



Berlin
12. Oktober
2006



Risiken erkennen – Gesundheit schützen

Umsetzung der neuen europäischen Chemikalien-
Gesetzgebung REACH

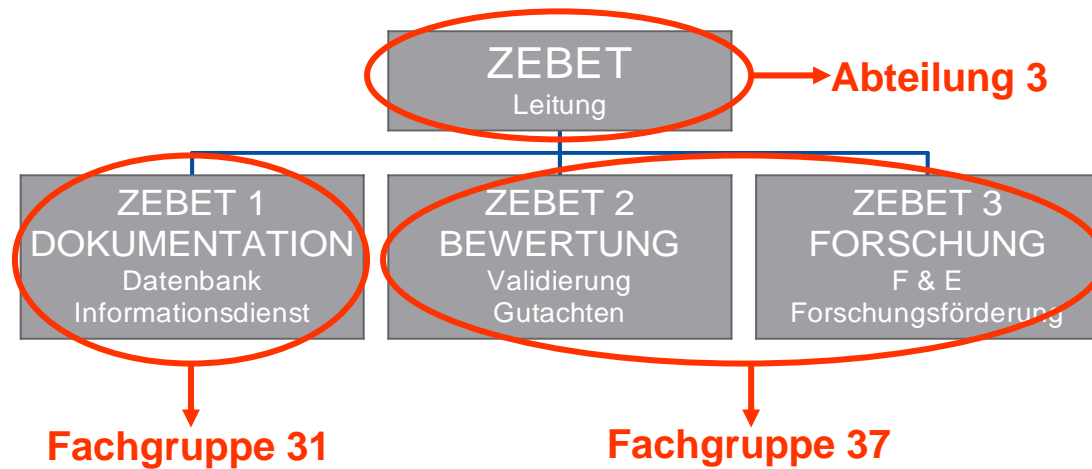
Teststrategien und Alternativmethoden zum Tierversuch

Manfred Liebsch und Horst Spielmann

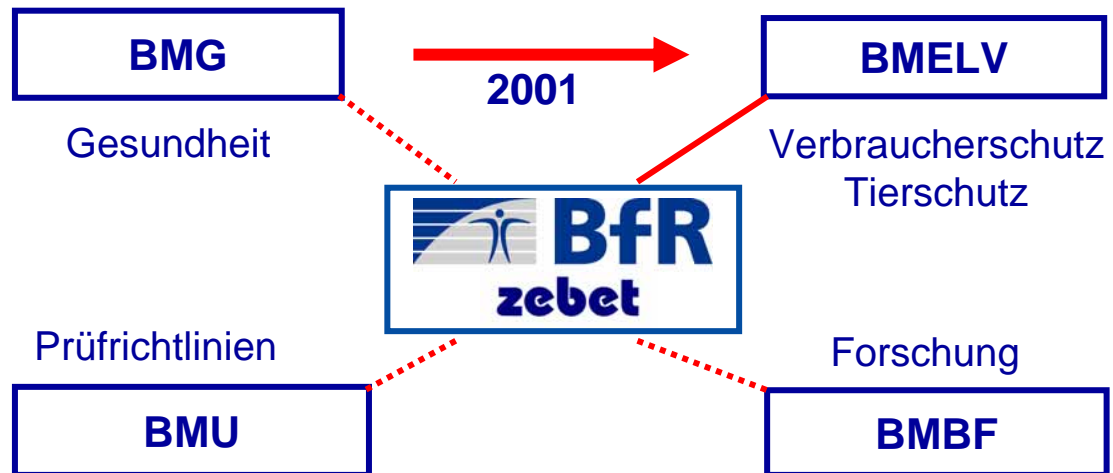
Zentralstelle zur
Erfassung und
Bewertung von
Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum
Tierversuch

Bundesinstitut
für
Risikobewertung
*Federal Institute
for Risk Assessment*

VORSTELLUNG



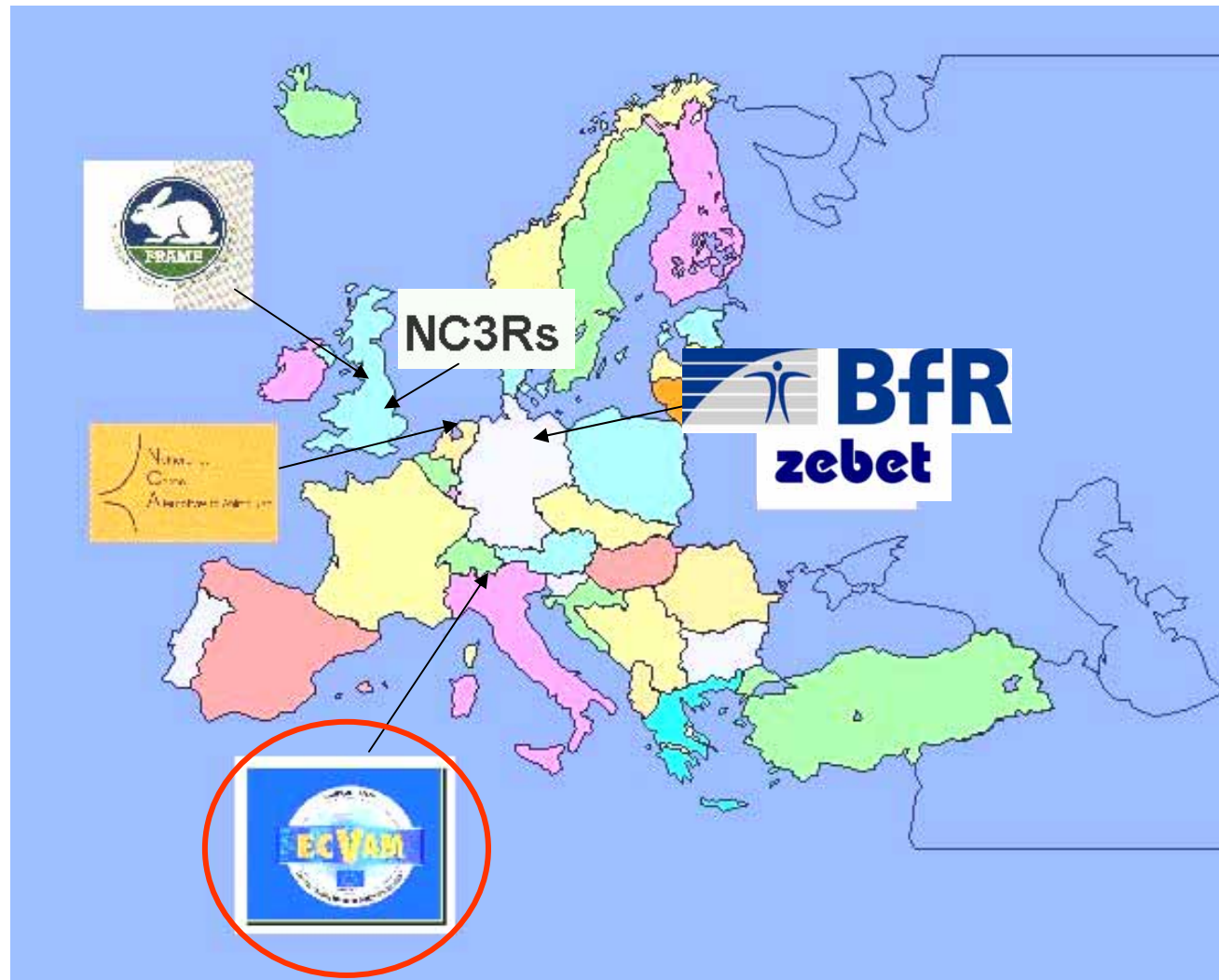
Beziehung zu Ministerien



VORSTELLUNG: AUFGABEN [MISSION STATEMENT]

- Aufbau einer Datenbank und eines Informationsdienstes über Alternativmethoden, national & international
- Entwicklung von Alternativmethoden nach dem "3R Prinzip" von Russel und Burch (1959)
- Förderung der Forschung über Alternativmethoden
- Koordinierung von Validierungsstudien
- Kooperation mit nationalen & internationalen Institutionen, die Forschung und Validierungsstudien fördern
- Forum für Informationen über Alternativmethoden, national & international
- NEU 2006: Nationales Referenzlabor für Alternativmethoden als Partner von des EC Referenzlabors CORRELATE

VORSTELLUNG: PARTNER



ICCVAM
1995
NICEATM
1998
USA

JaCVAM
2005
JAPAN

vitryna
2001
POLEN

INHALT

Vorstellung: BfR und ZEBET

Vorgeschichte : Weissbuch

Ziele von WB und REACH

Wesentliche Elemente von REACH

Die BfR Positionen zu REACH

REACH im Wandel der Zeit

REACH und vertikale Spezialregelungen

ZUR ERINNERUNG: REACH “ERFINDER“

- **R**egistration
 - **E**valuation
 - **A**uthorisation
- } of **C**hemicals

DG Environment



Margot Wallström

DG Enterprise



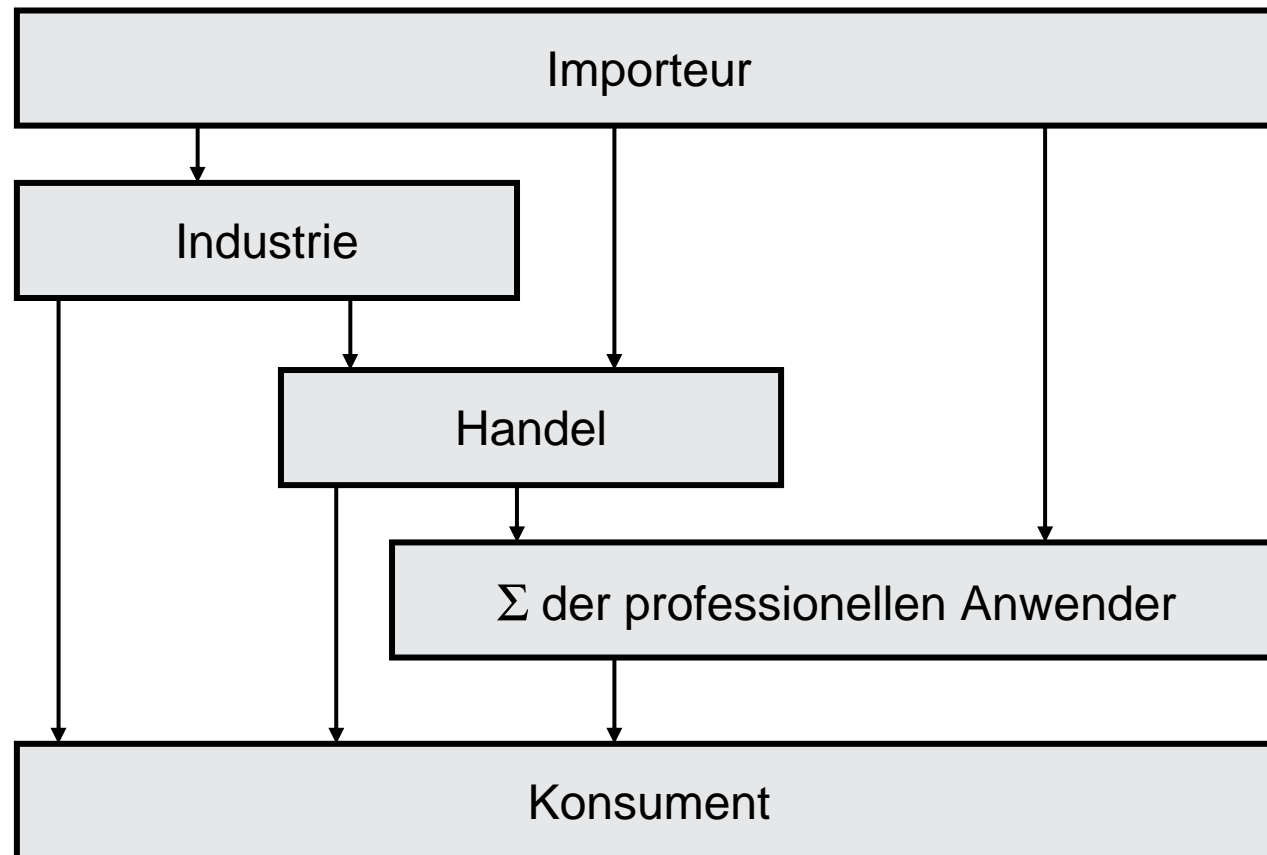
Erkki Liikanen

REACH, HAUPTZIELE:

- **Einheitliches System für Neue & Alte Stoffe**
 - Registrierung aller Stoffe > 1 t/a
 - Registrierung von Altstoffen
 - Gefährliche Stoffe (z.B. CMR) werden gesondert bewertet und zugelassen
 - Förderung der Substitution gefährlicher Stoffe
- **Verlagerung der Verantwortung**
für Prüfung und Risikobewertung von Behörden auf Industrie
- **Förderung der Innovation**
und des Wettbewerbes der Chemischen Industrie
- **Informationen über Chemikalien**
über Verwendungszwecke & Exposition durch Industrie, Importeure, Händler und nachgestaltete Anwender
- **Vermeidung zusätzlicher Tierversuche**
wo immer möglich, durch Nutzung aller Informationsquellen

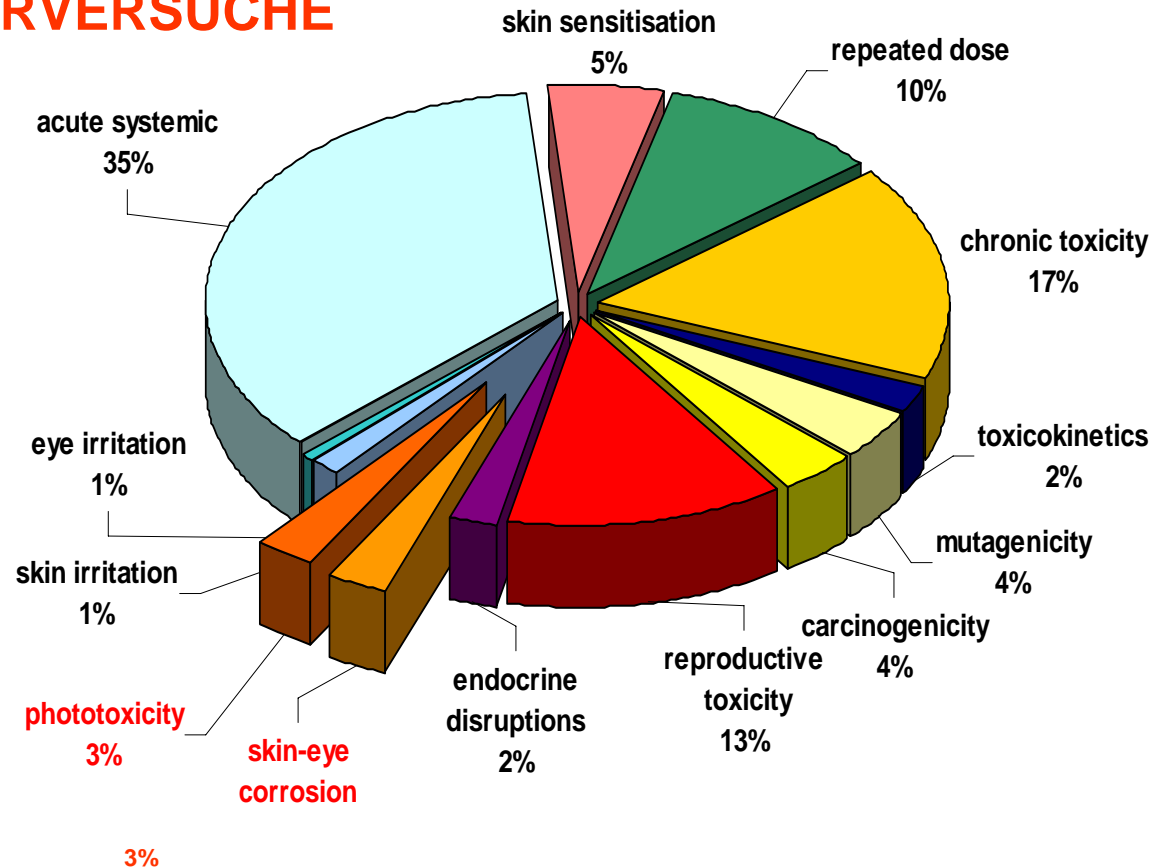
REACH, HAUPTPROBLEM (1):

KOMPLEXE WERTSCHÖPFUNGSKETTEN



REACH, HAUPTPROBLEM (2):

NEUE TIERVERSUCHE



EU Tierverbrauch Toxikologie (1999)

(3rd Commission Report on the Statistics on the Number of Animal Used for Experimental and Other Scientific Purposes in the EU)

JRC/IHCP SCHÄTZUNG (2004)



± BESTÄTIGT: BfR SCHÄTZUNG (2004)

Arch Toxicol (2004) 78: 549–564
DOI 10.1007/s00204-004-0577-9

REGULATORY TOXICOLOGY

Thomas Höfer · Ingrid Gerner · Ursula Gundert-Remy
Manfred Liebsch · Agnes Schulte · Horst Spielmann
Richard Vogel · Klaus Wettig

Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed new European chemicals regulation

Received: 10 January 2004 / Accepted: 8 April 2004 / Published online: 29 May 2004
© Springer-Verlag 2004

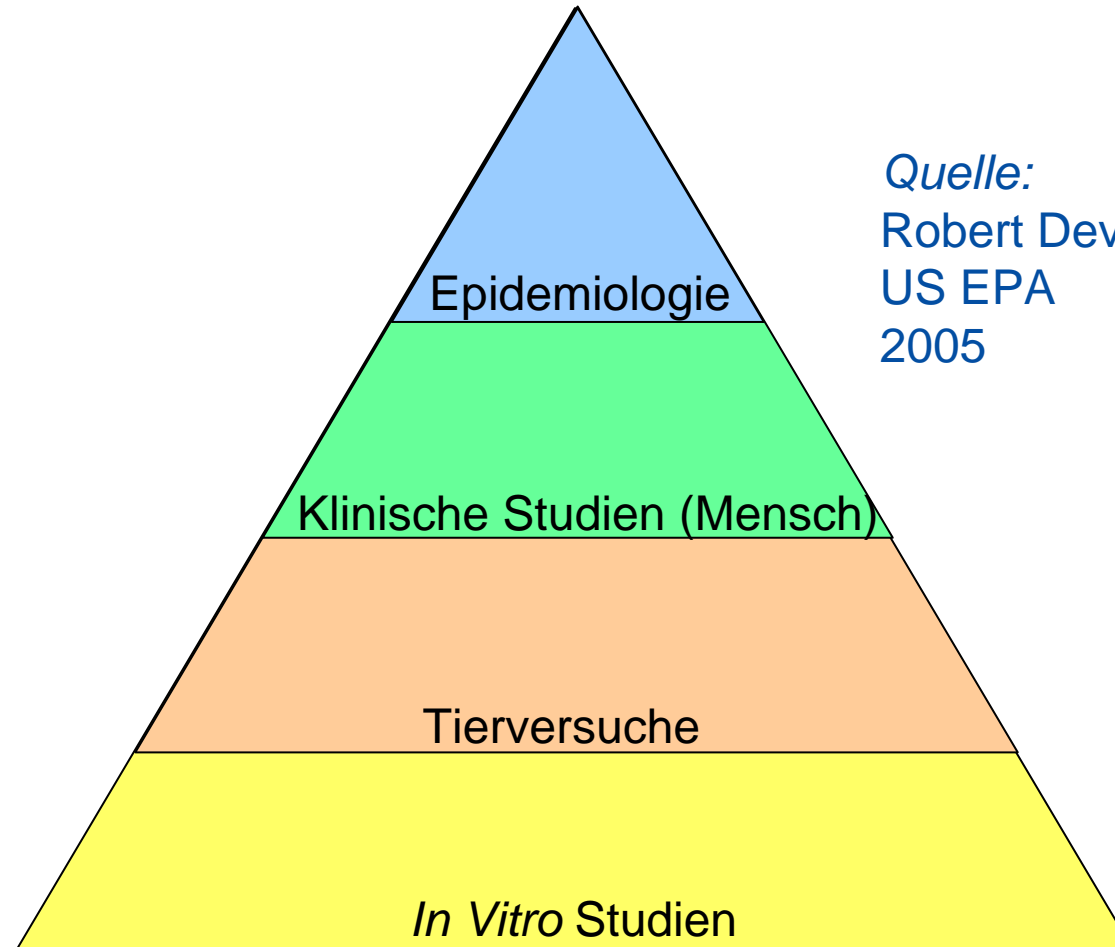
Abstract During the past 20 years the EU legislation for the notification of chemicals has focussed on new chemicals and at the same time failed to cover the evaluation of existing chemicals in Europe. Therefore, in a new EU chemicals policy (REACH, Registration,

Introduction

In 2001, the European Commission published a policy statement on future chemicals regulation and risk

worst case: + 45 000 000 Tiere
optimistic case: + 7.5 000 000 Tiere
best case: + 1.5 000 000 Tiere

ROLLE DER *IN VITRO* TOXIKOLOGIE

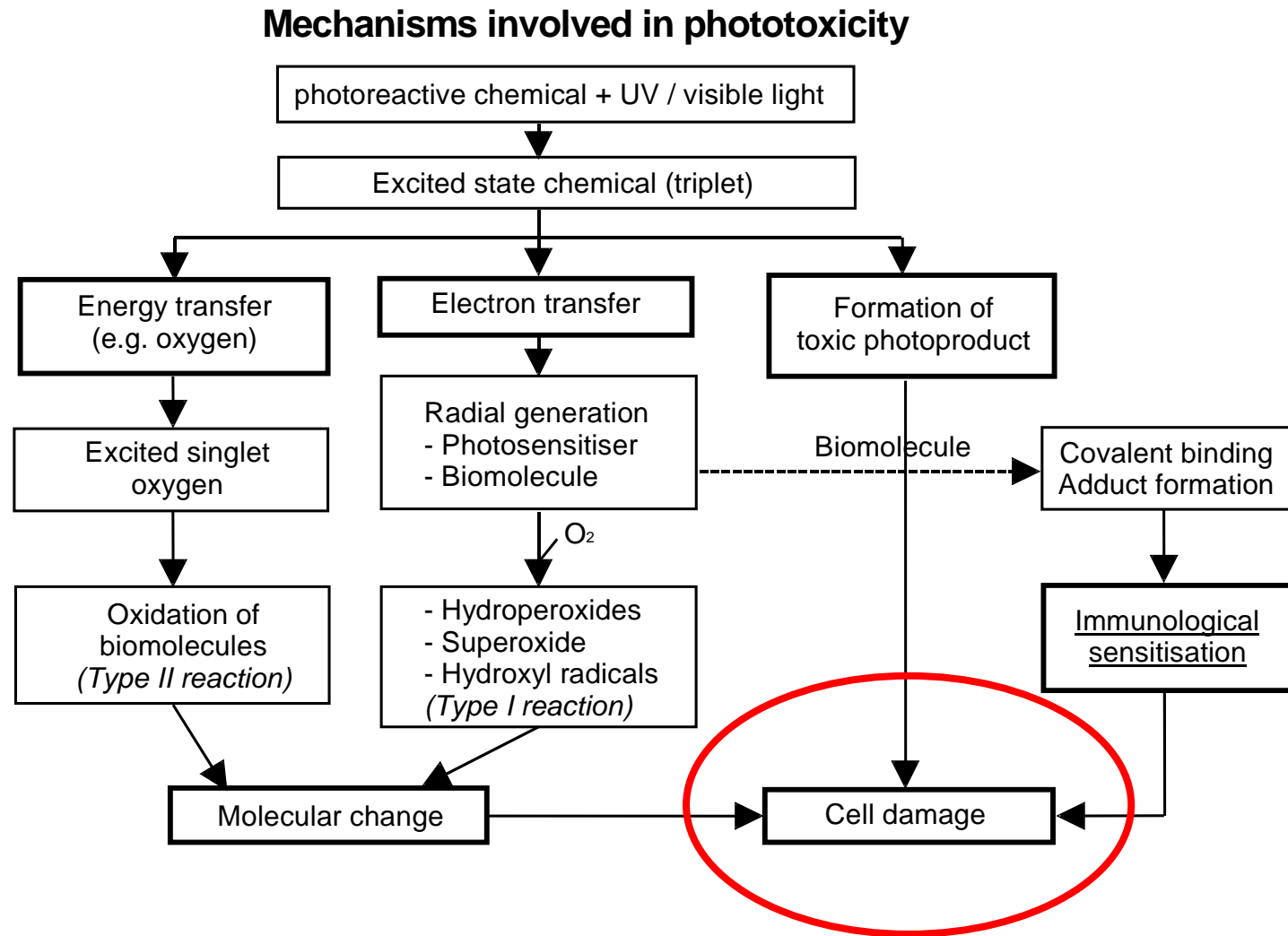


Quelle:
Robert Devlin
US EPA
2005

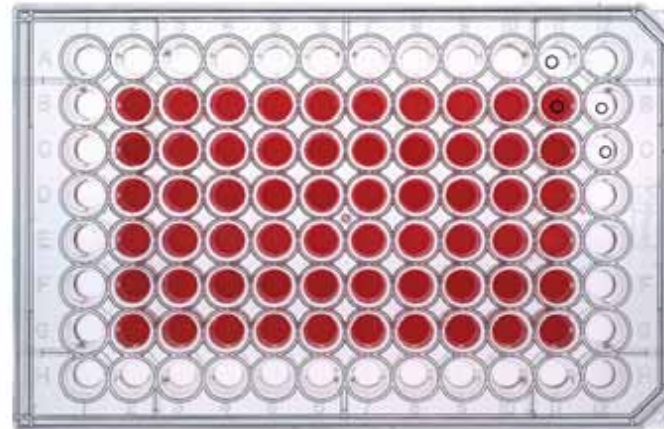
TESTSTRATEGIE: *in vitro* Zelle → *in vitro* Organmodell



PHOTOTOXIZITÄT: MECHANISMEN BEKANNT



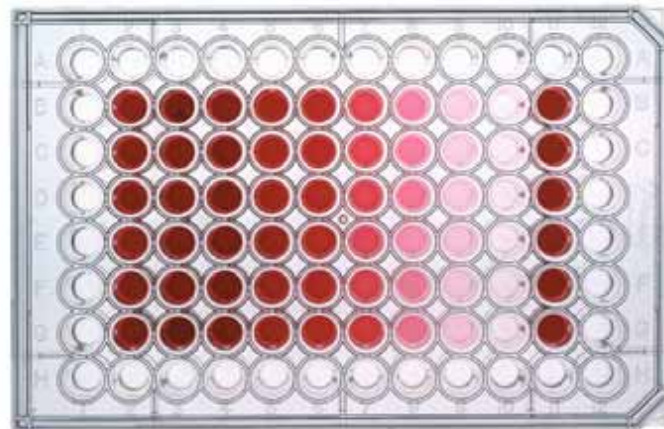
PHOTOTOXIZITÄT *IN VITRO*: 3T3 NRU PT (OECD 432)



Ketoprofen -UV

Reihe 2 - 10 =
0 - 500 µg/ml

Reihe 1 & 11 =
Negativkontrolle

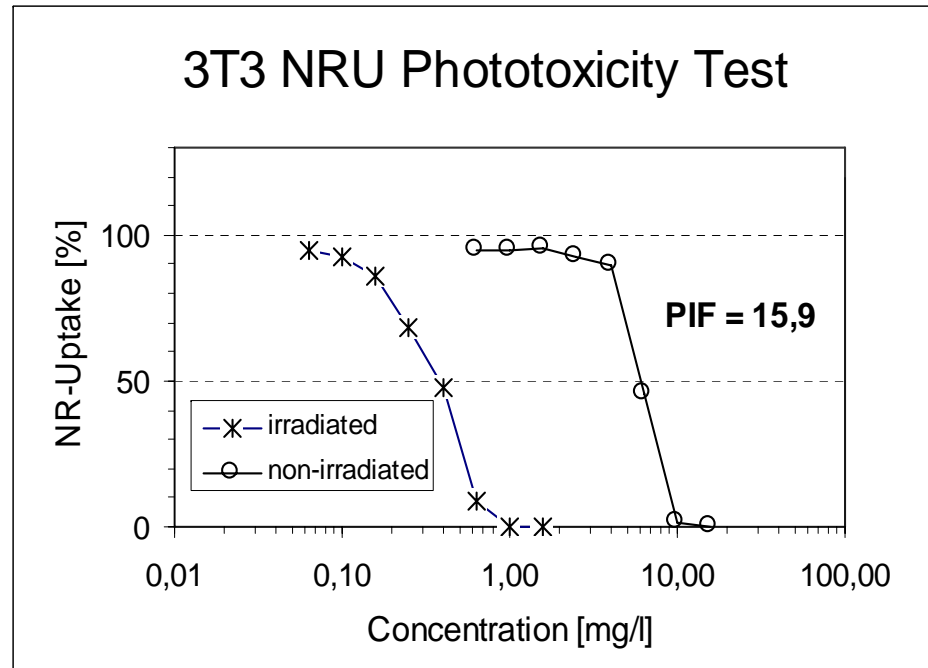
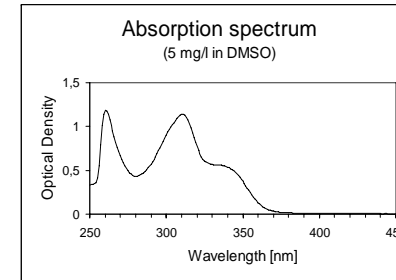
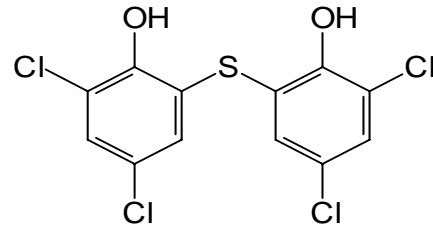


Ketoprofen +UV

Reihe 2 - 10 =
0 - 10 µg/ml

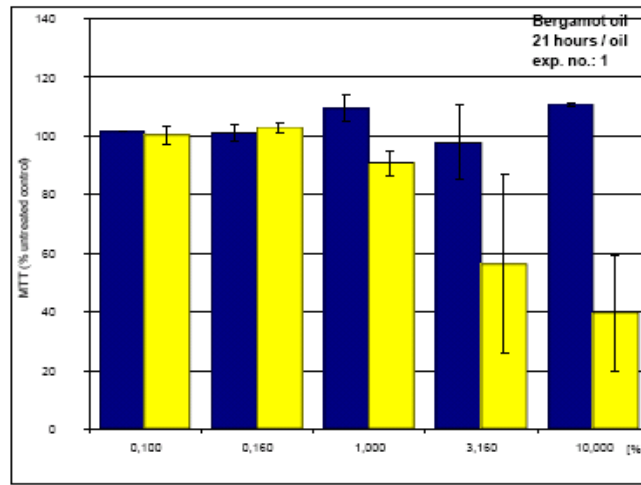
Reihe 1 & 11 =
Negativkontrolle

PHOTOTOXIZITÄT *IN VITRO*: 3T3 NRU PT (OECD 432)

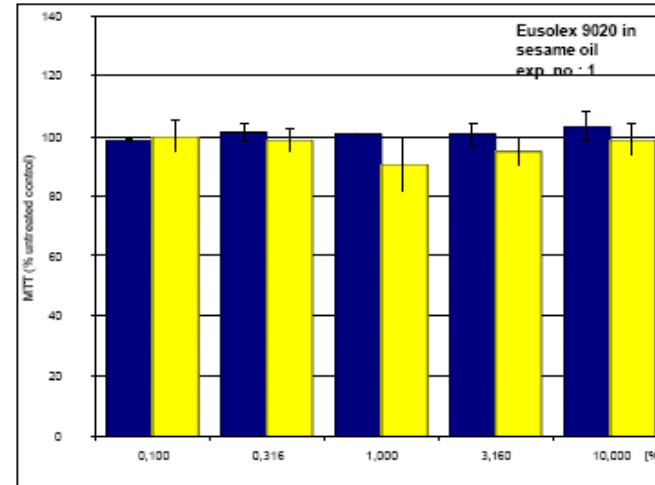


Bithionol: Quelle: Beiersdorf AG

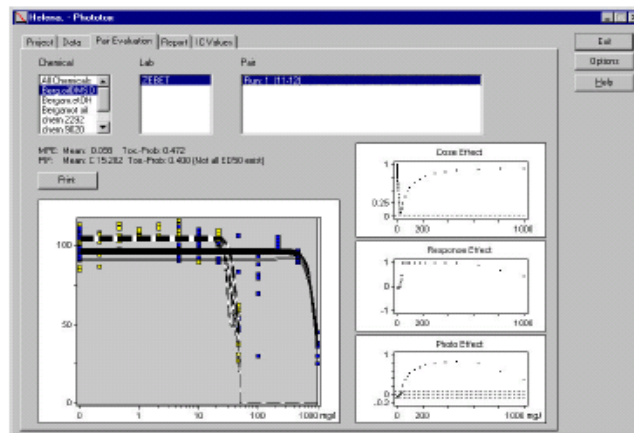
STRATEGIE: 1. Zelluläre Phototox (3T3 NRU PT)
wenn positiv: 2. Phototox an menschl. Hautmodell



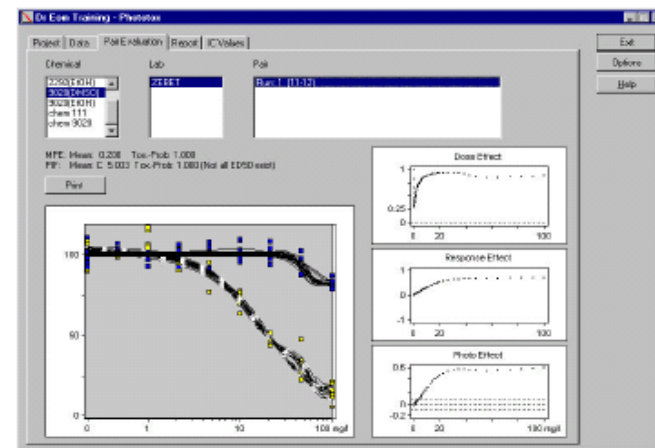
Positivkontrolle A: Bergamottöl, phototoxisch im Hautmodell topisch ab 3,16 % (Vehikel Sesamöl)



Eusolex 9020, absolut unauffällig im Hautmodell topisch bis 10% (Vehikel: Sesamöl)



Pos. Kontr A: Bergamottöl im 3T3NRU PT: phototoxisch $IC_{50} + UV$ bei $\sim 50 \mu g/ml$ Medium



Eusolex 9020, phototoxisch im 3T3NRU PT $IC_{50} + UV$ bei $\sim 15 \mu g/ml$ Medium

WARUM DIESES BEISPIEL ?

Weil es deutlich macht, dass auch gut entwickelte und validierte mechanistisch basierte zelluläre *in vitro* Tests nur die inhärente Eigenschaft (toxisches Potential) eines Stoffes richtig vorhersagen.

Erst durch *in vitro* Modellierung der *in vivo* Biokinetik (Bioverfügbarkeit in der Haut und Metabolismus) in einem rekonstruierten 3D menschlichen Hautmodell können falsch positive Befunde ausgeschlossen werden.


DESHALB: BfR POSITIONEN (2005)

Bundesinstitut für Risikobewertung



EU-Chemikalienrecht und Verbraucherschutz

Proceedings zum ersten BfR-Forum Verbraucherschutz am 23. und 24. Juni 2005*

- I. Neue Konzepte für sichere Chemieprodukte. Bewertung von Stoffen: Eigenschaften und Expositionen
- II. Alternative Testverfahren und intelligente Teststrategien 
- III. Schafft REACH den informierten Verbraucher?

BfR Positionen zu REACH (2005)

Position 1

In vitro-Methoden werden in der Zukunft preiswerter und schneller durchzuführen sein als Tierversuche. Das macht validierte *in vitro*-Methoden attraktiv für die Erstellung toxikologischer Basisinformationen.

Position 2

Bei Stoffen mit einer Jahresproduktion von weniger als einer Tonne müssen toxikologische Grunddaten mit *in vitro*-Methoden erhoben werden.

Position 3

Bei Stoffen mit einer Jahresproduktion von 1 bis 10 Tonnen müssen zusätzliche toxikologische *in vitro*-Prüfungen durchgeführt werden.

BfR Positionen zu REACH (2005)

Position 5

Daten aus *in vitro*-Zytotoxizitätstests können zur Abschätzung der akuten oralen Toxizität eingesetzt werden.

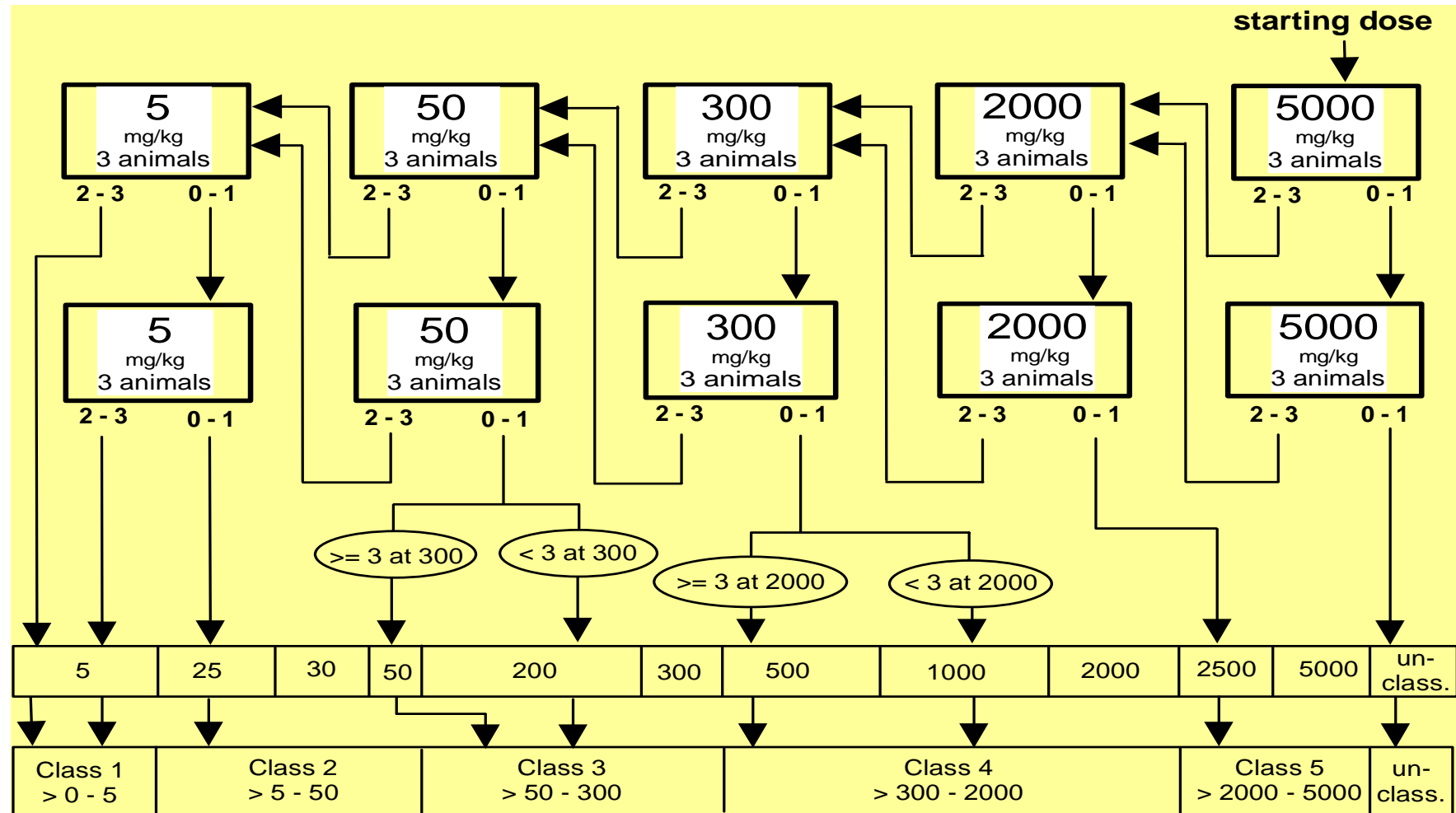
BEISPIEL:

BfR “Starting Dose Approach” für die OECD TG 423 (ATC) und die OECD TG 425 (UDP) zur Ermittlung der akuten oralen Toxizität

Einsparung von Tieren durch sequentielles Testen *in vitro* und *in vivo*.

Für untoxische Stoffe sehr sichere Vorhersage, d.h. (vollständiger Ersatz des TV möglich)

PRINZIP DER "ACUTE TOXIC CLASS (ATC)" METHODE



Je weiter die Startdosis von der „wahren“ LD50 entfernt ist, desto mehr Tiere werden gebraucht, bis eine Klassifizierung der Toxizität möglich ist.

ZYTOTOXIZITÄT ZUR VORHERSAGE VON AKUTER ORALER TOXIZITÄT (1)

ATLA 31, 89-198, 2003

89

The Registry of Cytotoxicity: Toxicity Testing in Cell Cultures to Predict Acute Toxicity (LD50) and to Reduce Testing in Animals¹

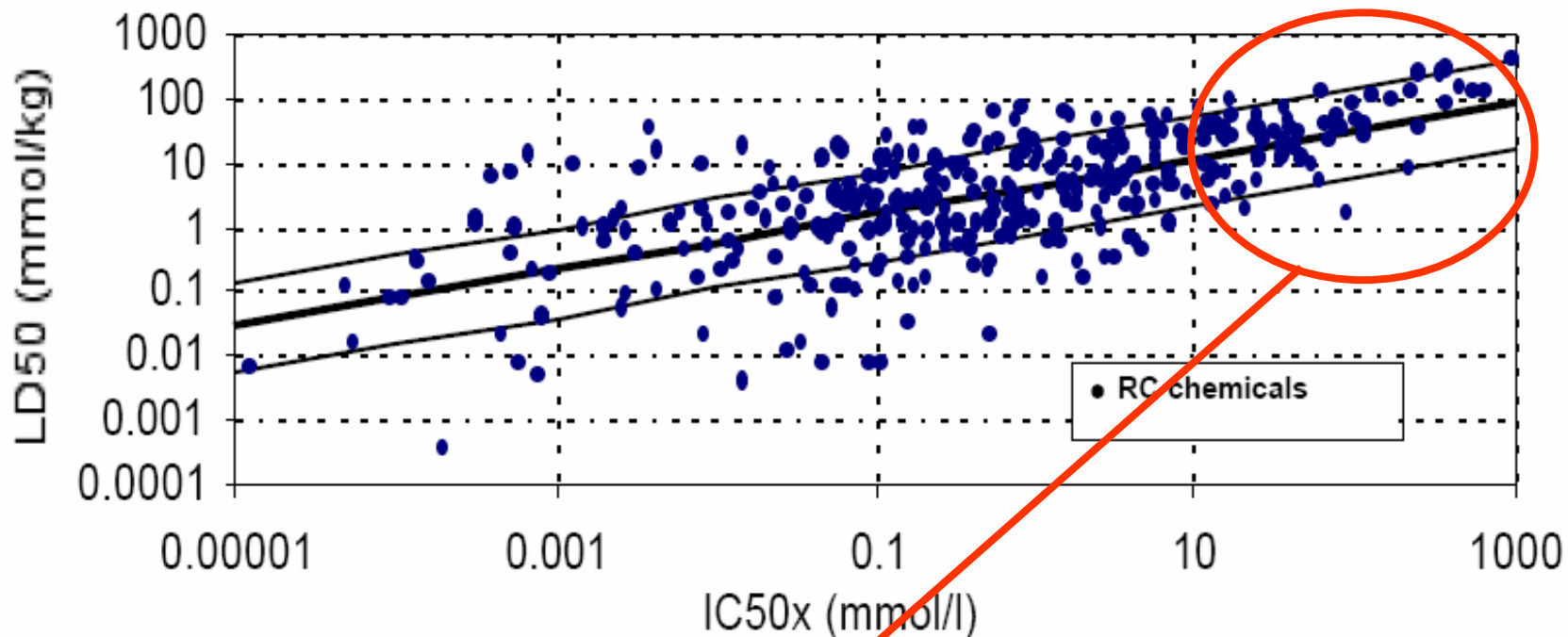
Willi Halle

c/o ZEBET at the BfR, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, Germany

Translated by Marlies Halder,² Andrew Worth,^{2,3} and Elke Genschow⁴

²European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), Institute for Health & Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, 21020 Ispra (VA), Italy; ⁴ZEBET at the BfR, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin, Germany

ZYTOTOXIZITÄT ZUR VORHERSAGE VON AKUTER ORALER TOXIZITÄT (2)



Toxizität von Neustoffen	
LD ₅₀ [mg/kg]	chemicals [%]
≤ 25	0
> 25 - 200	3.1
>200 - 2000	21.1
>2000	75.8

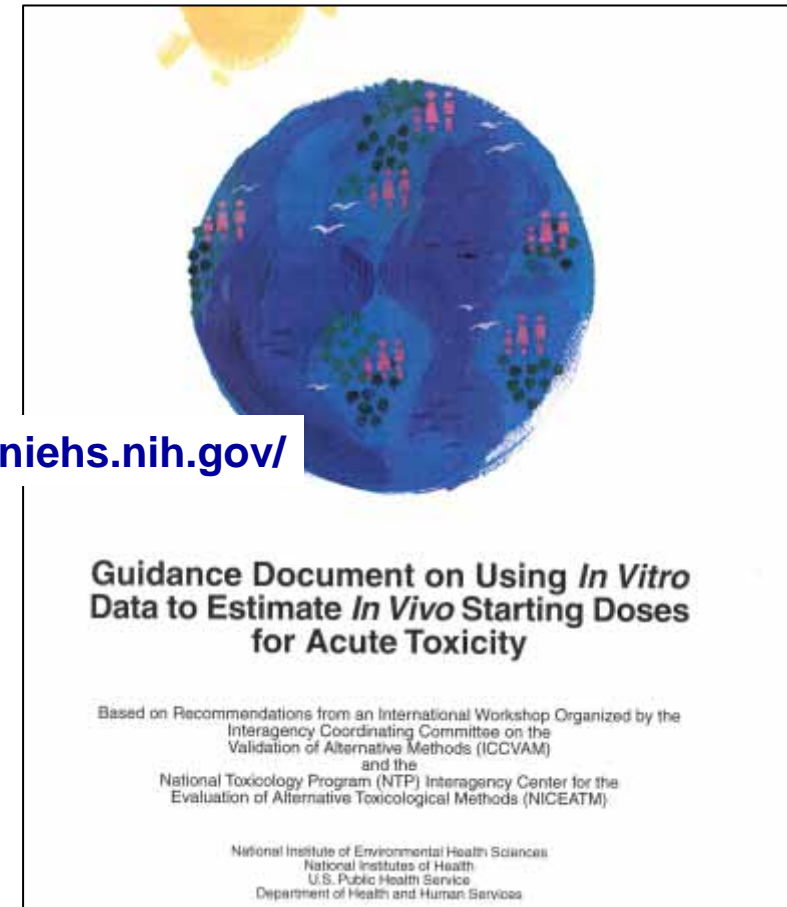
In diesem Bereich liegen ca. 97% aller Industriechemikalien

Vorhersagemodell:
 $\log(\text{LD}_{50}) = 0.435 \times \log(\text{IC}_{50x}) + 0.625$

ZYTOTOXIZITÄT ZUR VORHERSAGE VON AKUTER ORALER TOXIZITÄT (3)



NIH Publikation No: 01-4499



NIH Publikation No: 01-4500

DRAIZE TEST

am

Kaninchenauge

PRINZIP: Applikation von 100mg oder 100 µl
Testsubstanz in das Auge eines Kaninchens

BEOBACHTUNG: bis zum Abklingen der
Symptome (max. 3 Wochen)

BEURTEILUNG: CORNEA *Trübung, ggf. Fläche*
IRIS
KONJUNKTIVA
Rötung, Schwellung ggf. Tränenfluß

BfR Position 6

Vorhandene *in vitro*-Methoden zur Prüfung auf Haut- und Augenschädigungen sind einzusetzen. Zusammen mit Aussagen der im BfR entwickelten Expertensysteme DSS und SICRET können diese Tierversuche ersetzt werden.

Trotz vieler aufwändiger internationaler Validierungsstudien in den Jahren 1988 - 1998:

Der Draize Test am Kaninchenaugauge konnte bisher noch nicht vollständig ersetzt werden.

Der **HET-CAM** und 3 weitere Alternativmethoden (**BCOP**, **ECE**, und **IRE**) werden aber in der EU behördlich zur Vorhersage starken Augereizpotentials (R41) anerkannt.

Wenn die *in vitro* Tests schwaches oder kein Reizpotential (R36 oder „nicht R36“) vorhersagen, muß der Draize Test mit 1-3 Kaninchen durchgeführt werden.

BfR Position 6

Vorhandene *in vitro*-Methoden zur Prüfung auf Haut- und Augenschädigungen sind einzusetzen. Zusammen mit Aussagen der im BfR entwickelten Expertensysteme DSS und SICRET können diese Tierversuche ersetzt werden.

- Derzeit werden alle vorhandenen Publikationen zum HET-CAM, BCOP, ECE und IRE von den US amerikanischen Behörden (ICCVAM) einem Review unterzogen.
- ECVAM untersucht in gleicher Weise die zellulären *in vitro* Tests auf Augenreizung
- Ziel ist dabei unter anderem, zu klären, ob sich diese Verfahren, z.B. in Kombination mit (Q)SAR auch zur Erkennung nicht augenreizender Stoffe eignen.
- Das Ergebnis der Analysen steht noch aus

OECD/OCDE

404

Adopted:
24th April 2002

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Acute Dermal Irritation/Corrosion

INTRODUCTION

1. OECD Guidelines for Testing of Chemicals are periodically reviewed to ensure that they reflect the best available science. In the review of this Guideline, special attention was given to possible improvements in relation to animal welfare concerns and to the evaluation of all existing information on the test substance in order to avoid unnecessary testing in laboratory animals. This updated version of Guideline 404 (adopted in 1981 and first revised in 1997) includes the recommendation that prior to

Neu seit 2002: sequentielle Teststrategie

BfR Position 6

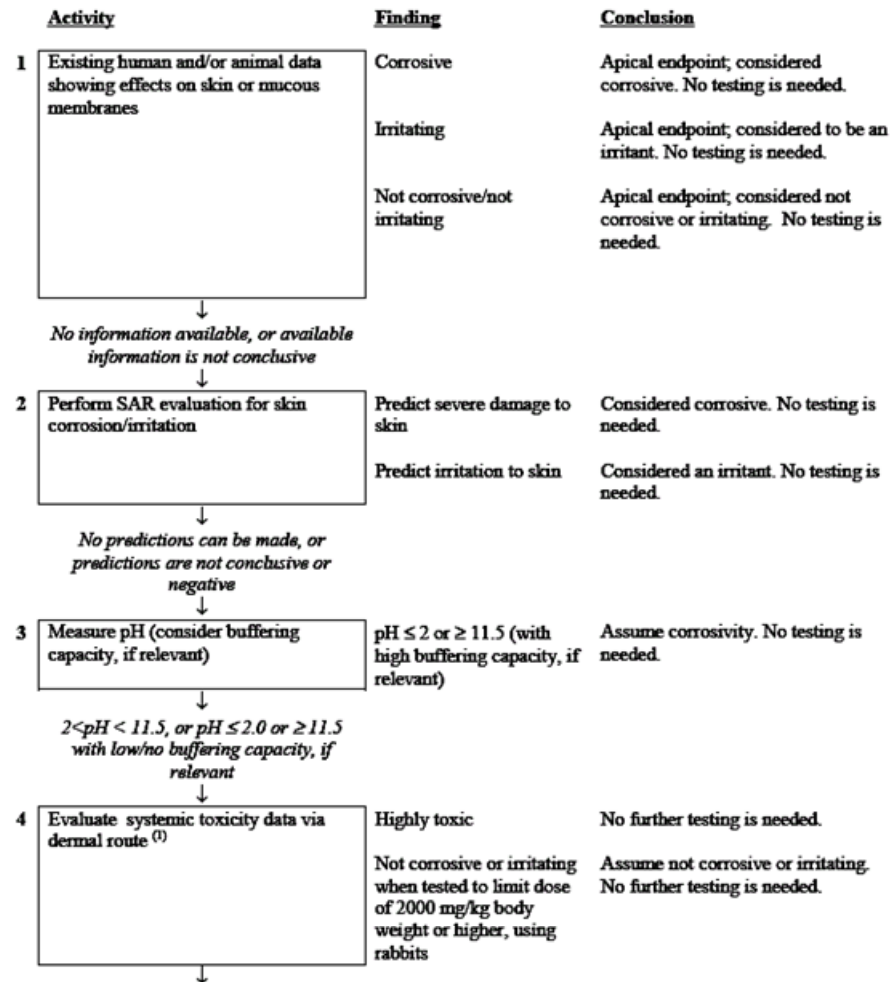
Vorhandene *in vitro*-Methoden zur Prüfung auf Haut- und Augenschädigungen sind einzusetzen. Zusammen mit Aussagen der im BfR entwickelten Expertensysteme DSS und SICRET können diese Tierversuche ersetzt werden.

1. Daten vom Menschen und aus Tierversuchen

2. Struktur-Wirkungs-Beziehungen

3. pH und Alkalireserve

4. Daten von dermalen Toxizitätsprüfungen



BfR Position 6

Vorhandene *in vitro*-Methoden zur Prüfung auf Haut- und Augenschädigungen sind einzusetzen. Zusammen mit Aussagen der im BfR entwickelten Expertensysteme DSS und SICRET können diese Tierversuche ersetzt werden.

Verfügbar!

EU B.40 / bis
OECD 430
OECD 431

**Wird derzeit
validiert**

Federführung:

BfR

Ziel:

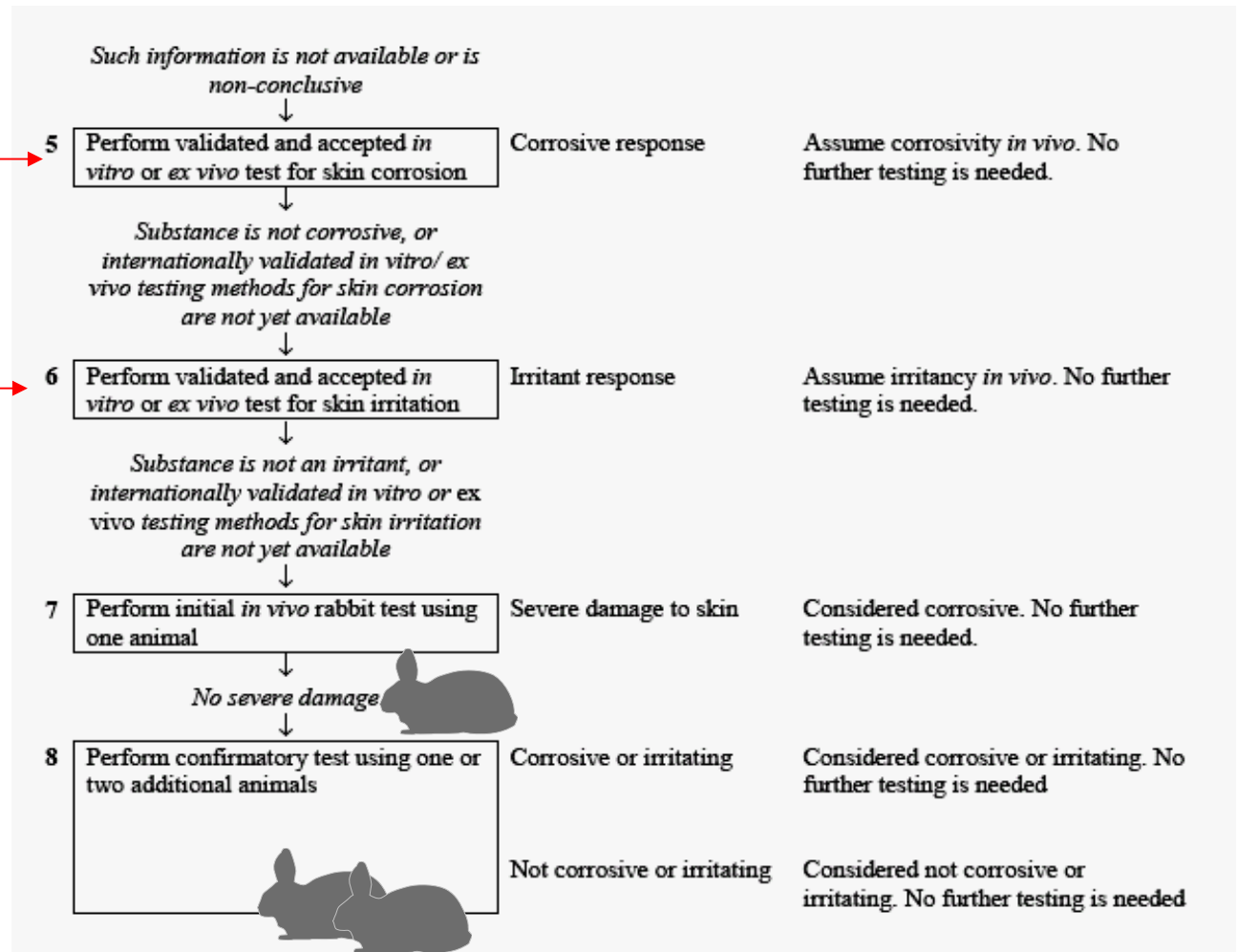
Differenzierung
von R38 und nicht
reizenden Stoffen

Aussichten:

positiv

für vollständigen

Tier-Ersatz



Hautreizung / -ätzung: Neue Tierversuchsfreie BfR Strategie (SICRET)

The Skin Irritation Corrosion Rules Estimation Tool (SICRET)

John D. Walker¹ Ingrid Gerner²; Etje Hulzebos³; and Kerstin Schlegel²

¹TSCA Interagency Testing Committee (ITC), OPPT (7401), U.S. **E.P.A.**, Washington D.C., USA

²Federal Institute for Risk Assessment (**BfR**), Department Assessment of Chemicals, Berlin, Germany

³National Institute for Public Health and the Environment (**RIVM**), Center for Substances and Risk, Bilthoven, Netherlands

QSAR & Combinatorial Science (2004)

**Validiert 2005 mit 200 neuen Stoffen nach
OECD Regeln durch das RIVM (NL) im Auftrag
des ECB**

Hautreizung / -ätzung: Neue Tierversuchsfreie BfR Strategie (SICRET)

PRINZIP

LIMIT-RULES

für negative Vorhersagen (nicht R34, nicht R35, nicht R38)

STRUCTURAL ALERTS

für positive Vorhersagen (R34, R35, R38)

IN VITRO METHODEN

für R34, R35 und R38 Vorhersage, wo weder limit rules überschritten werden, noch structural alerts vorhanden sind.

SICRET Examples (1)

LIMIT RULES (for **negative** prediction)

IF melting point > 200°C

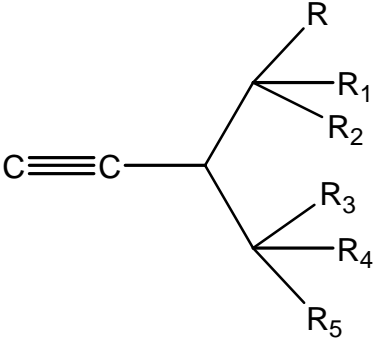
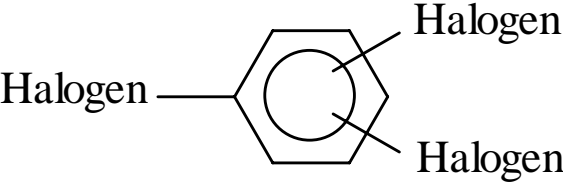
THEN NOT IRRITATING OR CORROSIVE TO SKIN (NOT R34, R35 or R38)

IF $\log P_{ow}$ or $\log K_{ow} < -3.1$

THEN NOT IRRITATING OR CORROSIVE TO SKIN (NOT R34, R35 or R38)

SICRET Examples (2)

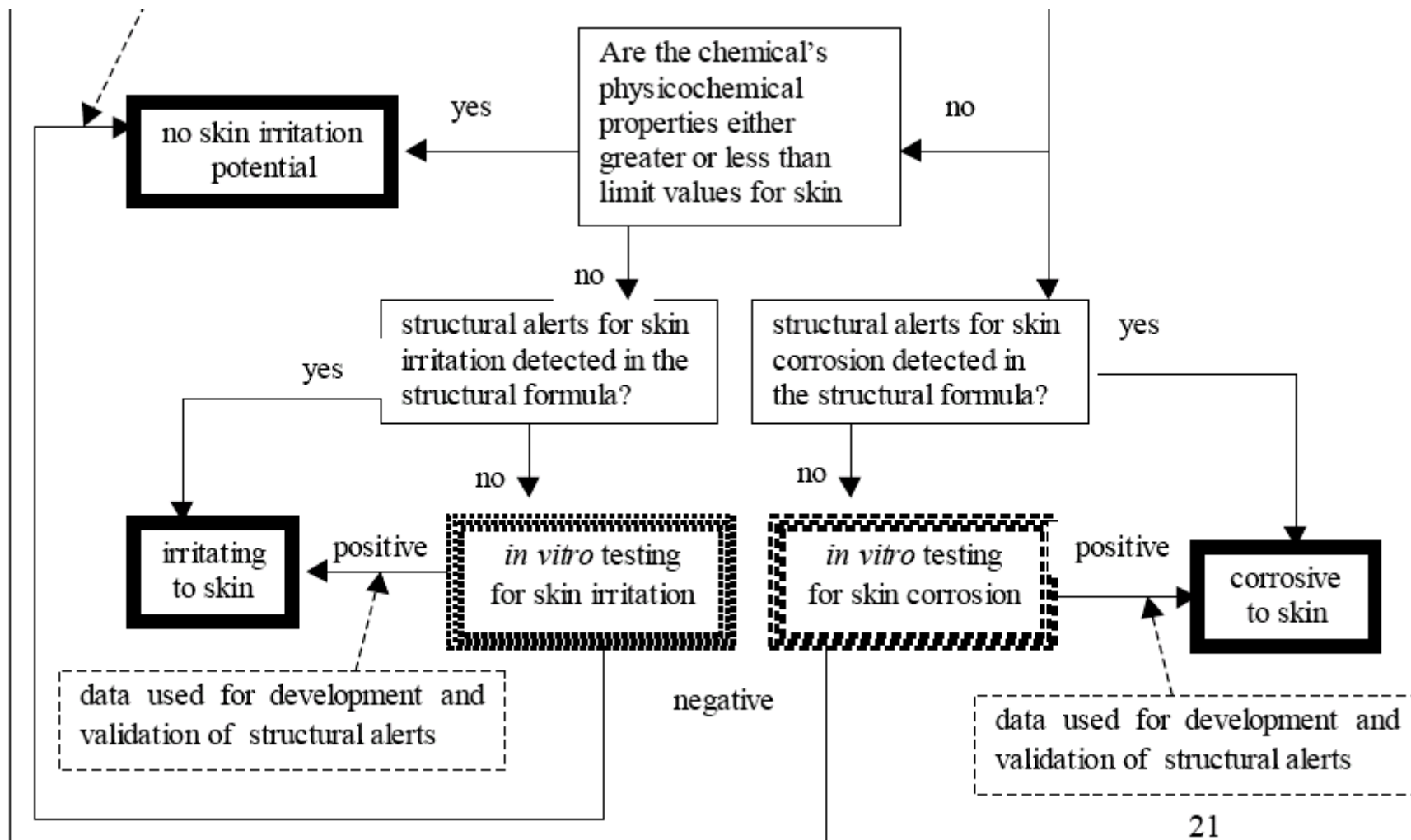
STRUCTURAL ALERTS (for **positive** prediction)

Alpha-alkynes		Likely to cause skin irritation
Tri- and tetra-halogenated benzenes		Likely to cause skin irritation

R-R5 can be any kind of group

Halogen = F, Cl or Br

SICRET STRATEGIE (nur der untere Teil gezeigt)



Haut und Augenreizung

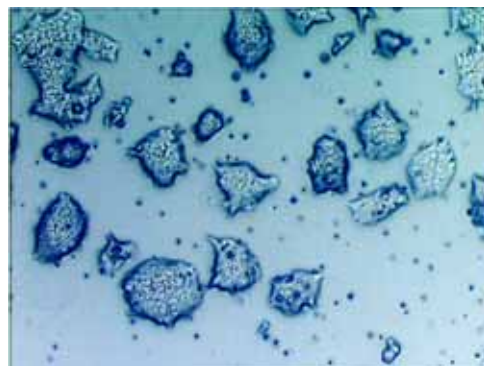
in beiden Fällen sequentielle Kombination von:

- 1 Q(SAR) structural alerts
- 2 in vitro Methoden für irreversible Schäden (Ätzung)
- 3 physiko-chemische Ausschlussregeln
- 4 in vitro Methoden für reversible Schäden (Reizung)

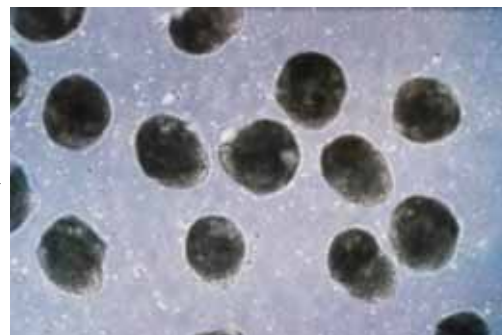
Position 8

Tierversuchsfreie Prüfmethode für die Reproduktionstoxizität wurden u.a. im BfR entwickelt. Forschung und Validierung werden in einem Großprojekt der EU weitergeführt. Hierdurch können in absehbarer Zeit Tierversuche, die hohe Tierzahlen erfordern, eingeschränkt oder ersetzt werden können.

Der Embryonale Stammzell Test (EST)



Day 0:
undifferentiated D3-
stem cells



Day 3-5:
in vitro differentiation
„embryoid body“ formation



Day 5-10:
in vitro differentiation
microscopic analysis of
contracting cardiomyocytes

ITS REPROTOX 2006: Vorschlag für Pestizid Prüfung

Critical Reviews in Toxicology, 36:69–98, 2006
Copyright © Taylor and Francis Group, LLC
ISSN: 1040-8444 print / 1547-6898 online
DOI: 10.1080/10408440500541367



A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment

Ralph L. Cooper

*U.S. Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory,
Research Triangle Park, North Carolina, USA*

James C. Lamb, IV

THE WEINBERG GROUP, INC., Washington, DC, USA

Sue M. Barlow

Independent Consultant in Toxicology, Brighton, United Kingdom

Karin Bentley

DuPont Crop Protection, Newark, Delaware, USA

Angela M. Brady

Syngenta CTL, Macclesfield, United Kingdom

Nancy G. Doerrer

ILSI Health and Environmental Sciences Institute, Washington, DC, USA

David L. Eisenbrandt

Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana, USA

ZUSAMMENFASSUNG

- Die bereits jetzt oder in naher Zukunft einsetzbaren alternativen Prüfverfahren liegen im Bereich der akuten-systemischen und akuten-lokalen Toxizität.
- Alternative Verfahren liefern andere Antworten, als Tierversuche. Sie können rascher und billiger durchgeführt werden.
- Validierungsstudien haben das Ziel, den Arbeitsschutz und gesundheitlichen Verbraucherschutz mit den neuen tierversuchsfreien Methoden unverändert sicherzustellen.
- Im 6. Und 7. Rahmenprogramm der EU Forschungsförderung müssen erhebliche Mittel zur Weiterentwicklung und Validierung von alternativen Testmethoden zur Verfügung gestellt werden.

Der Prozess der Validierung bis zur internationalen Akzeptanz dauert sehr lang. Es vergehen dabei 7-10 Jahre...
....für viele unakzeptabel langsam...

...aber außer dem wissenschaftlichen Streben nach einer "neuen" Toxikologie gibt es genug politischen Druck, der dazu beiträgt, dass wir beschleunigt neue Wege suchen !

Danke für Ihre Aufmerksamkeit !

Manfred Liebsch
Horst Spielmann

BfR

Alternativmethoden zu Tierversuchen - ZEBET

Bundesinstitut für Risikoberwertung

Diedersdorfer Weg 1 ● D-12277 Berlin

Tel. +49 30-8412-2278 ● Fax +49 30-8412-2958

liebsch.zebet@bfr.bund.de ● www.bfr.bund.de