

Zum Stand des von der OECD akzeptierten europäisch-amerikanischen Validierungskonzeptes und der Validierung einzelner *in vitro* Methoden

Horst Spielmann¹ und Christoph Reinhardt²

¹ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) im BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin), D-Berlin,

²SAAT (Schweizer Arbeitsgruppe für Alternativen zu Tierversuchen), CH-Zürich

Zusammenfassung

In Europa wurde seit 1990 ein Konzept zur wissenschaftlichen Validierung von toxikologischen *in vitro* Methoden entwickelt, um eine internationale behördliche Akzeptierung der neuen Methoden zu erreichen. An der Entwicklung des Konzeptes waren auf zwei Workshops in den Jahren 1990 und 1994 ERGATT und ECVAM maßgeblich beteiligt. Um *in vitro* Tests besser zu standardisieren, wird in Zukunft der Validierung eine Phase der experimentellen Prävalidierung vorgeschaltet. In den Jahren 1995/96 haben die US-amerikanischen Bundesbehörden, vertreten durch ICCVAM, das amerikanische Validierungszentrum, im Rahmen des NTP ein eigenes Validierungskonzept verabschiedet, das in den wesentlichen Punkten dem europäischen Validierungskonzept von ECVAM entspricht. Im Januar 1996 stimmten dann alle wesentlichen Industrienationen auf einem Validierungs-Workshop der OECD in Schweden dem europäisch-amerikanischen Validierungskonzept zu, das international zur behördlichen Anerkennung toxikologischer *in vitro* Methoden führen soll, anstelle der bisher von der OECD vorgeschriebenen Tierversuche. Im Jahre 1996 wird nach diesem Konzept wahrscheinlich schon der erste *in vitro* Test von der OECD akzeptiert, nämlich die Prüfung auf Penetration der Haut mit Hilfe menschlicher Haut aus Operationsmaterial. Auf dem Gebiet der lokalen Toxizitätsprüfung an Haut und Schleimhäuten ist kurzfristig mit der Akzeptierung weiterer toxikologischer *in vitro* Tests durch die OECD zu rechnen, da ihre experimentelle Validierung nach den Kriterien der OECD 1997/98 abgeschlossen sein wird.

Summary: OECD is accepting test guidelines for validated *in vitro* toxicity tests in 1996.

Since 1990 in Europe a scientific concept for the validation of *in vitro* toxicity tests has been developed to facilitate regulatory acceptance of the new methods at the international level. ERGATT and ECVAM have promoted the concept of validation on two workshops in 1990 and 1994. A prevalidation stage is an essential part of this validation concept to achieve a better standardisation of *in vitro* tests

before entering formal validation. Within the NTP in 1995/96 Federal Agencies of the USA represented by the validation center ICCVAM have accepted a validation concept, which basically agrees with the essentials of ECVAM's European validation concept. Subsequently, in January of 1996 the major industrial nations have at the OECD level agreed to the European/US validation concept. This will at the international level allow mutual acceptance of data obtained with *in vitro* toxicity tests rather than with animal tests. It seems very likely that in 1996 *in vitro* testing for skin penetration with human skin will be the first *in vitro* toxicity test accepted by the OECD. Several *in vitro* tests for local irritancy testing will follow in 1997/98, since they are currently undergoing validation according to OECD criteria.

Keywords: alternative test, *in vitro* toxicology, validation, OECD, regulatory acceptance

Abkürzungen: BCOP = Bovine Cornea Opacity/Permeability (test); BMBF = Bundesministerium für Bildung, Forschung und Technologie; CAAT = The Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Testing (Baltimore); COLIPA = The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association; CPSC = US Consumer Product Safety Commission; DG = Direction Générale (EU-Ministerium); DOE = US Department of Energy; DOT = US Department of Transportation; ECVAM = European Center for the Validation of Alternative Methods; EEC = European Economic Council; EPA = US Environmental Protection Agency; ERGATT = European Research Group for Alternatives in Toxicology Testing; FDA = US Food and Drug Administration; ICCVAM = US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods; NCI = US National Cancer Institute/NIH; NIH = US National Institutes of Health; NTP = US National Toxicology Program; OECD = Organisation for Economic Cooperation and Development; OSHA = US Occupational Safety and Health Administration; QSAR = Quantitative Structure-Activity Relationships; SCC = Scientific Committee on Cosmetology der DG XXIV der EU

1 Einleitung

Tierversuche für behördliche Zwecke werden auf internationaler Ebene akzeptiert, wenn sie nach den seit 1982 gültigen OECD Richtlinien (OECD, 1982) durchgeführt werden. Das gilt für alle Bereiche der behördlichen Toxikologie mit Ausnahme der Prüfung von Arzneimitteln, also z.B. für die toxikologische Prüfung von Industriechemikalien, Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen, Pflanzenschutz- und Futtermitteln. Die Einführung der OECD-Richtlinien vor mehr als zehn Jahren und ihre Gültigkeit in allen OECD-Mitgliedsstaaten hatte eine nachhaltige Reduktion der behördlich vorgeschriebenen Tierversuche zur Folge, die von der Industrie im Rahmen von Anmelde- und Zulassungsverfahren durchgeführt werden müssen. Besonders die auch von den USA und Japan befolgte Regelung (*mutual acceptance of data*), daß Tierversuche nach OECD akzeptiert werden, wenn sie in einem anderen Land durchgeführt worden sind, vermeidet zusätzliche Tierversuche. Diese Entwicklung war aus Tierschutzgründen zu begrüßen, und sie brachte außerdem für die Industrie eine erhebliche Kostenersparnis.

Die Verabschiedung der EG-Richtlinie 86/609/EEC, in der der Umgang mit Versuchstieren innerhalb der EU geregelt wird, führte in den EU-Mitgliedsstaaten zu intensiven Bemühungen, Tierversuche in der Forschung und für behördliche Zwecke zu reduzieren. Im Rahmen dieser Anstrengungen wurden staatliche Validierungszentren gegründet, und zwar 1989 in Deutschland ZEBET und 1992 auf EU-Ebene ECVAM. Als besonderes Hindernis stellt sich bei der Validierung die unterschiedliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse toxikologischer *in vitro* Testsysteme mit den Ergebnissen von Tierversuchen heraus. Um einen von der OECD genormten Tierversuch für ein spezielles Teilgebiet der Toxikologie durch eine tierversuchsfreie Methode zu ersetzen, muß sichergestellt sein, daß mit Hil-

fe der Ergebnisse der *in vitro* Methode in gleicher Weise Maßnahmen zum Arbeits- und Verbraucherschutz durchgesetzt werden können, wie es bisher mit Hilfe von Tierversuchen möglich ist (Spielmann, 1996).

2 Entwicklung eines Konzeptes zur Validierung tierversuchsfreier toxikologischer Methoden in Europa

Bisher gab es international unterschiedliche Konzepte, aber kaum Erfolg bei der Entwicklung behördlich akzeptierter toxikologischer *in vitro* Tests. Deshalb mußte man sich international auf ein gemeinsames Vorgehen zur Validierung der neuen Methoden einigen. 1990 wurde auf dem CAAT/ERGATT Workshop zur Validierung aus der Sicht amerikanischer und europäischer Wissenschaftler eine erste Einigung über ein Validierungskonzept erzielt (Balls et al., 1990a). Noch im gleichen Jahr wurde dieses Validierungskonzept grundsätzlich auch von Vertretern internationaler Behörden auf einem Workshop in Vouliagmeni (Griechenland) akzeptiert (Balls et al., 1990b). Dieses Validierungskonzept führte überwiegend in Europa dazu, daß sich Laboratorien aus der chemisch-pharmazeutischen und kosmetischen Industrie zur Durchführung von Validierungsstudien auf Gebieten entschlossen, die kurzfristig Erfolg versprachen. Für die Entscheidung zur Durchführung von Validierungsstudien waren außerdem das Leiden der Tiere im jeweiligen Versuch und die Tierzahlen wichtige Kriterien. Validierungsstudien wurden überwiegend auf dem Gebiet der lokalen Verträglichkeit durchgeführt, wie z.B. zur Prüfung von haut- und augenreizenden Eigenschaften, sowie zur Abschätzung von entwicklungsschädigenden (teratogenen) und nervenschädigenden (neurotoxischen) Eigenschaften.

3 Verträglichkeitstests

In Deutschland wurde seit 1988 mit Unterstützung des Forschungsministeriums BMBF eine multizentrische Validierungsstudie zum Ersatz des Draize-Tests am Kaninchenauge durchgeführt, die aufgrund des oben beschriebenen Validierungskonzeptes aus dem Jahre 1990 ergänzt und erweitert wurde (Spielmann et al., 1993). Mit dem gleichen Ziel wurde außerdem der BCOP-Test an der Cornea des isolierten Rinderauges, der in Frankreich entwickelt wurde, von der EU in 13 europäischen Labors validiert (Gautheron et al., 1994). Die größte Validierungsstudie zum Ersatz des Draize-Tests am Kaninchenauge wurde 1992 unter Führung des britischen Home Office weltweit in 36 Laboratorien und mit neun verschiedenen *in vitro* Tests durchgeführt (Balls et al., 1995a). Auch in Japan wurden seit 1991 unter Führung des Gesundheitsministeriums 12 Ersatzmethoden zum Ersatz des Draize-Tests am Kaninchenauge validiert (Ohno et al., 1995).

Bei den genannten Validierungsstudien stellte sich enttäuschenderweise heraus, daß die meisten *in vitro* Methoden vor der Validierung nicht ausreichend standardisiert waren. Außerdem waren die meisten Tests für spezielle Stoffgruppen von Firmen der Kosmetikindustrie entwickelt worden, und bei Prüfung unter „blinden“ Bedingungen, mit einem breiten Spektrum von Testsubstanzen mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften, wichen die Ergebnisse der *in vitro* Tests von den aus Tierversuchen bekannten Ergebnissen stärker ab als erwartet.

4 ECVAMs Validierungskonzept

Aufgrund dieser Erfahrungen wurde das 1990 entwickelte Validierungskonzept unter Federführung von ECVAM 1994 nochmals zur Diskussion gestellt. Es zeigte sich dabei, daß das ursprüngliche Validierungskonzept (Balls et al., 1990a, 1991)

nicht detailliert genug ausgearbeitet worden war (Balls et al., 1995b). Vor allem war der Stand der Entwicklung von *in vitro* Methoden überschätzt worden, die in einzelnen Labors der Industrie für hausinterne Zwecke eingesetzt wurden. Die Validierungsstudien zeigten weiterhin, daß fast jeder *in vitro* Test in, von Labor zu Labor unterschiedlichen, Varianten durchgeführt wurde. Schließlich fehlte bei fast allen *in vitro* Methoden ein Prädiktionsmodell, das für behördliche Zwecke zur Einstufung und Kennzeichnung chemischer Stoffe international verwendet werden kann, ähnlich wie es mit Tierversuchsdaten möglich ist. Der ECVAM Validierungs-Workshop hat daher sehr viel strengere Kriterien für die Aufnahme eines Tests in eine Validierungsstudie unter „blinden“ Bedingungen empfohlen, als im ursprünglichen Konzept von 1990. Neu ist der Vorschlag einer Prävalidierungsphase, die der formalen Validierung vorausgehen sollte und in der die Gültigkeit des Standardprotokolls und auch das Prädiktionsmodell von erfahrenen Labors bestätigt werden müssen (Balls et al., 1995b; Curren et al., 1995).

Die Empfehlungen des ECVAM Workshops zur Validierung wurden auf europäischer Ebene bei einer internationalen COLIPA/ECVAM Validierungsstudie von *in vitro* Phototoxizitätstests berücksichtigt und führten zu einem überraschend positiven Ergebnis der Validierungsstudie (Spielmann et al., 1994a; 1996).

5 Akzeptierung des Validierungskonzepts außerhalb Europas

Um auf internationaler Ebene den Ersatz toxikologischer Prüfmethoden in den OECD-Richtlinien durchzusetzen, müssen auch die OECD-Mitgliedstaaten außerhalb Europas einem Konzept für die Validierung und Akzeptierung tierversuchsfreier Methoden zustimmen. Wie oben angedeutet, förderte die japanische Regierung bereits die Validierung von Alternativmethoden zum Ersatz des

Draize-Tests am Kaninchenaugen (Ohno et al., 1995), die jedoch noch nicht akzeptiert werden. Die Behörden in den USA und Kanada haben dagegen die Akzeptierung tierversuchsfreier toxikologischer Prüfmethoden über lange Zeit strikt abgelehnt. Auf Initiative der EU hat die OECD seit 1994 mit den unterschiedlichen amerikanischen Bundesbehörden (EPA, FDA, OSHA, DOT, DOE, NIH, NCI) Gespräche geführt und das in Europa entwickelte Validierungskonzept zur Diskussion gestellt. Aufgrund dieser Initiative und wegen der Forderungen aus der amerikanischen Öffentlichkeit sowie der international tätigen pharmazeutisch-chemischen Industrie wurde Ende 1994 unter Führung des *National Toxicology Program* in Anlehnung an ECVAM die US-Validierungsbehörde ICCVAM gegründet.

ICCVAM hat daraufhin 1995 ein Konzept zur Validierung und Akzeptierung alternativer toxikologischer Testmethoden vorgelegt und auf einem Workshop in Washington im Dezember 1995 international diskutiert (ICCVAM Report, 1995, NTP, 1996).

In diesen Berichten stimmen die amerikanischen Behörden im Grundsatz dem in der EU entwickelten Validierungskonzept zu.

6 Konzept der OECD zur Validierung und Akzeptierung toxikologischer Alternativmethoden (OECD, 1996a)

Im Januar 1996 fand auf Einladung der schwedischen Behörden und der OECD in Stockholm ein Validierungs-Workshop statt, bei dem die für die OECD-Prüfrichtlinien zustän-

Tabelle: Kriterien der Validierung und behördlichen Anerkennung von neuen Testmethoden zur Zulassungsprüfung von Chemikalien (aus OECD, 1996a)

Eight OECD Validation Criteria

1. Describe **rationale** of test method (scientific need and regulatory purpose)
2. Determine **relationship** of test endpoints to the *in vivo* biological effect and toxicity
3. Detailed **protocol** published (peer reviewed)
4. Show intra-test **variability**, **repeatability** and **reproducibility** of method (within and amongst labs)
5. Carry out a performance test using **chemicals reference**
6. **Evaluate** performance of test in comparison with relevant existing toxicity data
7. Allow **independent review** of the full data set
8. Comply with good laboratory practice principles (GLP)

Six OECD Acceptance Criteria

1. Check **prediction capability** of the new test to existing test data or to effects in the target species
2. The test generates **at least as useful data** for risk assessment than existing methods
3. The data are **representative** for a group of chemicals of regulatory interest
4. The test must be **robust**, transferable and standardizable (no patented tests!)
5. The test is cost effective and likely to be used
6. Give scientific, ethical and economical justification relevant to the **Three Rs**

digen Experten aus allen Industrienationen vertreten waren. Auch auf diesem Symposium konnte man sich im Grundsatz auf das 1994 unter Führung von ECVAM erarbeitete Validierungskonzept einigen (Balls et al., 1995b). Das trifft sowohl für die formale Durchführung von Validierungsstudien als auch für die Kriterien der Akzeptierung tierversuchsfreier Methoden durch die OECD zu.

Eine klare Trennung der Bereiche Validierung und behördliche Anerkennung wurde anhand einer kochbuchartigen Vorgehensweise von Kriterien formuliert (Tabelle). Au-

ßerdem wurde das Konzept der Prävalidierung, d.h. Entwicklung und Prüfung eines Standardprotokolls und eines Prädiktionsmodells bereits im Vorfeld der formalen Validierungsstudie, voll übernommen und akzeptiert (Curren et al., 1995).

Darüber hinaus hat eine der drei Arbeitsgruppen des OECD Workshops Prüfstrategien entwickelt, in denen toxikologische *in vitro* Tests mit *in vivo* Tests stufenweise kombiniert werden. Für den Bereich der Augenreizung hatten die deutschen Behörden, vertreten durch das BgVV, und die amerikanischen Behörden, vertreten durch die EPA,

bereits gemeinsam eine Prüfstrategie erarbeitet, bei welcher physikalisch-chemische Daten, die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR) und *in vitro* Testverfahren zur Bestimmung der toxikologischen Eigenschaften toxikologischen Tierversuchen vorgeschaltet werden. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

In Anlehnung an diese Prüfstrategie wurde ein relativ ähnliches Konzept für die Prüfung auf Hautreizung erarbeitet. Vertreter der amerikanischen Industrie und Behörden plädierten dabei für eine Prüfung am Menschen, an freiwilligen Proban-

OECD-Vorschlag für eine kombinierte *in vitro/in vivo* Teststrategie zur Prüfung auf augenreizende und -ätzende Eigenschaften

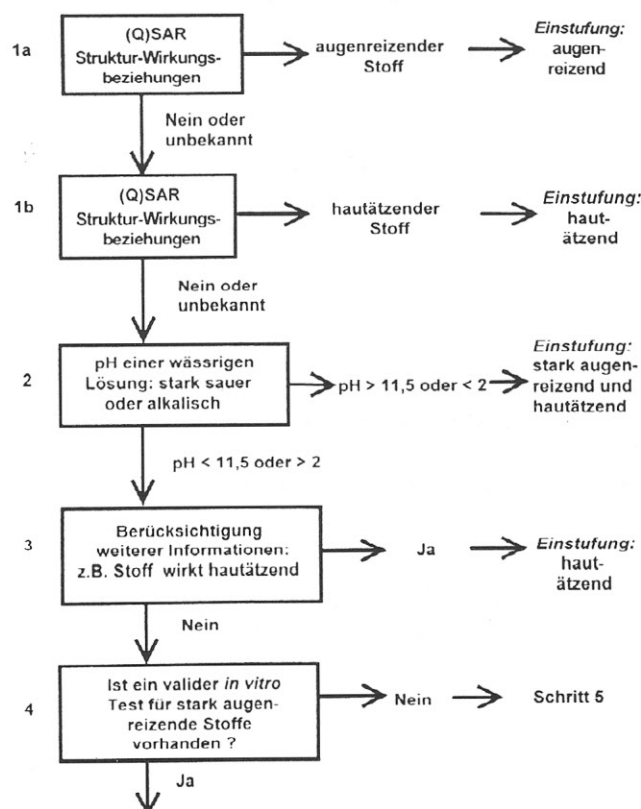
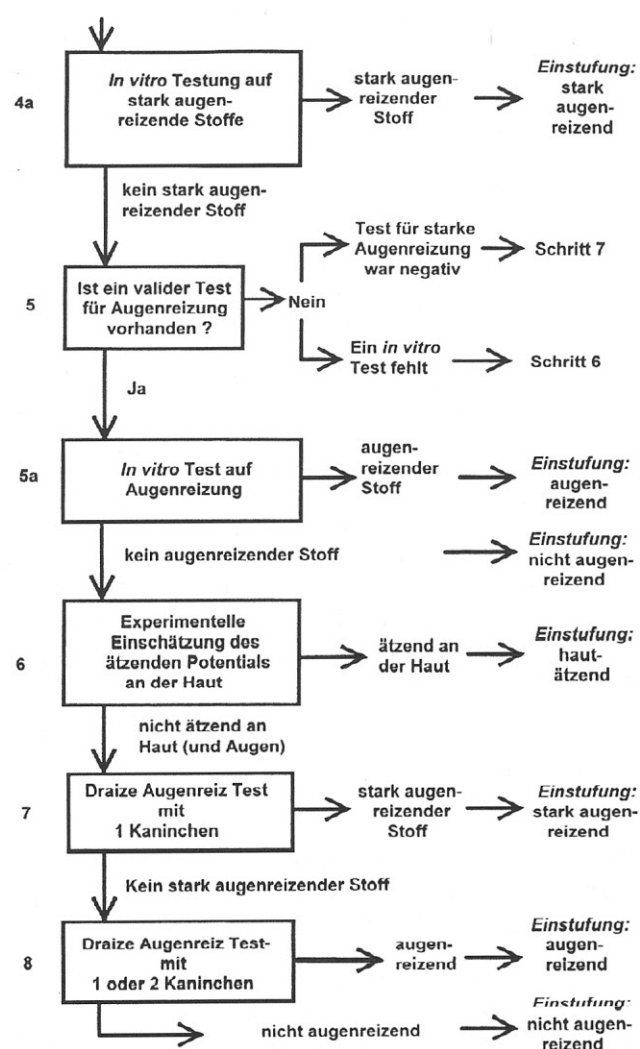


Abbildung 1: Kombinierte *in vitro/in vivo* Teststrategie für die Prüfung auf augenreizende und -ätzende Eigenschaften. Das kombinierte Prüfkonzept wurde gemeinsam von deutschen Wissenschaftlern im BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) und US-amerikanischen Wissenschaftlern der Bundesbehörden EPA, FDA und



CPSC 1994/95 entwickelt und bei der OECD eingereicht. Der OECD Workshop 1996 zur Validierung von Alternativmethoden hat dem Konzept grundsätzlich zugestimmt, OECD, 1996a.

den, direkt im Anschluß an die Testung *in vitro*, d.h. ohne vorherige Tierversuche. Die Vertreter der europäischen Behörden konnten diesem Vorgehen aus ethischen Gründen nicht zustimmen.

7 Phototoxizität

Ein weiteres erfolgversprechendes Gebiet für *in vitro* Methoden ist die Prüfung auf phototoxische Eigenschaften. Bereits 1994 hatte ein ECVAM Workshop eine Prüfstrategie empfohlen, bei der nach der Prüfung in validierten *in vitro* Systemen unter Auslassung jeglicher Tierversuche die Prüfung am Menschen vorgeschlagen wurde, d.h. an freiwilligen Probanden (Spielmann et al., 1994b). Im Anschluß daran hatte die OECD 1995 den Entwurf für eine neue Prüfrichtlinie zur Prüfung auf phototoxische Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* vorgelegt, in der nach

der Prüfung *in vitro* im zweiten Schritt Tierversuche zwingend vorgesehen waren. Erst danach sollte die Prüfung am Menschen zulässig sein. Die Teilnehmer des OECD Workshops in Stockholm favorisierten bei der Prüfung auf phototoxische Eigenschaften die Testung nur mit Hilfe von *in vitro* Methoden, da die Literatur zeigt, daß die Daten von Tierversuchen auf diesem speziellen Gebiet der Toxikologie kaum auf den Menschen übertragbar sind, und daß sich durch einfache *in vitro* Tests phototoxische Eigenschaften für den Menschen relativ gut voraussagen lassen (Spielmann et al., 1994b). Es wurde deswegen von den Experten der OECD die in Abbildung 2 wiedergegebene Prüfstrategie zur Prüfung auf phototoxische Eigenschaften empfohlen, in der vollständig auf Tierversuche verzichtet wird.

Mit den von den Experten der OECD vorgeschlagenen Prüfstrategien, bei denen *in vitro* Methoden

toxikologischen Tierversuchen vorgeschaltet werden, hat die OECD den Weg für die Anwendung toxikologischer *in vitro* Methoden weit geöffnet. Einschränkend muß jedoch dazu bemerkt werden, daß bisher für die 3 Gebiete – Haut- und Augenreizung sowie Phototoxizität – noch keine *in vitro* Methode vom entscheidenden Gremium der OECD akzeptiert wurde. Aber der OECD Workshop zur Validierung und Akzeptierung toxikologischer Alternativmethoden hat nun erstmals die Voraussetzungen für die Akzeptierung von *in vitro* Methoden geschaffen. Es liegt jetzt an Wissenschaftlern in Industrie und Behörden, gemeinsam für die einzelnen Gebiete *in vitro* Methoden zu validieren und zur Anerkennung durch die OECD zu führen.

8 Erstmals befürwortet die OECD einen toxikologischen *in vitro* Test zur Aufnahme in die OECD Prüfrichtlinien: die Prüfung auf Hautpenetration (OECD, 1996b)

Im Zusammenhang mit der 6. Änderung der Kosmetikrichtlinie hat in der EU der Verzicht auf toxikologische Tierversuche für Kosmetika (Fertigprodukte) zum 1.1.1998 höchste Priorität. Die Diskussion zwischen dem europäischen Kosmetikverband COLIPA, dem *Scientific Committee on Cosmetology* (SCC) der DG XXIV der EU und ECVAM hat dabei ergeben, daß es für den Umfang der für die Risikoabschätzung erforderlichen toxikologischen Prüfung entscheidend davon abhängt, ob der zu prüfende Stoff bzw. eine Formulierung durch die Haut in den Körper eindringt und dort systemische Wirkungen hervorruft. Damit kommt der Prüfung auf Hautpenetration bei der toxikologischen Prüfung von Kosmetika eine zentrale Bedeutung zu. Die OECD hatte im Jahr 1995 sowohl eine *in vivo* als auch eine *in vitro* Methode zur Bestimmung der Hautpenetration vorgelegt. Im Herbst 1995 gab es gegen die *in*

OECD-Vorschlag für eine *in vitro* Teststrategie zur Prüfung auf phototoxische Eigenschaften

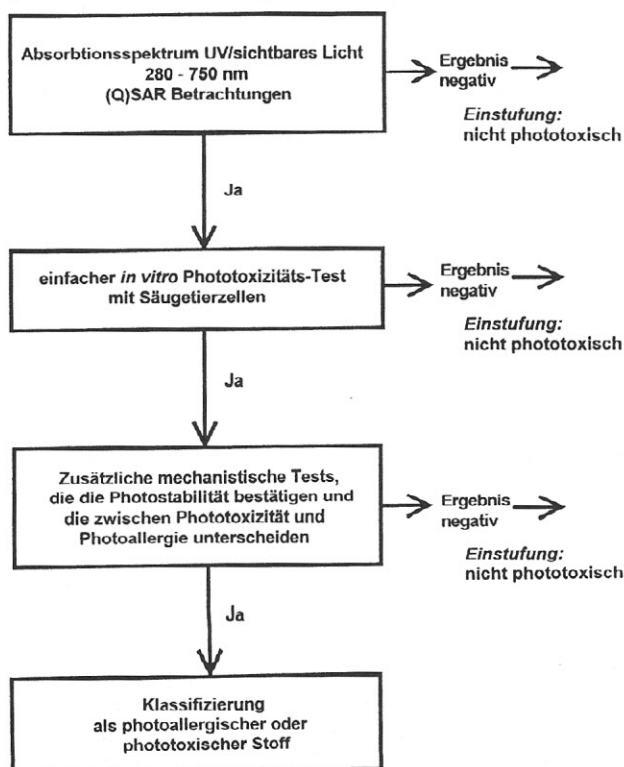


Abbildung 2: *In vitro* Teststrategie zur Prüfung auf phototoxische Eigenschaften. Die Prüfstrategie wurde vom ECVAM Workshop „*In Vitro Phototoxicity Testing*“ (Spielmann et al., 1994) entwickelt und stützt sich nur auf die Testung mit *in vitro* Methoden. Die Ergebnisse einer sehr erfolgreichen experimentellen Validierung von *in vitro* Phototoxizitätstests in den Jahren 1992–96, die von ZEBET koordiniert und von ECVAM und COLIPA gefördert wurde, wurden 1996 bei der DG XXIV der EU eingereicht (Spielmann et al., 1996). Die Ausarbeitung einer OECD-Prüfrichtlinie zur *in vitro* Phototoxizitätstestung ist in Vorbereitung.

vivo Methode keine Einwände, eine Akzeptierung wurde jedoch zurückgestellt. Die Delegationen der USA und Kanadas lehnten den Entwurf der *in vitro* Methode ab, da bei ihr wahlweise menschliche oder tierische Haut eingesetzt werden konnte.

Federführend für die Entwicklung der *in vitro* Methode waren England und Kanada. Die Kanadier bestanden darauf, daß nur frische und gut erhaltene menschliche Haut zur Testung verwendet wird. Einige europäische Länder, wie z.B. Deutschland, haben gleichzeitig bei der OECD interveniert, um die Prüfung mit tierischer Haut von Schweinen aus Schlachthofmaterial anstelle menschlicher Haut verwenden zu dürfen. Hintergrund dafür sind einerseits die ethischen und juristischen Probleme bei der Gewinnung frischer menschlicher Haut aus Operationsmaterial. Andererseits wird mit gutem Erfolg in Laboratorien der Kosmetikindustrie in Deutschland die Hautpenetration mit Hilfe von Schweinehaut und auch mit Haut von Toten (Kadaverhaut) bestimmt.

Um möglichst rasch eine Einigung zu erzielen, haben daraufhin ECVAM und die OECD gemeinsam im Februar 1996 eine Reihe von Experten aus Europa und den USA zu einem Gespräch nach Brüssel eingeladen, das überraschenderweise sehr erfolgreich verlief. Grundlage für die Einigung waren die Empfehlungen des ECVAM Workshops über perkutane Absorption (Howes et al., 1996). Das Gespräch ergab Einigkeit darüber, daß die zur Zeit vorhandenen Tiermodelle für die Beurteilung der Hautpenetration am Menschen kaum geeignet sind, und daß andererseits in der pharmazeutisch-chemischen Industrie in Europa und den USA erfolgreich mit menschlicher Haut – sowohl mit frischem Operationsmaterial als auch mit Kadavermaterial – und Tierhaut aus Schlachthofmaterial gearbeitet wird. Der europäische Kosmetikverband COLIPA erklärte sich daraufhin bereit, seine Mitgliedsfirmen dazu zu bewegen, die Ergebnisse, die in ihren Laboratorien mit diesen *in*

vitro Methoden in den letzten Jahren erzielt wurden, den Experten der OECD und EU für eine Bewertung zur Verfügung zu stellen. Man war sich darüber einig, daß dieses umfangreiche Datenmaterial für eine kritische Bewertung der Validität der *in vitro* Methode ausreicht, so daß eine zusätzliche Validierungsstudie mit der neuen *in vitro* Methode zur Prüfung auf Hautpenetration von keinem der anwesenden Experten für erforderlich gehalten wurde.

Es wurde daher beschlossen, daß unter Federführung von England und Kanada, die die neue Prüfrichtlinie bei der OECD eingebracht hatten, der Entwurf der *in vitro* Testmethode so überarbeitet wird, daß Haut von Mensch oder Tier für die Bestimmung der Hautpenetration verwendet werden kann. Den Experten der beiden Länder wurden dazu die Ergebnisse aus den Labors der europäischen Kosmetikindustrie zur Verfügung gestellt, die mit *in vitro* Methoden bisher erzielt wurden.

Das überarbeitete Prüfprotokoll konnte Ende April 1996 allen Teilnehmern des Expertengesprächs zur Kritik vorgelegt werden. Seit Juni 1996 liegen zwei abgestimmte Entwürfe für neue OECD Richtlinien für das Gebiet der Hautpenetration vor. Die *in vivo* Methode trägt den Titel „*Percutaneous Absorption: in vivo Method*“, und die *in vitro* Methode ist betitelt: „*Dermal Delivery and Percutaneous Absorption: In Vitro Method*“ (OECD, 1996b). Aufgrund der intensiven Arbeit in der ersten Hälfte des Jahres 1996 ist nun damit zu rechnen, daß die Experten der OECD für toxikologische Prüfmethoden beide Methoden auf ihrer nächsten Sitzung des „*Test Guidelines Program*“ der OECD im Herbst dieses Jahres anerkennen.

9 Neue OECD-Richtlinien mit *in vitro* Tests in der Neurotoxikologie

In der Neurotoxikologie werden von der Industrie verschiedene Verhaltenstests an Ratten durchgeführt, die in Anlehnung an die Richtlinien der

amerikanischen Umweltbehörde EPA (U.S. Environmental Protection Agency, 1992) kürzlich in einer neuen OECD-Guideline zusammenfaßt wurden (OECD Neurotox, 1995). Die breite Palette der Tests spiegelt wider, wie unklar und weit der Begriff „Neurotoxizität“ definiert ist. In der sog. „*Functional Observation Battery*“ werden nämlich neben den erwähnten allgemeinen Verhaltensstudien auch klinische Gesundheit, Aussehen und Gewichtsentwicklung untersucht. Ausführliche Studien belegen jedoch, daß die Gewichtszunahme insbesondere bei Jungtieren der weitaus sicherste und empfindlichste Meßwert ist und deshalb bereits bei anderen behördlich vorgeschriebenen Langzeitstudien erfaßt wird.

Aus der Sicht des Tierschutzes ist es nicht zu akzeptieren, daß die neue tierversuchende und -belastende Testbatterie in einer OECD-Guideline festgeschrieben werden soll, ohne daß die neuen OECD Validierungs- und Akzeptanzkriterien berücksichtigt werden. Wenigstens wird in der Begründung für die neue OECD-Guideline festgestellt, daß *in vitro* Tests (aber leider auch weitere *in vivo* Tests!) für spezielle Fragestellungen eingesetzt werden können.

Dagegen wird ein fortschrittlicher Ansatz in der neuen OECD Richtlinie 418 zur Prüfung auf verzögerte Neuropathie von Organophosphaten (OECD 418, 1994) verfolgt. Darin werden *in vitro* Methoden als „positiv-Screeningtests“ vorgeschlagen, wie z.B. das Nervenwachstum kultivierter C6 Neuroblastoma-Zelllinien (Henschler et al., 1992). Einschränkend ist zu betonen, daß *in vitro* Tests nur am Rande diskutiert werden. Den Schwerpunkt der Prüfung bilden Verhaltenstests an Hühnern und die Auswertung histochemischer Veränderungen des Markerenzym NTE (*Neuropathy Target Esterase*) im Gehirn der Tiere. In der OECD-Richtlinie fehlt der Hinweis darauf, daß sich NTE speziell gut *in vitro* verfolgen läßt (Nostrand et al., 1992; Sogorb et al., in press). Im zweiten Abschnitt dieser Richtlinie

läßt folgender Satz hoffen, daß *in vitro* Methoden in Zukunft entscheidender für die Risikoprüfung von Organophosphaten werden als Tierversuche: „...*in vitro screening tests could be employed to identify those chemicals which may cause delayed neuropathy*“ (OECD 418, 1994).

Für andere neurotoxische Effekte sind international bisher noch keine weiteren *in vitro* Tests akzeptiert. ECVAM hat zum Thema Neurotoxizitätsprüfung *in vitro* einen Workshop durchgeführt (Atterwill et al., 1994), bei dem jedoch mit Ausnahme einzelner *in vitro* Testbatterien keine konkreten Vorschläge gemacht wurden. Die von den Autoren nach eigenen Kriterien prävalidierten *in vitro* Testbatterien müssen einer externen Begutachtung erst noch standhalten. Auch vom amerikanischen Forschungsrat *National Research Council* wurden bereits 1992 detaillierte Protokolle veröffentlicht, die auf der Basis von *in vitro* Tests das Screening auf neurotoxische Wirkung zulassen (NRC, 1992). Solche Vorschläge können nun dank der heute gültigen Kriterien für Prävalidierung und Validierung bis zur behördlichen Anerkennung geführt werden. Die OECD hat nun im Rahmen ihres Testrichtlinienprogramms ein lesenswertes Leitdokument über Strategien zur Neurotoxizitätsprüfung erarbeitet, das *in vitro* Methoden jedoch nur zur Abklärung von Wirkmechanismen empfiehlt (OECD Guidance Document, 1996). Ein Fortschritt bei der Aufnahme von *in vitro* Methoden für die Risikoprüfung ist darin wiederum von der Erfüllung der Kriterien zur Validierung und behördlichen Anerkennung abhängig (Tabelle).

10 Bewertung und Ausblick

Die geschilderte Entwicklung ist aus verschiedenen Gründen bemerkenswert. 1997 wird die OECD mit großer Wahrscheinlichkeit die *in vitro* Methode zur Bestimmung der Hautpenetration akzeptieren. Damit wird dann zum ersten Mal eine

toxikologische *in vitro* Methode in die toxikologischen OECD-Richtlinien aufgenommen. Noch beachtenswerter ist jedoch die Tatsache, daß sich die für diesen Bereich kompetenten Experten der OECD entschließen konnten, eine *in vitro* Methode anzuerkennen, ohne daß sie die formale Validierung durchlaufen hat. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Methode bereits seit längerer Zeit in der Industrie etabliert ist und ausreichende Erfahrungen zur Bewertung der neuen Technik mit einer großen Zahl chemischer Stoffe vorliegen. Wenn ein völlig neuer *in vitro* Test entwickelt wird, fehlt üblicherweise eine so umfangreiche Datenbasis, so daß sich bei kritischer Würdigung der Datenlage in der Mehrzahl der Fälle die Durchführung einer aufwendigen Validierungsstudie kaum vermeiden läßt.

Die Entwicklung zeigt, daß Behördenvertreter im Gegensatz zu dem üblichen Klischee nicht immer formal entscheiden oder sogar Entscheidungen verschleppen, sondern daß sie auch in der Lage sind, sachbezogen und rasch zu reagieren. Das ist in diesem Fall besonders erfreulich, da das Leiden von Versuchstieren deutlich reduziert wird.

Die öffentliche Diskussion wird sich vor diesem Hintergrund vor allem darauf konzentrieren müssen, ob die Gesellschaft bereit ist, Risiken zu tragen, falls eine Alternativmethode nicht die gleiche Sicherheit garantieren kann wie ein Tierversuch. Behörden, Industrie und Verbraucher müssen weiterhin verlangen, daß „eine Alternativmethode mindestens so gut sein muß wie bisherige Tierversuche“ (Kriterium Acceptance 2 der Tabelle), auch wenn Tierschützer häufig nicht bereit sind, eine so eindeutige Vorgabe zu akzeptieren.

Literatur

Atterwill, C. K., Bruinink, A., Drejer, J., Duarte, E., Abdulla, E. M., Meredith, C., Nicotera, P., Regan, C., Rodriguez-Farré, E., Simpson, M.

G., Smith, R., Veronesi, B., Vijverberg, H., Walum, E. and Williams, D. C. (1994). *In vitro* neurotoxicity testing. ECVAM Workshop Report 3. *ATLA* 22, 350–362.

Balls, M., Blaauboer, B., Rusick, D., Frazier, J., Lamb, D., Pemberton, M., Reinhardt, C. A., Roberfroid, M., Rosenkranz, H., Schmid, B., Spielmann, H., Stamatii, A. and Walum, E. (1990a). Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures (AM-DEN-REPORT I). *ATLA* 18, 313–337.

Balls, M., Botham, Ph., Cordier, A., Fumero, S., Kayser, D. Koeter, H. B. W. M., Koundakjian, P., Lindquist, N. G., Meyer, O., Ploda, L., Reinhardt, C. A., Rozemond, H. Smyrniotis, T., Spielmann, H., van Looy, H., van der Venne, M. and Walum, E. (1990b). Promotion of the regulatory and legal acceptance of validated non-animal toxicity test procedures (VOULIAGMENI-REPORT). *ATLA* 18, 339–344.

Balls, M., Reinhardt, C. A., Spielmann, H. and Walum, E. (1991). The development, validation and acceptance of *in vitro* toxicity tests. In M. Balls, J. Bridges and J. Sothec (Ed.), *Animals & Alternatives in Toxicology: Status and Prospects* (291–312). Basingstoke: Mac Millan Press.

Balls, M., Botham, P. A., Bruner, L. and Spielmann, H. (1995a). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology In Vitro* 9, 871–929.

Balls, M., Blaauboer, B., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fentem, J. H., Fielder, R., Guillouzo, A., Lewis, R., Lovell, D., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H. and Zucco, F. (1995 b). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures (AM-DEN-REPORT II). *ATLA* 23, 154–179.

Curren, R. D., Southee, J. A., Spielmann, H., Liebsch, M., Fentem, J. H. and Balls, M. (1995). The role of prevalidation in the development, validation and acceptance of alternative methods. *ATLA* 23, 211–217.

EG (1996). Richtlinie für den Umgang

- mit Tieren, die zu Tierversuchen und anderen wissenschaftlichen Zwecken benutzt werden. DG XI der EU für Umweltschutz, Reaktorsicherheit und Zivilschutz, Brüssel.
- Gautheron, P., Giroux, J., Cottin, M., Auddegond, L., Morilla, A., Mayor-domo-Blanco, L., Tortjada, A., Haynes, G., Vericat, J. A., Pirovano, R., Gillio Tos, E., Hagemann, C., Vanparys, P., Deknut, G., Jacobs, G., Prinsen, M., Kalweit, S. and Spielmann, H. (1994). Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicol. in Vitro* 8, 281–392.
- Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J., Hoeck, U., Kemper, F., Maibach, H., Marty, J.-P., Merk, H., Parra, J., Rekkas, D., Rondelli, I., Schaefer, H. and Verbiese, N. (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report 13. *ATLA* 24, 81–106.
- ICCVAM Report (1995). Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). Draft report, October 1995, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA.
- Nostrandt, A. C., Rowles, T. K. and Ehrlich, M. (1992). Cytotoxic effects or organophosphorus esters and other neurotoxic chemicals on cultured cells. *In Vitro Toxicology* 5 (3), 127–136.
- NRC (1992). Neurotoxicology and models for assessing risk for new and existing chemicals. U.S. National Research Council Committee Report. National Academy Press, Washington D.C., 153 pp.
- NTP Report (1996). National Toxicology Program workshop on validation and regulatory acceptance of alternative toxicological test methods. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA. Final Report. März 1996. 56 pp.
- OECD (1982). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Paris.
- OECD (1993). Guidance document for the development of OECD guidelines for the testing of chemicals. OECD Environment Monographs No. 76, Paris; 25 pp.
- OECD (1994). Options for a testing strategy for the testing of skin and eye irritancy. OECD (submitted by the US and Germany, manuscript).
- OECD (1994a). Guidelines for acute dermal photoirritation screening test. Draft, OECD Paris.
- OECD (1994b). Guidelines for acute dermal photoirritation dose response test. Draft, OECD Paris.
- OECD (1994c). Delayed neurotoxicity of organophosphorous substances following acute exposure (draft proposal, March 1994). OECD Paris.
- OECD (1996a). Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods. OECD Paris, July 1996; 60 pp.
- OECD (1996b). Dermal delivery and percutaneous absorption: In Vitro methods. May 1996, OECD Paris.
- OECD (1996c). Draft new guideline for a neurotoxicity study. April 1996, OECD Paris.
- OECD Duidance Document (1996). Draft guidance document on neurotoxicity strategy and methods. OECD Paris, May 1996; 55 pp.
- Ohno, Y. und 23 weitere Mitarbeiter (1995). First phase interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients: 1. overview, organization and results of the validation study. *AATEX* 3, 123–136.
- Reinhardt, C. A. (1996). OECD Workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods. Tagungsbericht Solna/Stockholm. *ALTEX* 26, 101–102.
- Sogorb, M. A., Gutiérrez, L. M., Bas, S., Céspedes, M. V., Vilanova, E. and Viniegra, S. Neuropathy target esterase in chromaffine cells. *Toxicology in vitro* (in press).
- Spielmann, H., Kalweit, S., Liebsch, M., Wirsberger, T., Gerner, I., Bertram-Neis, F., Krauser, K., Kreiling, R., Miltenburger, H. G., Pape, W. and Steiling, W. (1993). Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals. *Toxicol. in Vitro* 7, 505–510.
- Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Döring, B., Holzhütter H. G., Kalweit, S., Klecak, G., L. Epattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W. J. W., Pfannenbeker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994a). EC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with the Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol. in Vitro* 8, 793–796.
- Spielmann, H., Lovell, W. W., Hölzle, E., Johnson, B. E., Maurer, T., Miranda, M., Pape, W. J. W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994b). In vitro phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. *ATLA* 22, 314–348.
- Spielmann, H. (1996). Unterschiedliche Konzepte der toxikologischen Risikobewertung bei der Anwendung von Tierversuchen und in vitro Methoden. *ALTEX* 13, 140–143.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G. and De Silva, O. (1996). Report to the DG XXIV on the EU/COLIPA „in vitro photoirritancy“ validation trial: results of phase II, blind trial. Eingereicht bei der DG XXIV der EU, Brüssel, April 1996.
- U.S. Environmental Protection Agency (1992). Health effects testing guidelines subpart 6 – Neurotoxicity. 40 CFR 798, 6050–6400.

Danksagung

Für die kompetente Unterstützung bei der Abfassung des Manuskriptes sind wir Susanne Boy, Edelgard Rink und Dieter Traue zu Dank verpflichtet.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Horst Spielmann
Leiter der ZEBET im BgVV
Diedersdorfer Weg 1
D-12277 Berlin
Tel. +49-30-8412-2270
Fax +49-30-8412-2958
e-mail: zebet@bgvv.de