichkeit der verwendeten Zelltypen (etablierte Hamsterfibroblasten oder menschliche Hautfibroblasten) sehr ähnliche war. Bei dieser in vitro Zytotoxizitätsbestimmung werden grundlegende Zellschädigungen festgestellt, welche vermutlich für die meisten Zelltypen identisch sind.

Die hohe Übereinstimmung zwischen der Einstufung in drei Klassen der Reizwirkung beim Menschen mit drei Klassen unserer in vitro Daten, sowie die hohe Korrelation mit den TLV-Werten ist sicher ermutigend für eine Voraussagekraft dieser Methoden, besonders weil hier sehr unterschiedliche Substanztypen inbegriffen sind. Zukünftig müssen aber noch weitere in vitro Daten erarbeitet werden, um genauere Schrankenwerte für die Klassierung zu erhalten.

(Diese Arbeit wurde vom "Schweizer Tierschutz" (Basel) und vom "Fonds für versuchstierfreie Forschung" (Zürich) namhaft unterstützt.)



LITERATUR

- Bosshard, E. (1985). Review on skin and mucous membranes irritation tests and their application. Fd. Chem. Toxic. (in press).
- Bridges, J.W., Benford, D.J. & Hubbard, S.A. (1983). Mechanisms of toxic injury. Ann. N.Y. Acad. Sci. 407, 42-63.
- Browning, E. (1953). Toxic solvents. 1st Ed. Edward Arnold & Co., London.
- Draize, J.H., Woodward, G. & Calvery, H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucuous membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 82/83 , 377-390.
- Elsner, J. and Knutti, R. (1981). Graphical representation of the time evolution of ECG data using a computer data storage and plot package. In: The rat electrocardiogram in pharmacology and toxicology (R. Budden, D.K. Detweiler & G. Zbinden, eds.) Pergamon Press, pp. 161-170.
- Fischer, C. & Wieser R.J. (1983, eds.). Hormonally defined media: a tool in cell biology. Springer Verl., Berlin, 455 pp.
- Merck Index (1983). An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 10th Ed., Merck & Co., Rahway, New York.
- North-Root, H.; Yackovich, F., Demetrulias, J.; Gacula Jr., M. & Heinze, J.E. (1982). Evaluation of an in vitro cell toxicity test using rappid corneal cells to predict the eye irritation potential of surfactants. Toxicol. Lett. 14, 207-212.
- North-Root, H., Yackovich, F., Demetrulias, J., Gacula, M. & Heinze, J.E. (1985). Predicting of the eye irritation potential of shampoos using the in vitro SIRC cell toxicity test. Food Chem. Toxicol. (in press).
- Reinhardt, C.A., Schawalder, H.P. & Zbinden, G. (1982). Cell detachment and cloning efficiency as parameters for cytotoxicity. Toxicology 25, 47-53.
- Reinhardt, C.A., Pelli, D.A. & Sandvold, M. (1984). Cell detachment and growth of fibroblasts as parameters for cytotoxicity of inorganic metal salts in vitro. Cell Biol. Toxicol. 1 (2) (in press).
- Reinhardt, C.A., Bosshard, E. & Schlatter, C. (1985 a). Irritation testing of skin and mucous membranes. Workshop Proceedings eds. Food Chem. Toxicol. (in press).
- Reinhardt, C.A., Pelli, D.A. & Zbinden, G. (1985 b). Interpretation of cell toxicity data for an estimation of the irritation potential. Food Chem. Toxicol. (in press).



RTECS (1981-82). Registry of toxic effects of chemical substances. R.L. Tathen & R.J. Lewis, eds. NIOSH, Cincinnati (June 1983).

Schlatter, C. & Reinhardt, C.A. (1985). Value of acute irritation tests for risk assessment. Food Chem. Toxicol. (in press).

Stammati, A.P., Silano V. & Zucco, F. (1981). Toxicology investigations with cell culture systems. Toxicology 20, 91-153.

Scaife, M.C. (1982). An investigation of detergent action on cells in vitro and possible correlations with in vivo data. Int. J. Cosmet. Sci. 4, 179-193.

Scaife, M.C. (1985). The applicability of an in vitro cytotoxicity test used to predict the possible ocular irritation potential of detergents and detergent products. Food Chem Toxicol. (in press).

TLV/TWA (1981). Threshold limit values for chemical substances in workroom air. Am. Conf. Governm. Ind. Hyg. Cincinnati, 53 pp.



Tabelle 1 Vergleich der in vitro Zytotoxizitäts-Daten (BHK Zellen) mit in vivo Daten über das Reizpotential von Substanzen am Menschen

<u>IN VITRO ZYTOTOXIZITÄTS-DATEN</u>				<u>IN VIVO DATEN</u>
<u>Cell Detachment</u>	<u>Cloning Efficiency</u>	<u>Growth Inhibition</u>		<u>Reizpotential am Mensch(Ref. 1, oder wie angegeben)</u>
<u>CD_{low} in mM</u>	<u>CE_{low} in mM</u>	<u>GI_{low} in mM</u>		
<u>Substances with low cell toxicity potential</u>				
Methanol	1230*	-	-	no irritant
Alcohol	850*	-	-	no irritant
1,2-Propylene glycol	680*	-	-	no irritant
Acetone	675-1350*	-	-	slight irritant after prolonged use
Glutathione	>500	50	-	?
L-Methionine	>500	10	-	?
L-Cysteine HCl	>500	10	-	?
<u>Substances with mild to moderate cell toxicity potential</u>				
Dimethylsulfoxide	140-280*	-	-	slight skin irritant
iso-Propyl alcohol	130-260*	-	-	mild eye irritant ³
n-Butyl alcohol	109-217*	-	-	eye irritant ³
iso-Butyl alcohol	108-216*	-	-	mild skin irritant ³
Phenol	106*	-	-	slightly caustic ³
1,3-Propylene glycol	69*	-	-	mild to moderate skin irritant ²
Polyethylene glycol	57-144*	-	-	mild irritant
1-Pentanol	46**	-	-	strong eye irritant ³
Calcium chloride	32-100	-	-	?
Sodium hydroxide	32**	-	-	corrosive
Caffeine	20	-	2	?
Toluol	18.7	-	-	skin irritant ³
Ethanolamine	16.5**	-	3.2	strong eye irritant ³
Cyclophosphamide	10	10	-	?
EDTA	10	-	-	?
Allyl alcohol	7.25-15**	-	-	severe irritant ³
Propylene oxide	7	-	-	?
Aluminium Cl ₃	>5	0.32	0.1-1	?
Aluminium OH ₃ gel	>5	0.32	0.1	?
p-XyloI	4 (0.5h)*	-	-	irritant ³
Carbon tetrachloride	3.2-10*	3.2	-	irritant ³
Practolol	>1	-	1	?
Tween 20	320 ppm	-	32 ppm	?
Acetaminophen	>1	>1	-	?
Formaldehyde	1.44*	-	0.05 (3 d)	moderate irritant



Tabelle 1 (Forts.)

Substances with strong cell toxicity potential

Tetramethyltin	1	0.1	-	?
Zinc sulfate	1**	-	0.1	irritant
Propranolol	1	-	0.1	?
Stannous chloride	>1	0.05-0.3	0.01	?
Trimethyltinchloride	1	0.0001	-	?
Potassium dichromate	1*	0.0001	0.001	corrosive
Chlorphentermine	0.87	-	-	?
Sodium laurylsulfate	0.7(1h)*	-	-	strong irritant
Capsaicin	0.38*	-	0.2	strong irritant
Dodecyl-methyl-amine	0.26*	-	0.0026	strong irritant
Bardac-22	0.25*	-	0.25	strong irritant
Dimethyl sulfate	0.1-0.2*	-	-	causes severe necrosis
Benzo(a)pyrene	0.1	0.1	-	?
Tetraphenyltin	>0.01	0.01	-	?
Tetraethyltin	0.1	0.1	0.01	?
Aldrin	0.1	0.04	-	?
Dieldrin	0.1	0.01-0.1	-	?
Triethyltin chloride	0.1	0.01	-	?
Cadmium chloride	0.1	-	0.0001	?
			-0.001	
Tetrabutyltin	0.05	0.01	-	?
Mercuric chloride	0.01-0.1*	0.00001	0.0001	strong corrosive
		-0.0001	-0.0003	
Dibutyltin chloride	0.001*	0.001	-	strong irritant
Tributyltin chloride	0.001-0.01*	0.001-0.003	0.0001	strong irritant
Diacetoxyscirpenol	-	-	0.00001*	strong corrosive
T-2 fusarium toxin	0.001*	-	0.000006	strong corrosive

Ref. 1 : Merck (1983)

Ref. 2 : RTECS (1981-82)

Ref. 3 : Browning (1953)

In vitro classification according to the thresholds in table 2.

* in vitro and in vivo classification corresponds.

** in vitro and in vivo classification does not correspond.

- not done



Tabelle 2 Grenzwerte für die Schrankensetzung zur Zytotoxizitätsklassierung in vitro (siehe Tabelle 1)

<u>Cell toxicity</u>	<u>CD_{low}</u>	<u>GI_{low} (or CE_{low})</u>
class I (low)	> 500 mM	> 10 mM
class II (mild to moderate)	>1 - 500 mM	0.1 - 10 mM
class III (strong)	< 1 mM	< 0.1 mM

Tabelle 3 Zytotoxizität von 14 Substanzen auf drei verschiedene Fibroblasten- Zelltypen: Hamster (etablierte Zelllinie, BHK), menschliche Fibroblasten (Keller = frühe und MRC-5 = späte Passagezahl)

<u>CELL TYPES:</u>	<u>Cell Detachment</u>			<u>Growth</u>		
	CD _{low} in mM			GI _{low} in mM		
	BHK	Keller	MRC-5	BHK	Keller	MRC-5
Tween 20 (in ppm)	320	1000	1000	32	1000	1000
Ethanolamine	17	17	33	3.2	1	3.2
Propylene oxide	7-28	14	14	7	7	3
Aluminium Cl ₃	>5	>10	>10	0.1-1	3.2	3.2
Aluminium OH ₃ gel	>5	-	-	0.1	>1	>1
Formaldehyde	1.4	1.4	1.4	0.005	0.001	0.01
Zinc sulfate	1	1	0.1	0.1	1	1
Stannous chloride	>1	3.2	1	0.01	0.1	0.1
Potassium dichromate	1	0.03	0.03	0.001	0.001	0.001
Cadmium chloride	0.1	0.1	1	0.0001	0.1	0.1
Bardac 22	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Docecyl methyl amine	0.03-0.3	0.26	0.26	0.0026	0.026	0.026
Mercuric chloride	0.01-0.1	0.1	0.1	0.0001	0.1	0.1
Tributyltin chloride	0.001	0.03	0.03	0.0001	0.0001	0.001



Tabelle 4 Korrelationskoeffizienten zwischen Zytotoxizitätsdaten (links) und in vivo Daten (oben). Die Stichprobengröße ist jeweils in Klammern angegeben.

Parameter	LD ₅₀ rat oral	i.p.	TLV/TWA	Reizwirkungspotential am Menschen (3 Klassen)
<u>CD</u> _{low}	0.52 (40)	0.46 (22)	0.73 (30)	25 von 30 (83 %) (based on <u>CD</u> _{low} and <u>GI</u> _{low} values as indicated by * and ** in table 2)
<u>CE</u> _{low}	0.48 (15)	0.99 (5)	0.99 (15)	
<u>GI</u> _{low}	0.36 (14)	0.97 (5)	0.92 (10)	