



2. REACH Symposium

**GD Gesellschaft für Dermopharmazie in
Kooperation mit dem
Bundesinstitut für Risikobewertung BfR**

am 22. November 2007 in Berlin

Alternativmethoden zum Tierversuch

Horst Spielmann

Freie Universität Berlin
& Bundesinstitut für Risikobewertung BfR, Berlin

Themen

- I. **Initiativen der EU zur Reduzierung sicherheitstoxikologischer Tierversuche:
7. Änderung der EU Kosmetikrichtlinie & EU REACH Verordnung**
- II. **Beispiele von etablierten Alternativmethoden, die unter Federführung von ECVAM experimentell validiert wurden**
- III. **Lokale Toxizität – der Schwerpunkt der EU Kosmetikverordnung:
Haut, Auge & QSAR**
- IV. **Reproduktionstoxikologie – der Schwerpunkt von REACH**

EU Richtlinie 86/609/EWG zum Schutz von Versuchstieren

Richtlinie des Rates zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere

24. November 1986

Artikel 7.2

Ein Tierversuch darf nicht durchgeführt werden, wenn eine wissenschaftlich fundierte tierversuchsfreie Methode zur Verfügung steht, die in der Praxis erprobt ist.

Artikel 23

Die Kommission und die Mitgliedstaaten sollen die Entwicklung und Validierung alternativer Techniken fördern die dem Tierversuch vergleichbare Ergebnisse liefern könnten, jedoch weniger Tiere erfordern und mit weniger Schmerzen verbunden sind, und treffen sonstige nach ihrer Auffassung geeignete Maßnahmen, um die Forschung auf diesem Gebiet zu fördern.

Definition Alternativmethoden

3 R KONZEPT von RUSSEL & BURCH

(1959, 1992)

The Principles of Humane Experimental Technique

- **REFINE** **VERBESSERN**

höhere Qualität der Versuche (neue Endpunkte) bei reduziertem Leiden der Tiere

- **REDUCE** **VERMINDERN**

gleiche Qualität der Aussage mit geringerer Tierzahl (Biometrie!)

- **REPLACE** **VERMEIDEN**

vollständiger Ersatz der Tierversuche

Zentren für Alternativmethoden

1981

CAAT
Hopkins

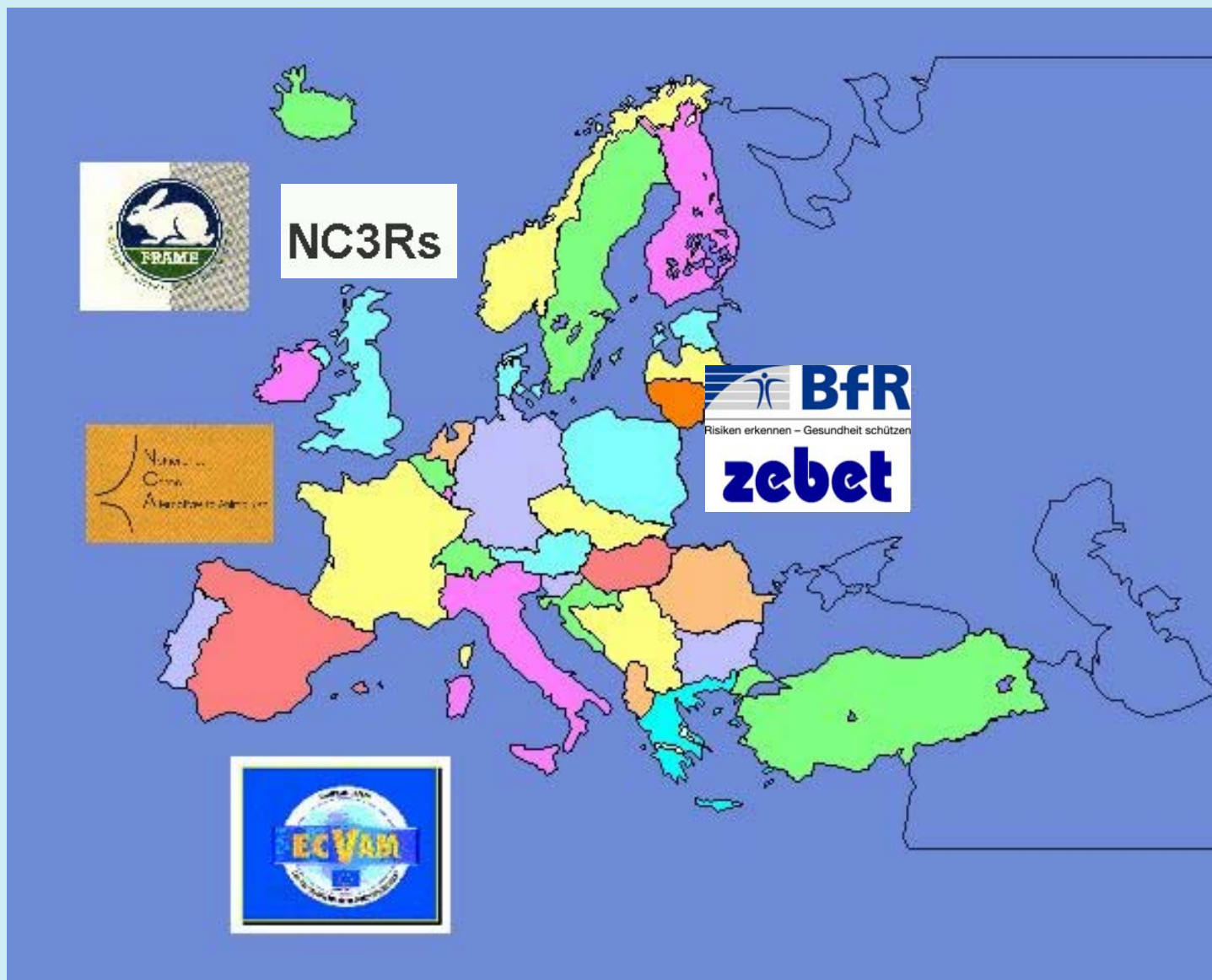
1998



ICCVAM
USA

2005

JaCVAM
Japan



2001



POLAND

Zentralstelle zur
Erfassung und
Bewertung von
Ersatz- und Ergänzungs-
methoden zum
Terversuch

National German
Centre for
Documentation and
Evaluation of
Alternatives to
Animal Experiments

BfR = Bundesinstitut für Risikobewertung
= Federal Institute for Risk Assessment



Biologische Sicherheit >>>



Lebensmittelsicherheit >>>



Sicherheit von Stoffen ... >>>



Produktsicherheit >>>

Wissenschaft im Dienst des gesundheitlichen Verbraucherschutzes

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ist die wissenschaftliche Einrichtung der Bundesrepublik Deutschland, die auf der Grundlage international anerkannter wissenschaftlicher Bewertungskriterien Gutachten und Stellungnahmen zu Fragen der Lebensmittelsicherheit und des gesundheitlichen Verbraucherschutzes erarbeitet. Das BfR formuliert, basierend auf der Analyse der Risiken, Handlungsoptionen zur Risikominderung. Das Institut nimmt hiermit eine wichtige Aufgabe bei der Verbesserung des Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit wahr. Die Bewertungen sollen für Öffentlichkeit, Wissenschaft und andere beteiligte oder interessierte Kreise transparent dargestellt und nachvollziehbar sein. Die Bewertungsergebnisse werden - unter Wahrung der Vertraulichkeit geschützter Daten - öffentlich zugänglich gemacht. [mehr >>>](#)





Verwechslungsgefahr bei Bärlauch

Bärlauch hat sich als schmackhaftes Küchenkraut in den vergangenen Jahren einer wachsenden Popularität erfreut. Das frische Kraut wird für Kräuterquark, in Suppen und Soßen oder im Salat verwendet. Aufgrund dieser Beliebtheit zieht es immer mehr Menschen in den Wald, um das herzhafte Lauchgewächs selbst zu sammeln. Wenn die Frühjahrstage im April sonniger und zunehmend wärmer werden und die Pflanzen ihren charakteristischen Duft verströmen, beginnt für viele die Bärlauch-Saison. „Obwohl der knoblauchähnliche Geruch ein typisches Kennzeichen des Bärlauchs ist, wird die Pflanze von Sammlern immer wieder mit giftigen Doppelgängern wie Maiglöckchen oder Herbstzeitlose verwechselt“, sagt BfR-Präsident Professor Dr. Dr. Andreas Hensel. Solche Verwechslungen führen laut BfR regelmäßig zu Vergiftungsfällen mit zum Teil tödlichen Folgen.

[mehr >>>](#)



Weitere aktuelle Themen

- ▶ Vertrieb und Import von Lebensmitteln inklusive Nahrungsergänzungsmitteln (Information Nr. 011/2005 des BfR vom 05.04.2005)  32 KB
- ▶ Acrylamid in Lebensmitteln – Neue Ergebnisse bei der 64. JECFA-Sitzung in Rom (Information Nr. 012/2005 des BfR vom 15.03.2005)  23,9 KB
- ▶ Übergang von Weichmachern aus Schraubdeckel-Dichtmassen in Lebensmittel (Stellungnahme Nr. 010/2005 des BfR vom 14.02.2005)  44,6 KB
- ▶ Morbus Crohn und Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (Literaturstudie des RKI und BfR vom 31.12.2003)  892,5 KB
- ▶ Girls' Day – Mädchen-Zukunftstag im BfR
- ▶ Beteiligung des Erregers der Paratuberkulose des Rindes an der Entstehung von Morbus Crohn unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen

Borsäure in Hüpfknete

Hüpfknete ist eine bei Kindern beliebte Kreuzung aus Knete und Flummi. Bei der Herstellung wird unter anderem Borsäure verwendet. Das BfR hat abgeschätzt, wie viel Bor beim Umgang mit Hüpfknete in den Körper gelangen kann. Ergebnis: Bereits beim Spielen kann es zur erhöhten Aufnahme von Borsäure kommen. Da Borsäure fruchtschädigend wirken kann, sollte der Gehalt in Spielwaren so niedrig wie möglich sein. (PDF-Datei, 48,2 KB) [mehr >>>](#)

Alternativen zum Nachweis von Algengiften in Muscheln

Lebende Muscheln werden im Rahmen der Lebensmittelüberwachung auf Algengifte, so genannte marine Biotoxine, untersucht. Das BfR kritisiert die Anwendung eines Tests an Mäusen als routinemäßig einzusetzende Referenzmethode zum Nachweis dieser Algengifte. Das Institut hält chemisch-physikalische Messverfahren für besser

Cosmetics Industry and the 7th Amendment of the EU Cosmetics Directive



EU: 2.000 companies, 60 billion € turnover

EU: 5.000 new products per year, 25% turnover with products released within last 6 months

Marketing ban since 2003 for testing finished products in animals or not using ECVAM-validated methods

Phasing out testing in animals and stepwise marketing ban in 2009 and 2013

The Chemical Industry and REACH



**EU: 27.000 companies (96% SME),
590 billion € market = 33% of the world
market, 1,7 million workers/employees**

**REACH: 30.000 chemicals marketed at
>1 ton/year will have to be evaluated**

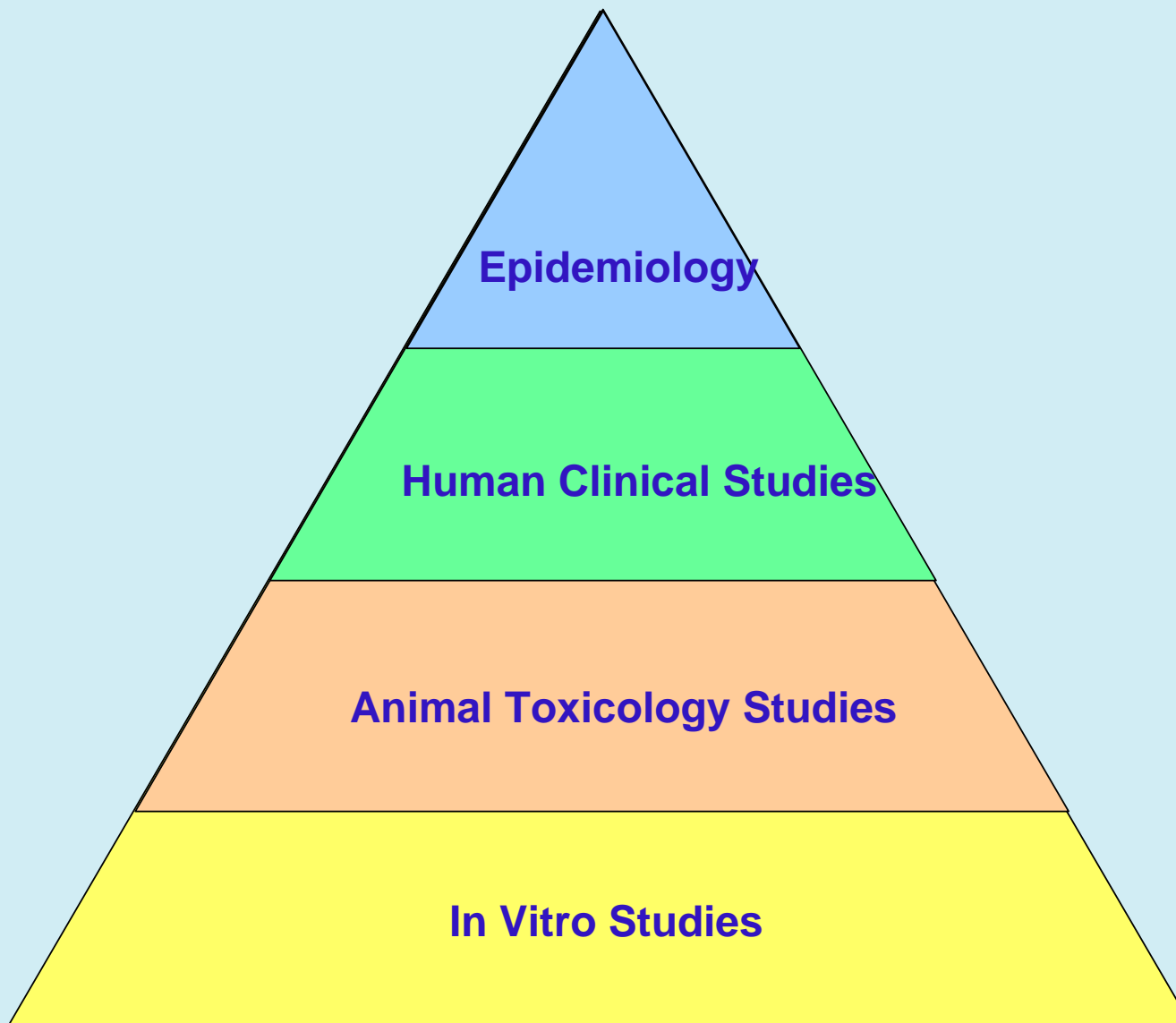
**86% of toxicological data are missing for
existing/‘old’ chemicals**

180.000 pre-registrations expected by 2009

**70% of testing must be conducted by 2011-
2017**

In Vitro Studies: What is their Role in Toxicology?

Robert Devlin US EPA, 2005



Themen

- I. **Initiativen der EU zur Reduzierung sicherheitstoxikologischer Tierversuche:
7. Änderung der EU Kosmetikrichtlinie & EU REACH Verordnung**
- II. **Beispiele von etablierten Alternativmethoden, die unter Federführung von ECVAM experimentell validiert wurden**
- III. **Lokale Toxizität – der Schwerpunkt der EU Kosmetikverordnung:
Haut, Auge & QSAR**
- IV. **Reproduktionstoxikologie – der Schwerpunkt von REACH**

KONZEPT der EXPERIMENTELLEN VALIDIERUNG

Es wurde auf dem CAAT/ERGATT Validierungs-Workshop in AMDEN (CH) 1990 entwickelt (ATLA 18, 313-337, 1990)

DEFINITION

Validation is the process by which the **reliability** and **relevance** of a procedure are established for a particular purpose.

Experimentelle Durchführung

TEST-ENTWICKLUNG

- (1) intra-labor Vergleich
 - (2) inter-labor Vergleich
 - (3) Etablierung einer Datenbasis
 - (4) unabhängige Bewertung (peer review)
- } VALIDATION

BEHÖRDLICHE ANERKENNUNG

Harmonisiertes OECD Validierungskonzept 1996 & ECVAM (EU), ICCVAM (USA)

Testentwicklung

- wissenschaftliche Basis
- Anwendungsbereich
- Testprotokoll
- Prädiktionsmodell

Prävalidierung

- Verbesserung des Testprotokolles
- Interlabor-Vergleich
- Verbesserung des Prädiktionsmodells

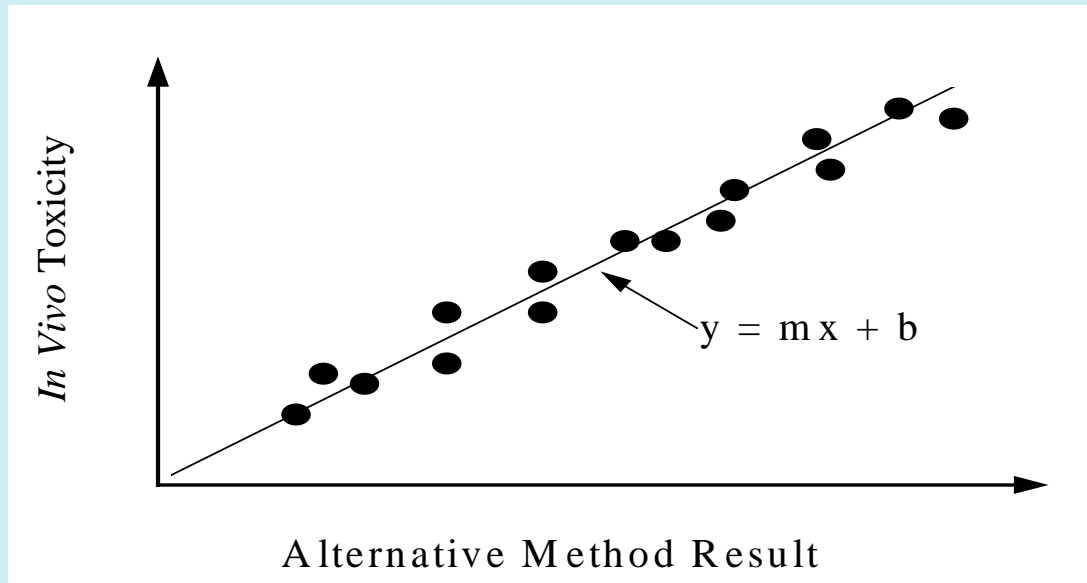
Validierung

- Ringversuch unter blinden Bedingungen
- Relevanz & Zuverlässigkeit für den vorgesehenen Anwendungsbereich

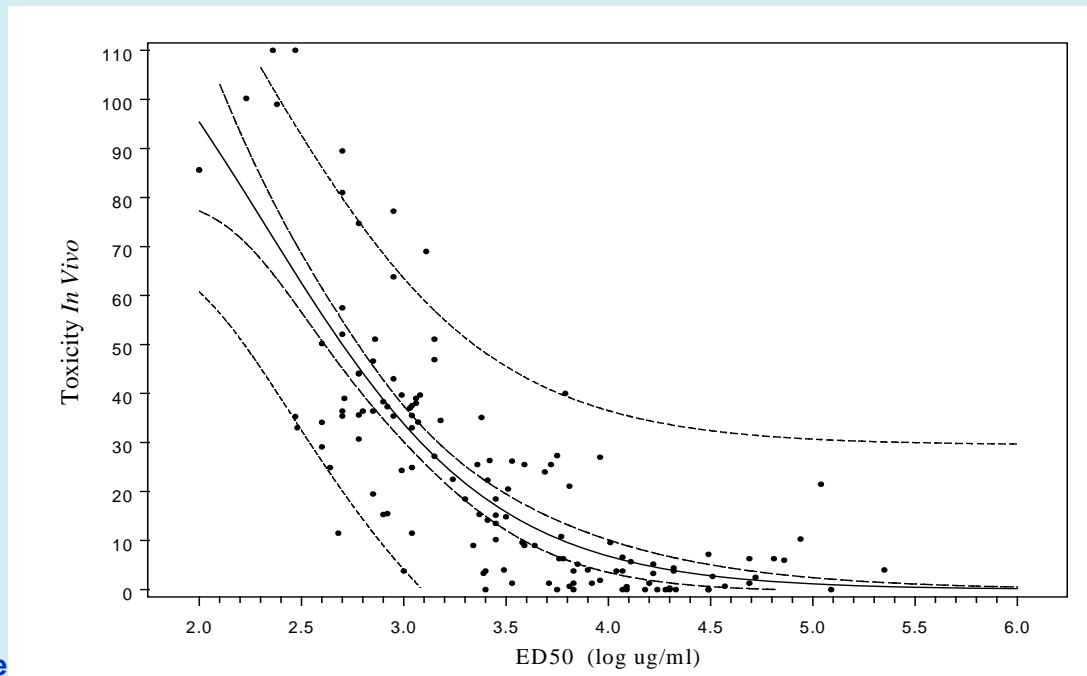
Unabhängige Evaluierung (*peer review*)

Behördliche Anerkennung

Biometrische PRÄDIKTIONSMODELLE für die in vitro/in vivo Korrelation können ...

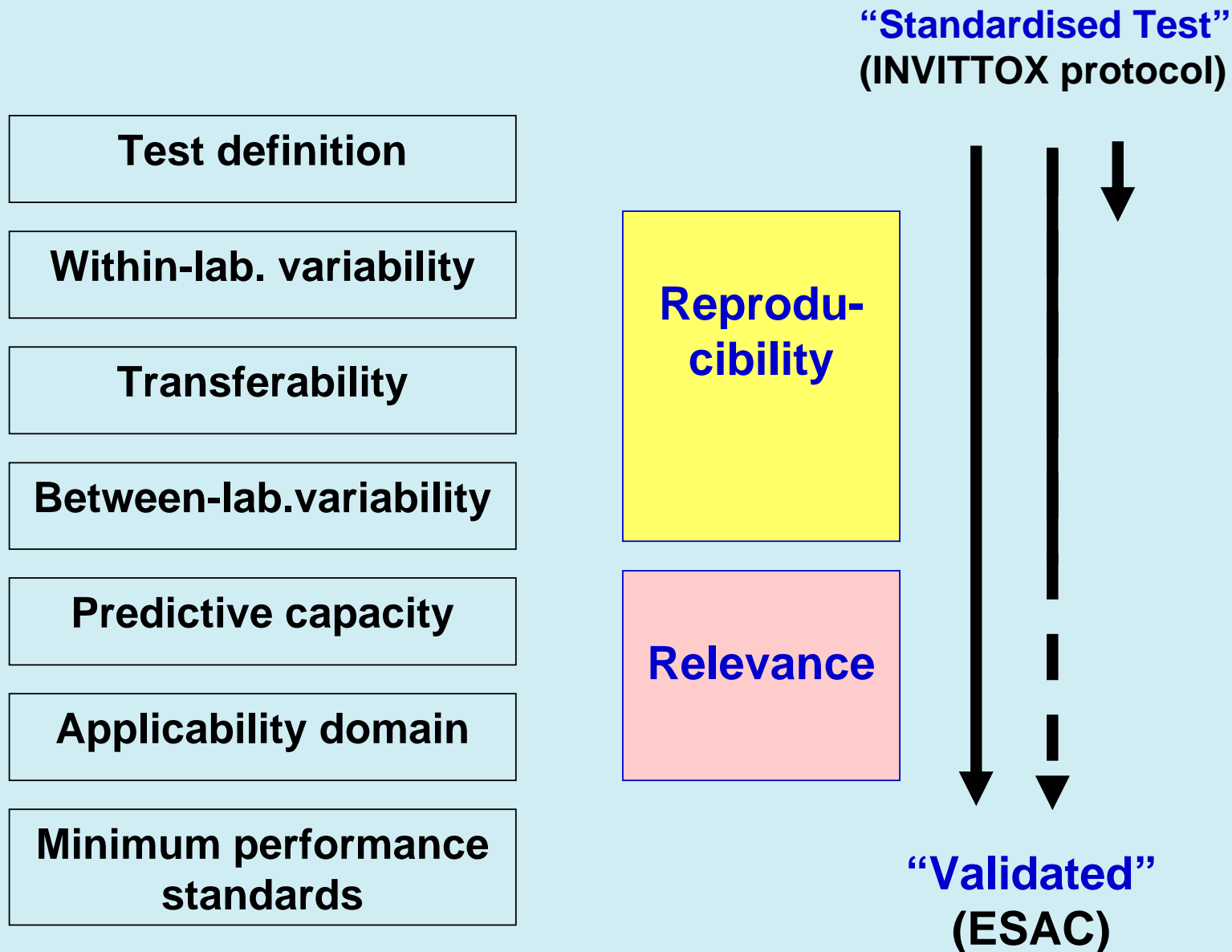


...einfach sein

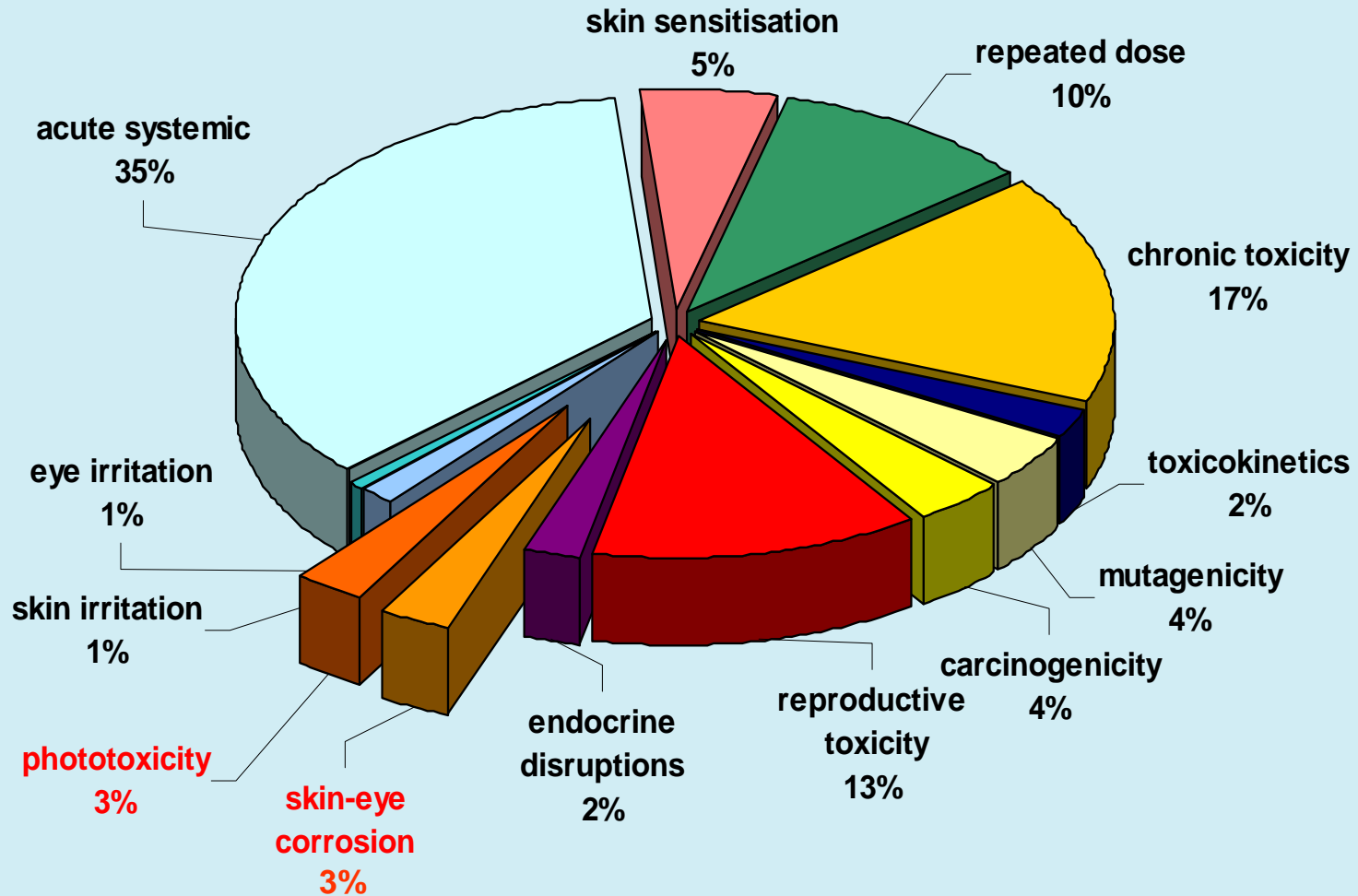


...oder häufiger
sehr komplex

ECVAM's Modular Approach to Validation

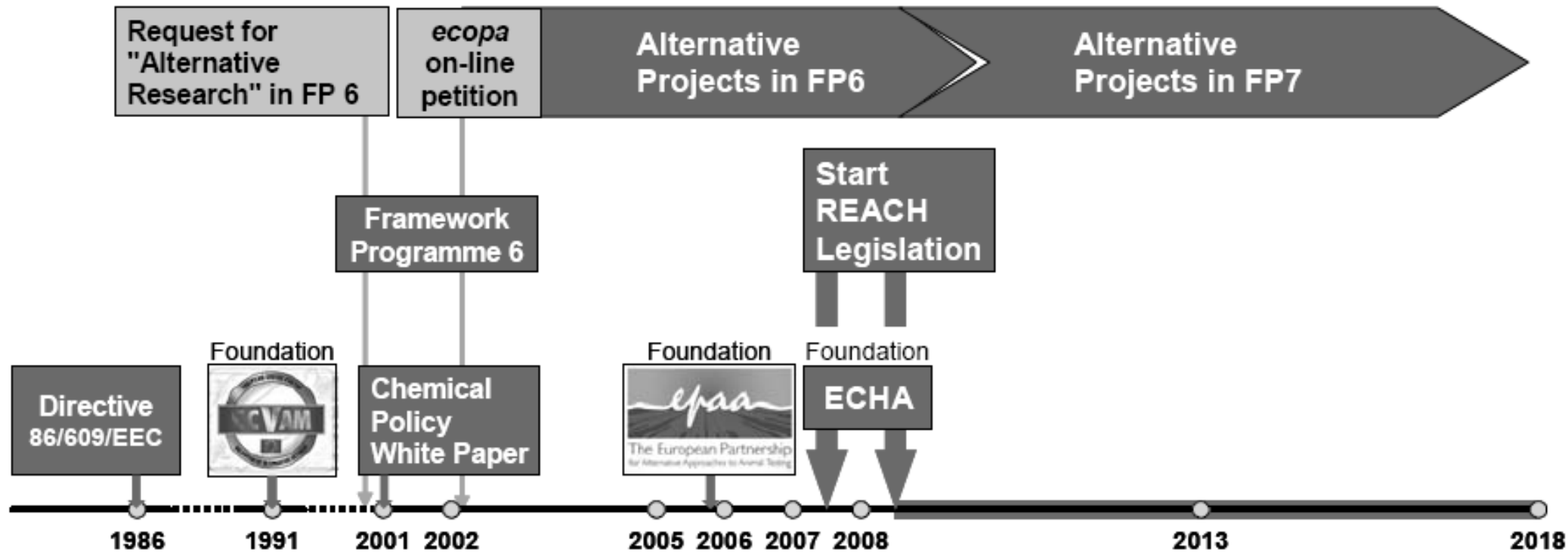


Tierverbrauch in der Toxikologie in Europa pro Jahr



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

Zeitraum für REACH in Verbindung mit EU Programmen



Themen

- I. **Initiativen der EU zur Reduzierung sicherheitstoxikologischer Tierversuche:
7. Änderung der EU Kosmetikrichtlinie & EU REACH Verordnung**
- II. **Beispiele von etablierten Alternativmethoden, die unter Federführung von ECVAM experimentell validiert wurden**
- III. **Lokale Toxizität – der Schwerpunkt der EU Kosmetikverordnung:
Haut, Auge & QSAR**
- IV. **Reproduktionstoxikologie – der Schwerpunkt von REACH**

Topical toxicity



- **Skin corrosion accepted by OECD 2004, 3rd model validated 2006, 4th model expected 2007**
- **Skin irritation full replacement accepted 2007**
- **Refinement for eye test under ESAC review, expected 2007**
- **10 replacements for eye test under evaluation, acceptance expected 2008**

BEISPIEL

Validierung des 3T3NRU-PT
in vitro Phototoxizitäts-Test
1992-1998



Definition der akuten Phototoxizität

Sie ist zu unterscheiden von:

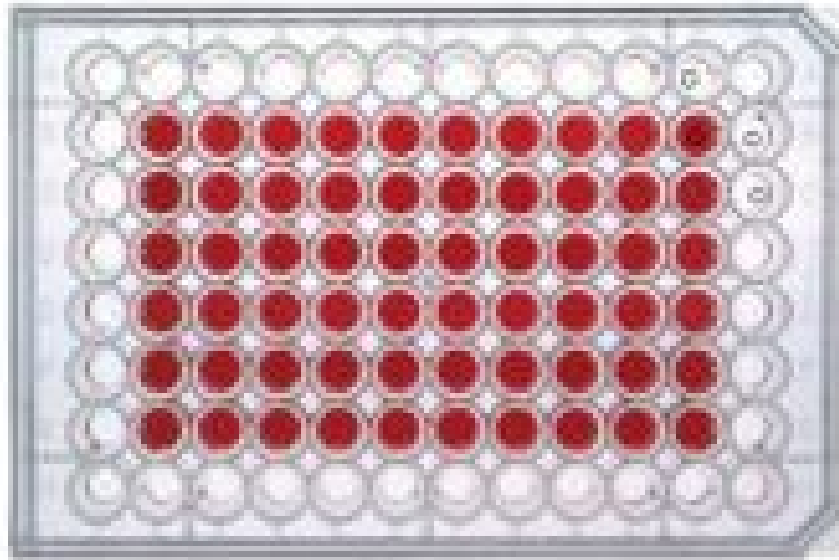
- Photoallergie
- Photomutagenität
- Photogenotoxizität
- Photocarcinogenität

Wirkungsmechanismus akuter phototoxischer Reaktionen

UV + sichtbares Licht (300 - 750 nm)
+
Chemikalie, die Licht absorbiert (300 - 750



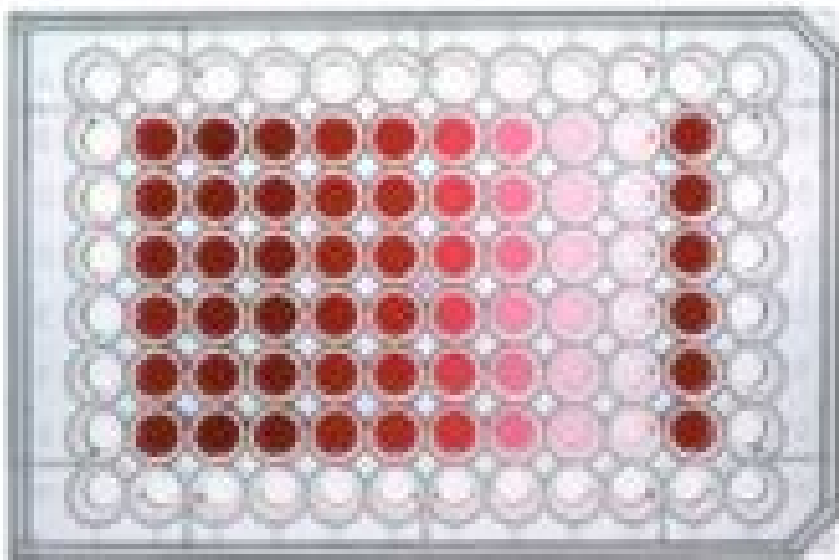
aktivierte Chemikalie



Ketoprofene -UV

**3 - 10 =
0 - 500 µg/ml**

**2 & 11 =
neg. Kontrolle**

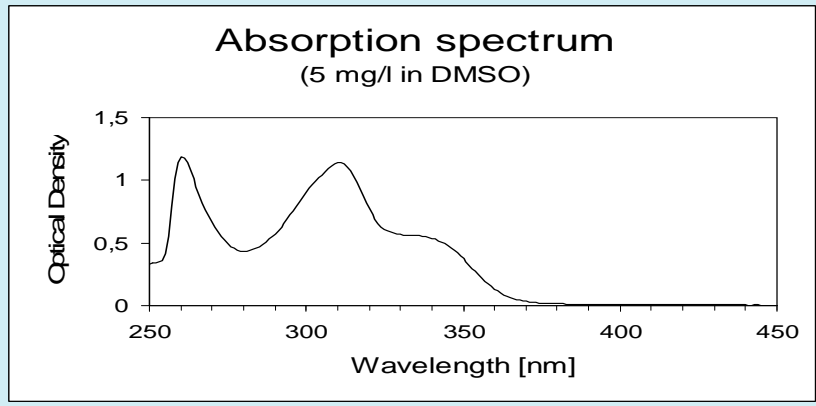
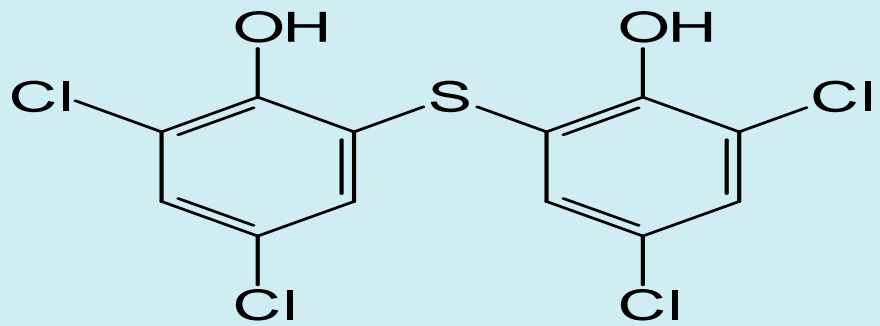


Ketoprofene +UV

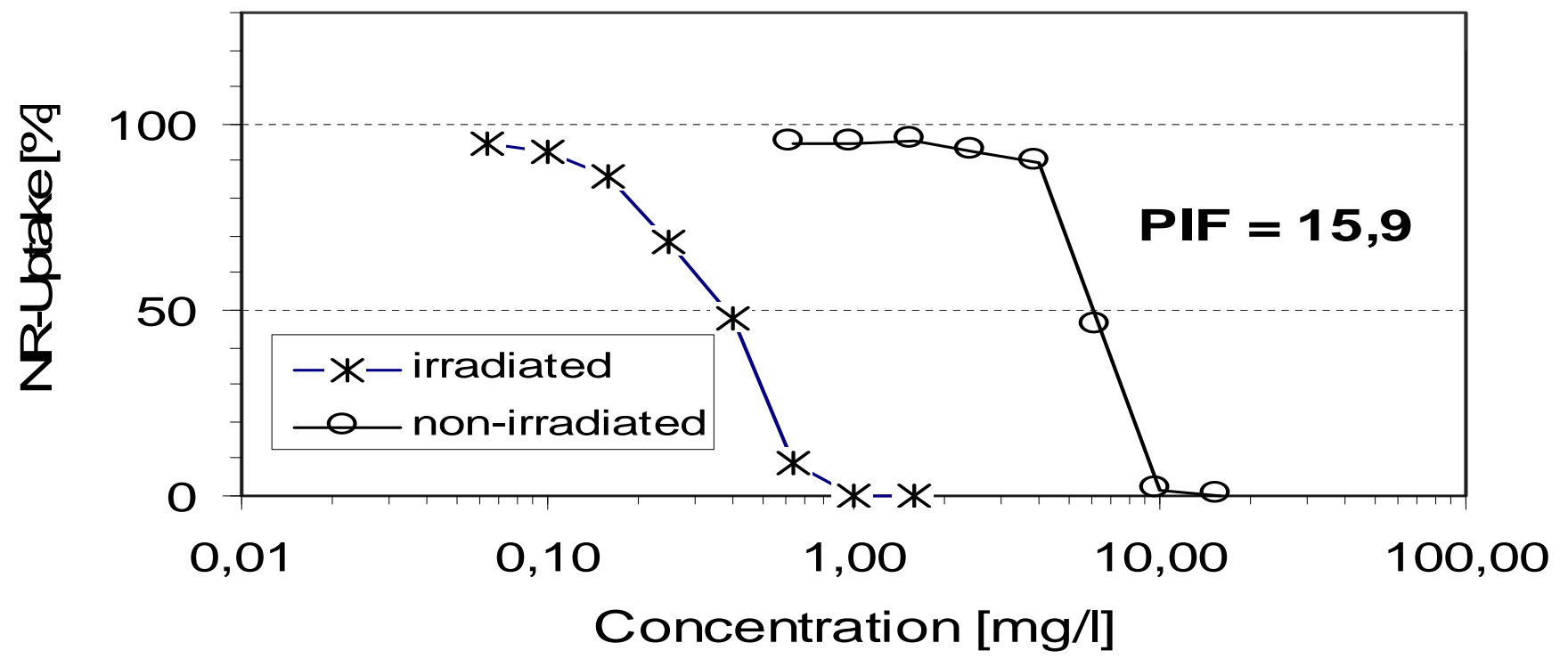
**3 - 10 =
0 - 10 µg/ml**

**2 & 11 =
neg. Kontrolle**

BEISPIEL: BITHIONOL, phototoxisch



3T3 NRU Phototoxicity Test



VALIDIERUNG des 3T3NRU in vitro Phototoxizitäts-Test

SPONSOREN

EU DG XI, ECVAM, ZEBET-BgVV, COLIPA

DESIGN des 3T3NRU-PT

3T3 monolayer → 24h Stoffe → 1h +UVA/-UVA → 24h Zytotoxizität (NR-Test)

Prediktionsmodell:

Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven + UVA and -UVA

Behandlung

geprüfte CHEMIKALIEN

(I) Prävalidierung	11 PT	9 NPT	not blind
(II) Validierung	25 PT	5 NPT	blind trial
(III) UV Filter Studie	10 PT	10 NPT	blind trial

ERGEBNISSE

(II) VS	Sensitivität	84%	Spezifität	93%
(III) UV-F	Sensitivität	100%	Spezifität	98%

→ Im Jahr 2000 wurde der 3T3-NRU-PT als erster in vitro Toxizitätstest von der EU Kommission in Anhang V der Gefahrstoffverordnung (EU Direktive 67/548/EEC) aufgenommen .

→ OECD = 2004 von der OECD weltweit akzeptiert

NIHS JAPAN, TOKYO, Dezember 2002
Informationsveranstaltung zum 3T3 NRU PT

第16回 日本動物実験代替法学会

2002年12月3、4、5日



Prüfung auf ätzende Eigenschaften an der Haut

Draize rabbit skin irritation/corrosion test

OECD Test Guideline 404;

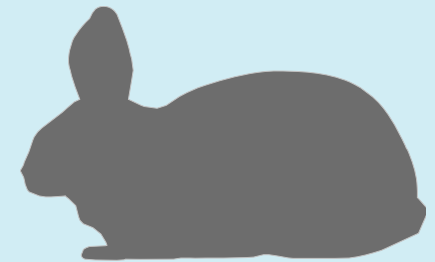
Directive 67/548/EEC: Annex V Method B.4

Skin Corrosion = production of irreversible tissue damage in the skin

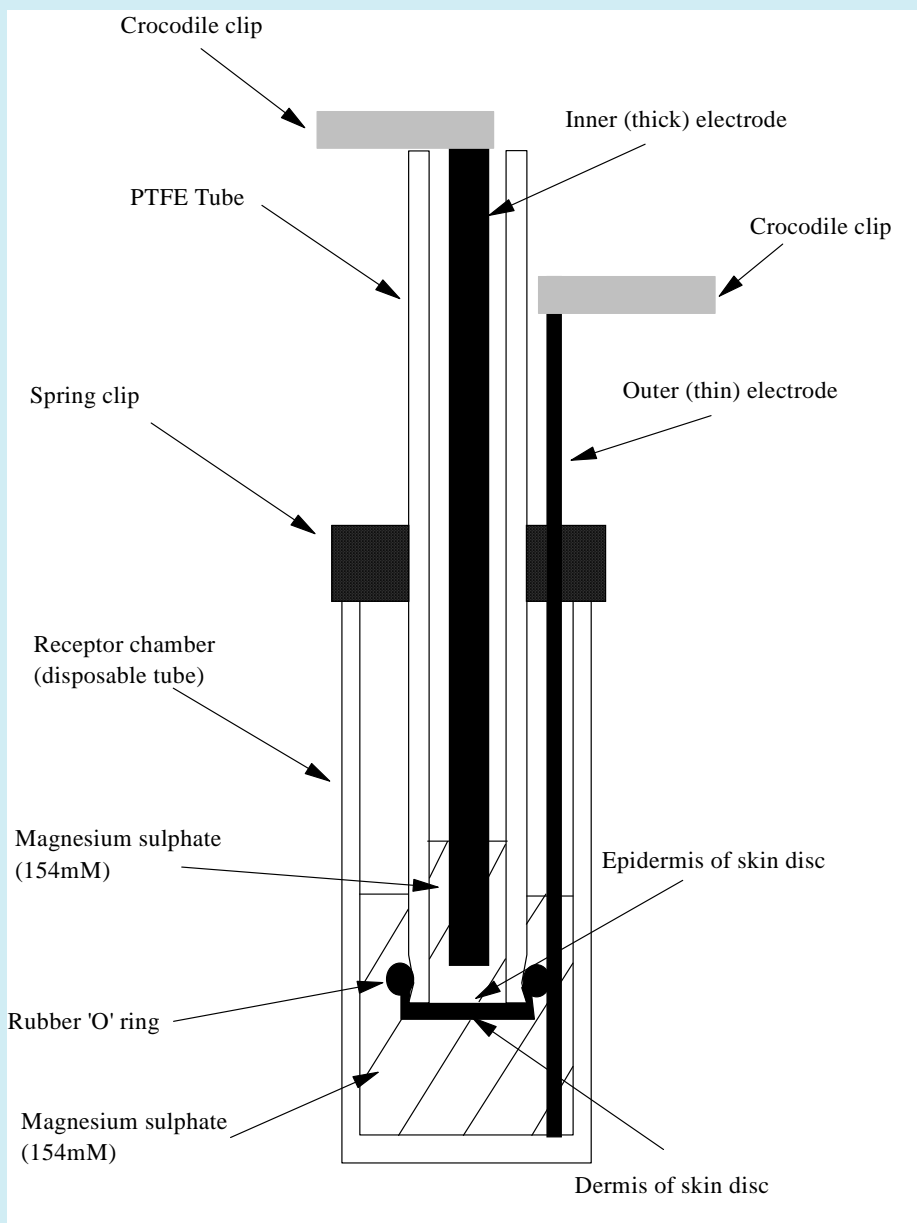
animal welfare considerations :

- “ ... classification can be based on the results of validated *in vitro* tests.” (*Directive 67/548/EEC*, 18th Amendment)

if not corrosive: skin irritation assessment



ALTERNATIVER TEST (1): Rattenhaut TER TEST

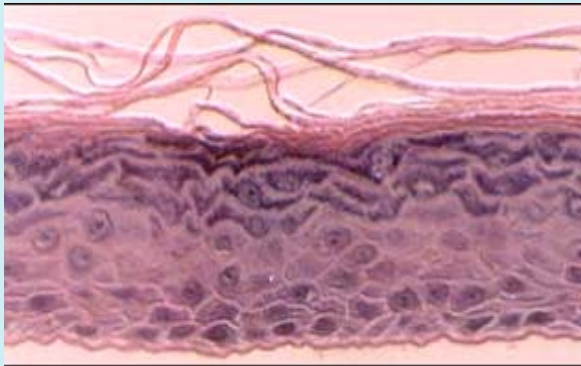


Transcutaneous Electrical Resistance

- Wistar Rats
- age: 28 days
- skin discs
- Skin: full skin
- exposure 24 h
- measurement of TER

1993-94	Prevalidation Study
1996-98	formal Validation Study
1997-98	Special Study
1998	accepted by SCC
1998	submission to OECD
1999	submission to EU
2000	accepted in EU (B.40)
2001	revised at OECD
2004	accepted by OECD (TG 430)

ALTERNATIVER TEST (2): menschliches Hautmodell



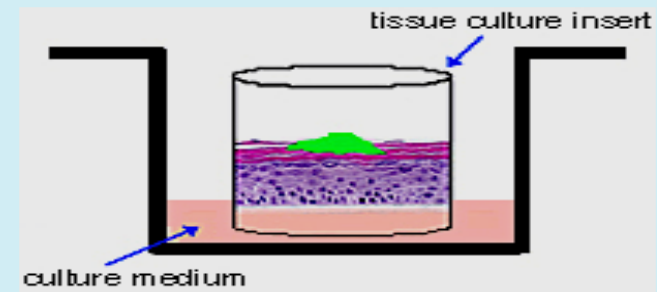
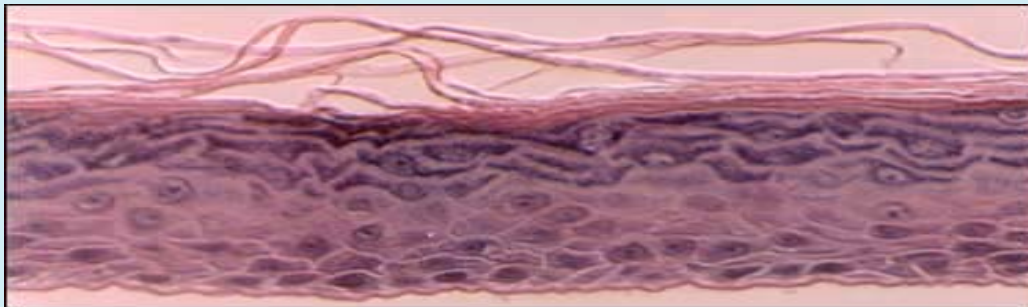
Models:
EPISKIN
EpiDerm
SkinEthic

- Exposure: neat, topical
- 3 min, 1 hr, (4 hr)
- strong cytotoxicity (MTT) directly after exposure
- equals: necrotic cell damage

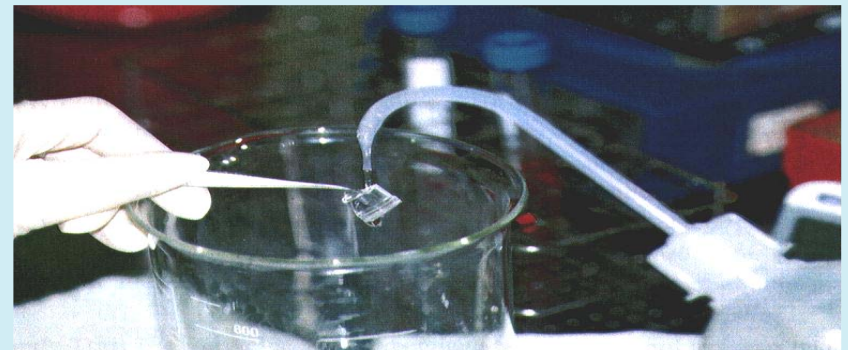
1993-94	Prevalidation Study
1996-98	formal Validation Study
1997-98	Special Study
1998	accepted by SCC
1998	submission to OECD
1999	submission to EU
2000	accepted in EU (B.40)
2001	revised at OECD
2004	accepted by OECD (TG 431)

ECVAM Skin Irritation Validation Study mit menschlichen Hautmodellen 2003 - 2007

SkinEthic, France & EpiDerm (MatTek), USA

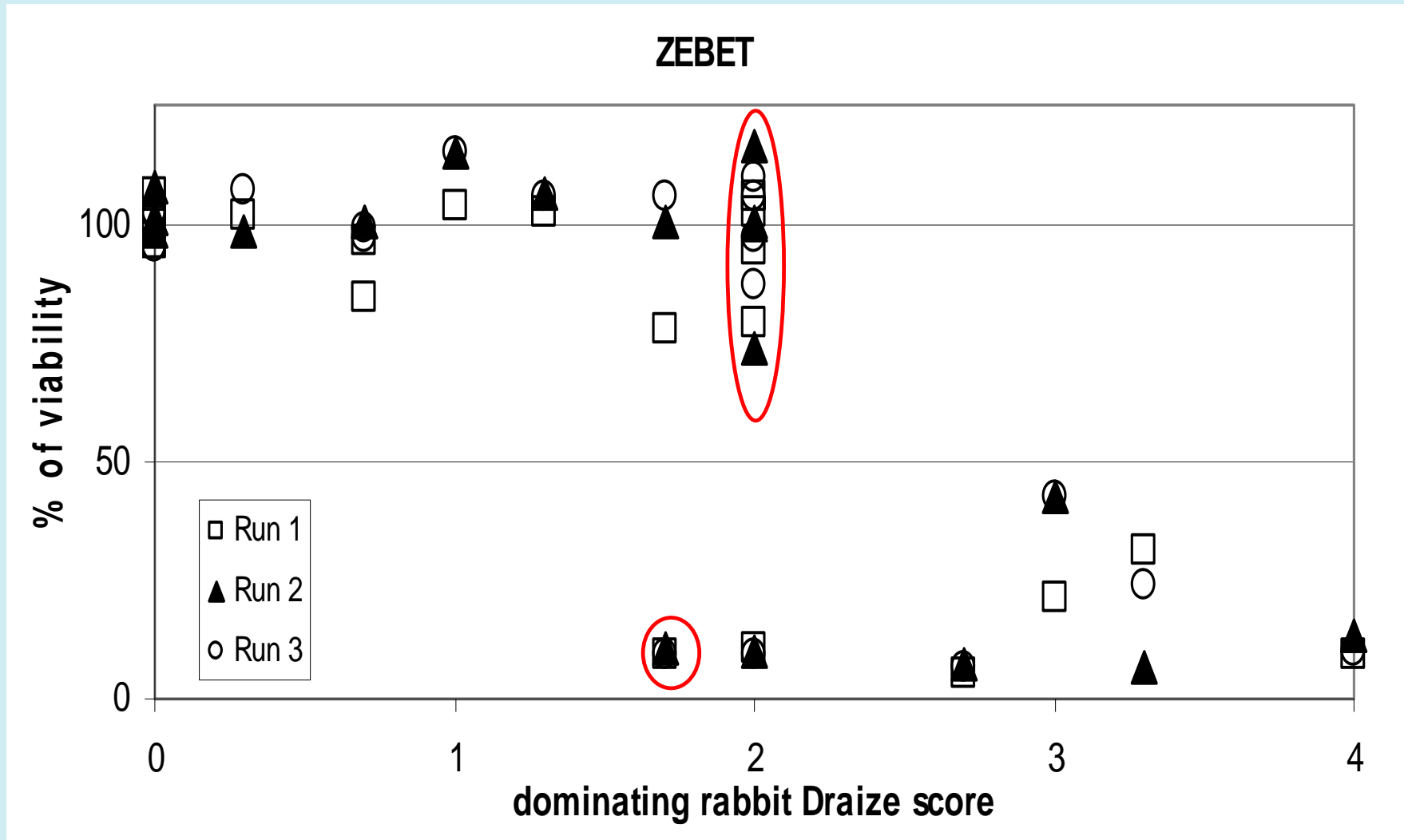


menschliche Hautmodelle: einfach zu handhaben, standardisierte Produkte



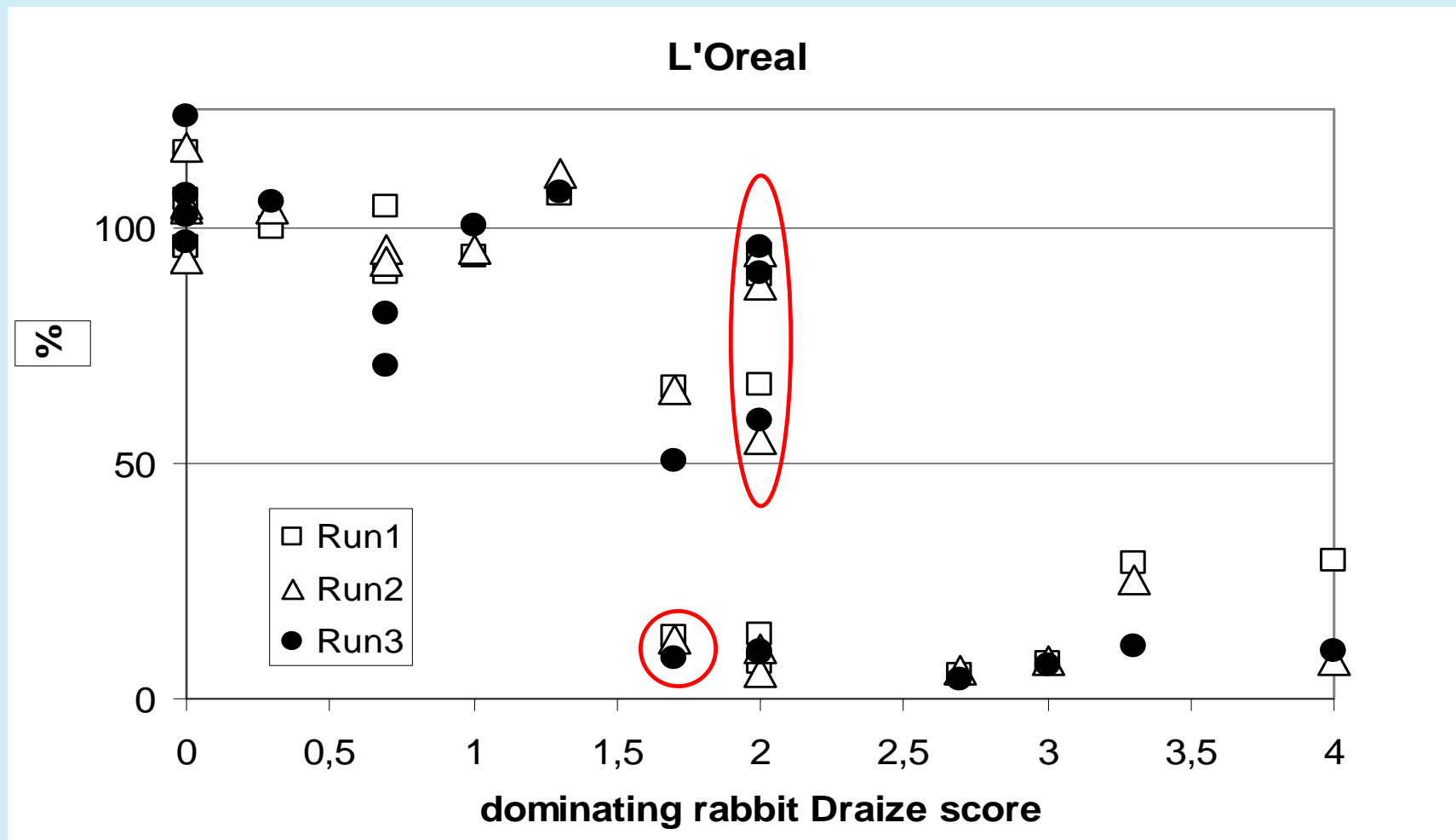
ECVAM Skin Irritation in Vitro Study (2004 - 2006)

MTT (Zytotoxizität) - EpiDerm

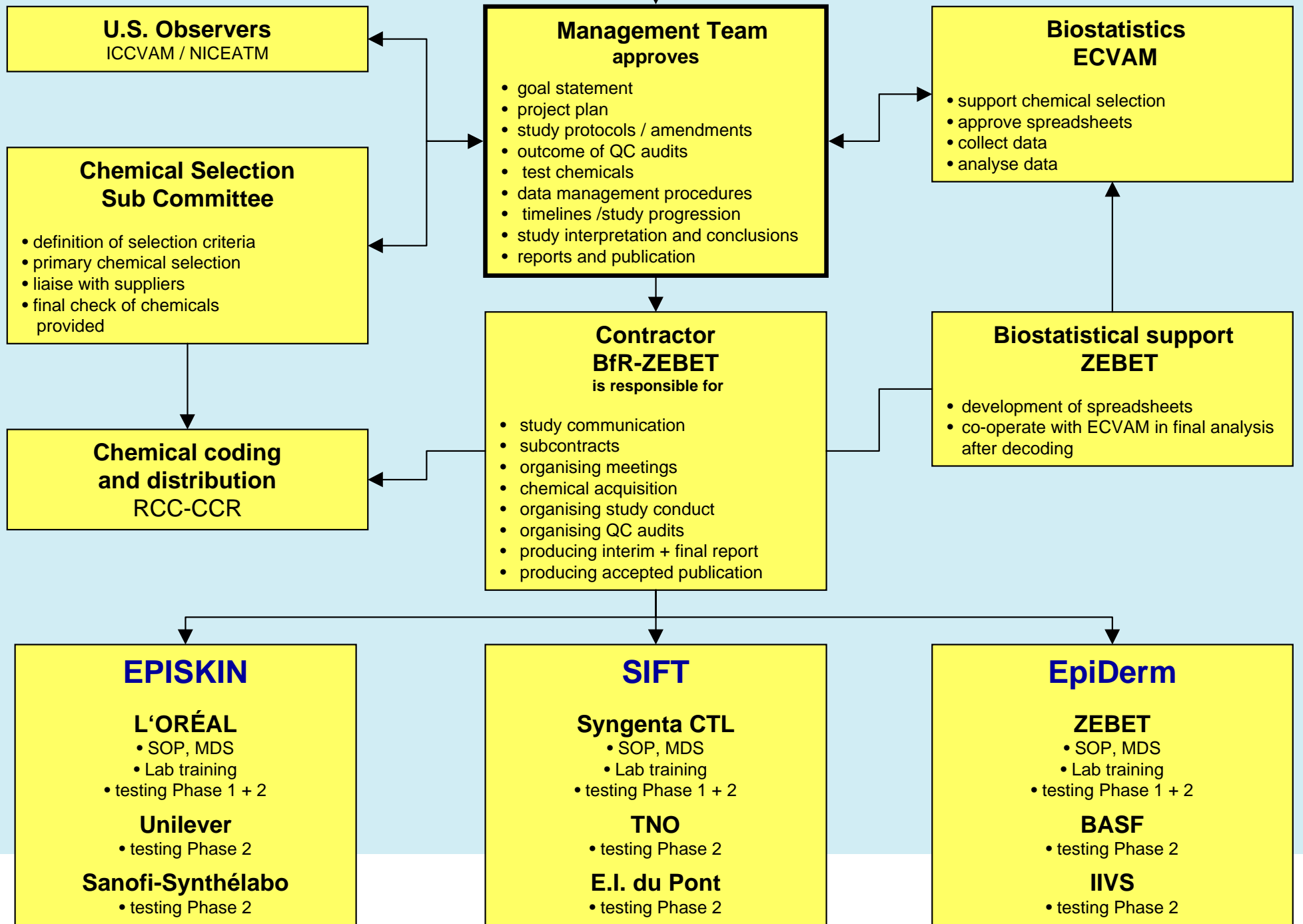


ECVAM Skin Irritation in Vitro Study (2004 - 2006)

MTT (Zytotoxizität) - Episkin



Sponsor ECVAM



April 2007

ESAC Statement on the Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation

- **EPI SKIN** – “reliable & relevant stand-alone test for predicting rabbit skin irritation a replacement for Draize Skin Irritation Test ... for ... distinguishing between R38 ... and no-label ... substances.”
 - IL-1alpha useful adjunct to MTT assay
- **EpiDerm** – “reliably identifies skin irritants, but negative results may require further testing ... Improvement of the ... protocol should be made to increase level of sensitivity.”

ATLA 2007 im Druck

The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test

Horst Spielmann,¹ Sebastian Hoffmann,² Manfred Liebsch,¹ Phil Botham,³ Julia H. Fentem,⁴ Chantra Eskes,² Roland Roguet,⁵ José Cotovio,⁵ Thomas Cole,⁶ Andrew Worth,⁶ Jon Heylings,³ Penny Jones,⁴ Catherine Robles,⁷ Helena Kandárová,¹ Armin Gamer,⁸ Marina Remmele,⁸ Rodger Curren,⁹ Hans Raabe,⁹ Amanda Cockshott,¹⁰ Ingrid Gerner¹¹ and Valérie Zuang²

¹National Centre for Alternative Methods (ZEBET), Berlin, Germany; ²ECVAM, Institute for Health & Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, Ispra, Italy; ³Syngenta, Macclesfield, UK; ⁴Unilever, Sharnbrook, UK; ⁵L'Oréal, Clichy, France; ⁶ECB, Institute for Health & Consumer Protection, European Commission Joint Research Centre, Ispra, Italy; ⁷Sanofi Aventis, Montpellier, France; ⁸BASF, Ludwigshafen, Germany; ⁹Institute for In Vitro Sciences, Gaithersburg, MD, USA; ¹⁰Health and Safety Executive (HSE), Bootle, UK; ¹¹Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany

HAUTPENETRATION

Bei Stoffen, die in Kosmetika oder als Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden sollen, ist die Aufnahme durch die Haut entscheidend für die Wirkung im gesamten Körper.

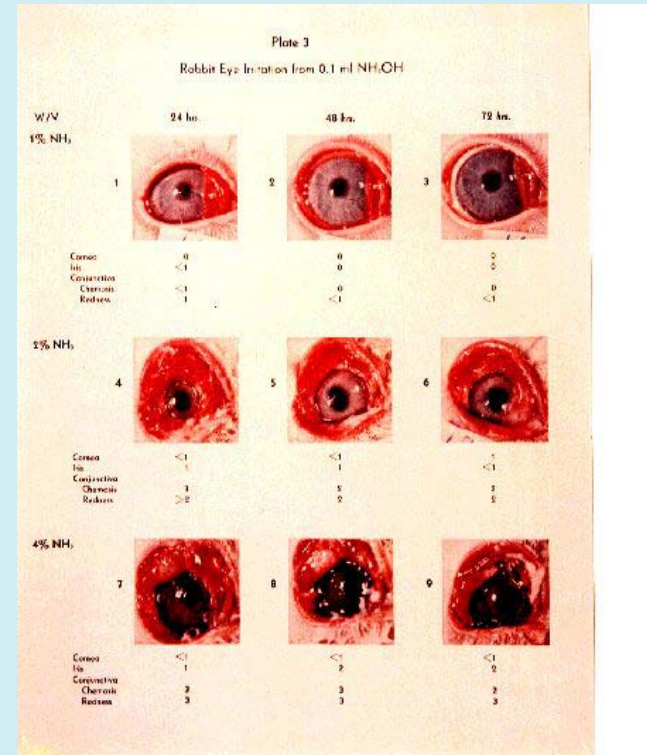
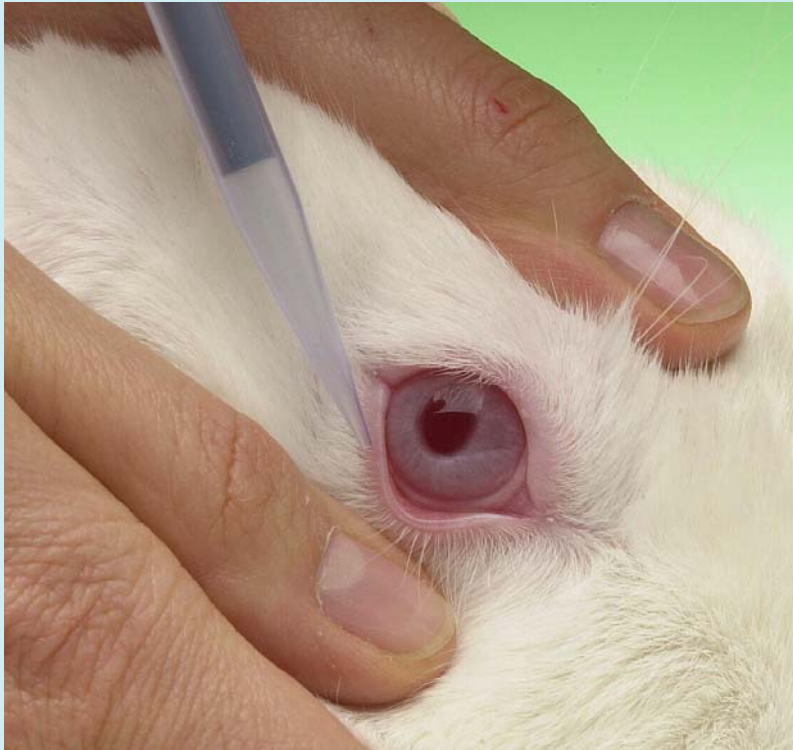
Die EU Expertenkommission für Kosmetika, das SCCNFP, hat grundsätzlich entschieden, daß

- Kosmetika-Inhaltsstoffe nicht auf systemische Wirkungen geprüft werden müssen, wenn sie nicht durch die Haut aufgenommen werden.
- Deshalb hat die Prüfung auf Hautpenetration zentrale Bedeutung bei der Verträglichkeitsprüfung von Kosmetika.
- 2004 hat die OECD die Prüfung auf Hautpenetration mit menschlicher Haut (Op-Material) + künstlicher menschlicher Haut akzeptiert.

Hautresorption: 10 Jahre bis zur Akzeptierung durch die OECD

- 1992:** submission of UK proposal for new *in vivo* and *in vitro* TGs
- 1995:** major reservation by a few countries
- 1996:** joint OECD/ECVAM expert meeting: consensus
- 1996:** hurdles (insufficient validation) prevent progress
- 1996:** decision to arrange for an OECD Workshop
- 1997:** Workshop Steering Committee cannot agree on objectives
- 1997:** Extended Steering Committee: more work to be done!
- 1999:** Meeting in Lodz to discuss and agree outcome of extra work
- 1999:** consensus report of Lodz Meeting, including recommendations to adopt the two new guidelines; plus a Guidance Document
- 2000:** 12th WNT again: some countries cannot agree !!
- 2001:** 13th WNT principle agreement, US & UK due to solve last issues
- 2002:** **14th WNT reaches final consensus and approves new Test Guidelines TG 427 (*in vivo*) and TG 428 (*in vitro*) plus GD 28**
- 2004** **Final OECD ACCEPTANCE**

Draize Test am Kaninchenauge



PRINZIP: Applikation von 100mg/100 µl Testsubstanz in das Kaninchen

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

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

AUGENREIZUNG

In der EU werden die folgenden **in vitro Tests** zur Einstufung und Kennzeichnung stark augenreizender Stoffe **anstelle des Draize-Test am Kaninchenauge** seit 2002 akzeptiert:

- | | | |
|----------------|--------------|---|
| 1. Belgien | BCOP Test | an der isolierten Cornea des Rindes (Schlachthofmaterial) |
| 2. Deutschland | HET-CAM Test | am bebrüteten Hühnerei |
| 3. England/UK | IRE Test | am isolierten Kaninchenauge |
| 4. Holland | ICE Test | am isolierten Hühnerauge (Schlachthofmaterial) |

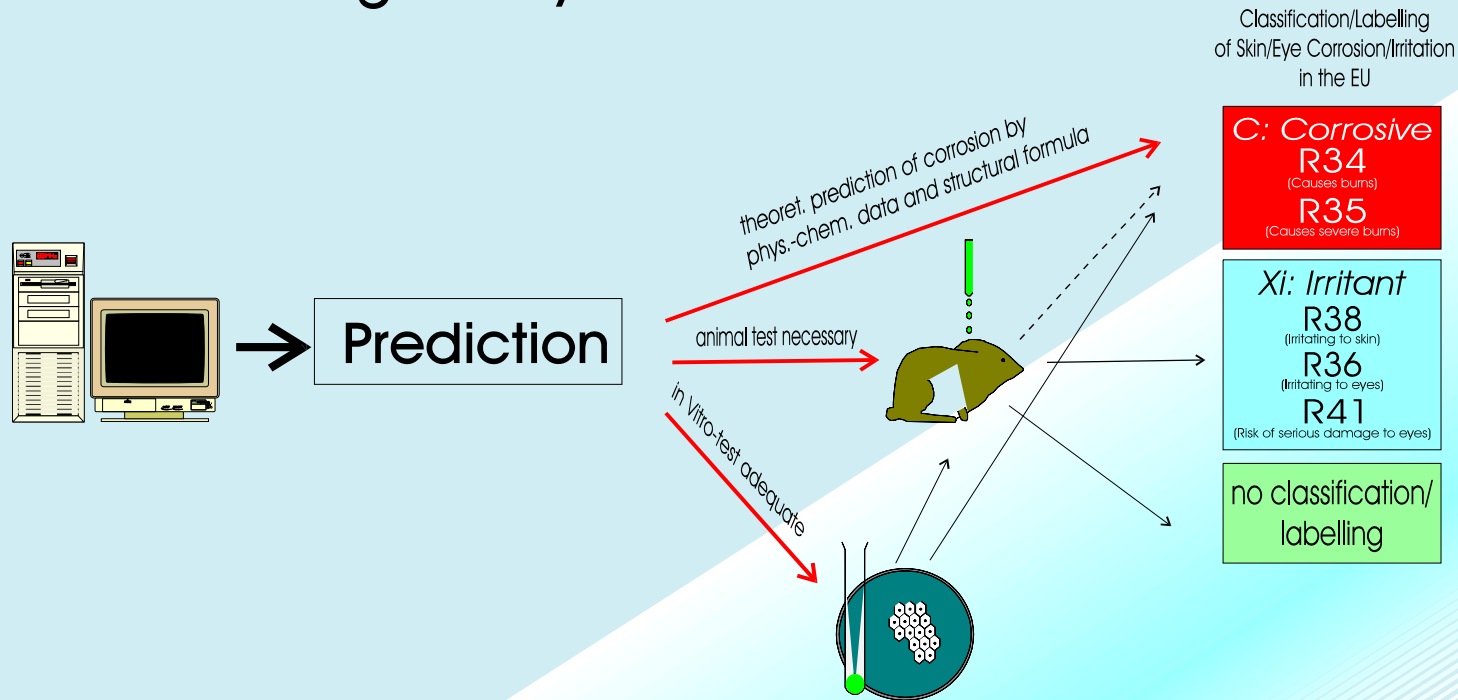
→ Kennzeichnung mit R-41 Gefahr ernster Augenschäden

Zum Nachweis der Unbedenklichkeit muss zusätzlich der Draize Test am Kaninchenauge durchgeführt werden !

QSAR - DSS

A Decision Support System for the Introduction of Alternative Methods

★ Evaluation of the Prediction according to Regulatory Risk Assessment

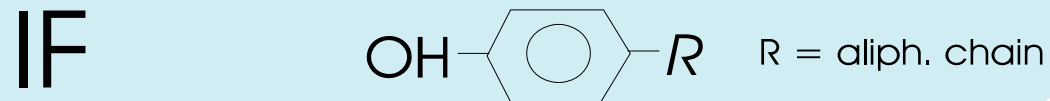


12

A Decision Support System for the Introduction of Alternative Methods

✦ Structural Rules

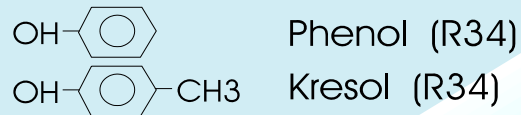
Example:



THEN "corrosive"

Explanation:

"Corrosive" according to EU-legislation* are:



* Directive 92/32/EEC amending for the seventh time Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. O.J. L154 5th of June 1992.

10

QSAR - DSS

A Decision Support System for the Introduction of Alternative Methods

★ Exception-Rules

Example:

IF molecular weight
> 1200 g/mol

THEN no or only marginal effects
to the skin expected

Explanation:

Out of 1029 substances being tested on skin irritation, only 148 were labelled for showing effects:

MW >500	: 9 substances	(6.1 %)	} 90.6 %
MW <400	: 67 substances	(45.3 %)	
MW <200	: 67 substances	(45.3 %)	

6

QSAR - DSS

Assessment of Chemicals

Biocides

Existing Chemicals

Export-Import

New Chemicals

Computational Toxicology

REACH

Classification & Labelling

Testing Methods

REACH-IT & Informatics

IUCLID 5

ESIS

INFOCAP

Contacts

Documentation

Legislation

Links

Newsletter

Toxtree

Toxtree is a flexible and user-friendly open-source application that places chemicals into categories and predicts various kinds of toxic effect by applying decision tree approaches, such as the [Cramer classification scheme](#), the Verhaar scheme for aquatic modes of action, and [a rulebase for skin irritation and corrosion based on rules developed by the German Federal Institute for Risk Assessment \(BfR\) and collaborators](#).

Toxtree was developed by IdeaConsult Ltd (Sofia, Bulgaria) under the terms of an ECB contract. The software is made freely available by ECB as a service to scientific researchers and anyone with an interest in the application of computer-based estimation methods in the assessment of chemical toxicity.

The screenshot shows the Toxtree software window titled "ToxTree (Estimation of Toxic Hazard)". The interface includes a menu bar (File, Edit, Chemical, Compound, ToxicHaza, Method, Help), a toolbar with navigation buttons and an "Enter SMILES:" input field with a "Go!" button, and a main display area. The main display area is divided into two panels: "Available structure attributes" and "Toxic Hazard".

Available structure attributes	
SMILES	CCCCCC
Names	Hexane

Structure diagram:

Navigation: First Prev 1/1 Next Last

Toxic Hazard

Estimate

Low (Class I)

Intermediate (Class II)

High (Class III)

Verbose explanation

Cramer Rules

Anwendung von in vitro Tests zur Bestimmung der augenreizenden Eigenschaften von chemischen Stoffen und Produkten

Es gibt in Europa 2 akzeptierte in vitro Testverfahren:

CHEMIKALIEN → die EU akzeptiert in vitro Daten für die Einstufung stark augenreizender Stoffe

KOSMETIKA → die EU akzeptiert in vitro Daten zum Nachweis der fehlender augenreizender Eigenschaften von kosmetischen Produkten

Das BfR hat 2005 vorgeschlagen, beide Verfahren zu kombinieren, um auf überflüssige Draize test am Kaninchenauge zu verzichten.

Dafür bieten sich 2 Verfahren an:

1. der **“TOP DOWN Approach”**

→ man beginnt mit dem Test zum Nachweis stark augenreizender Eigenschaften

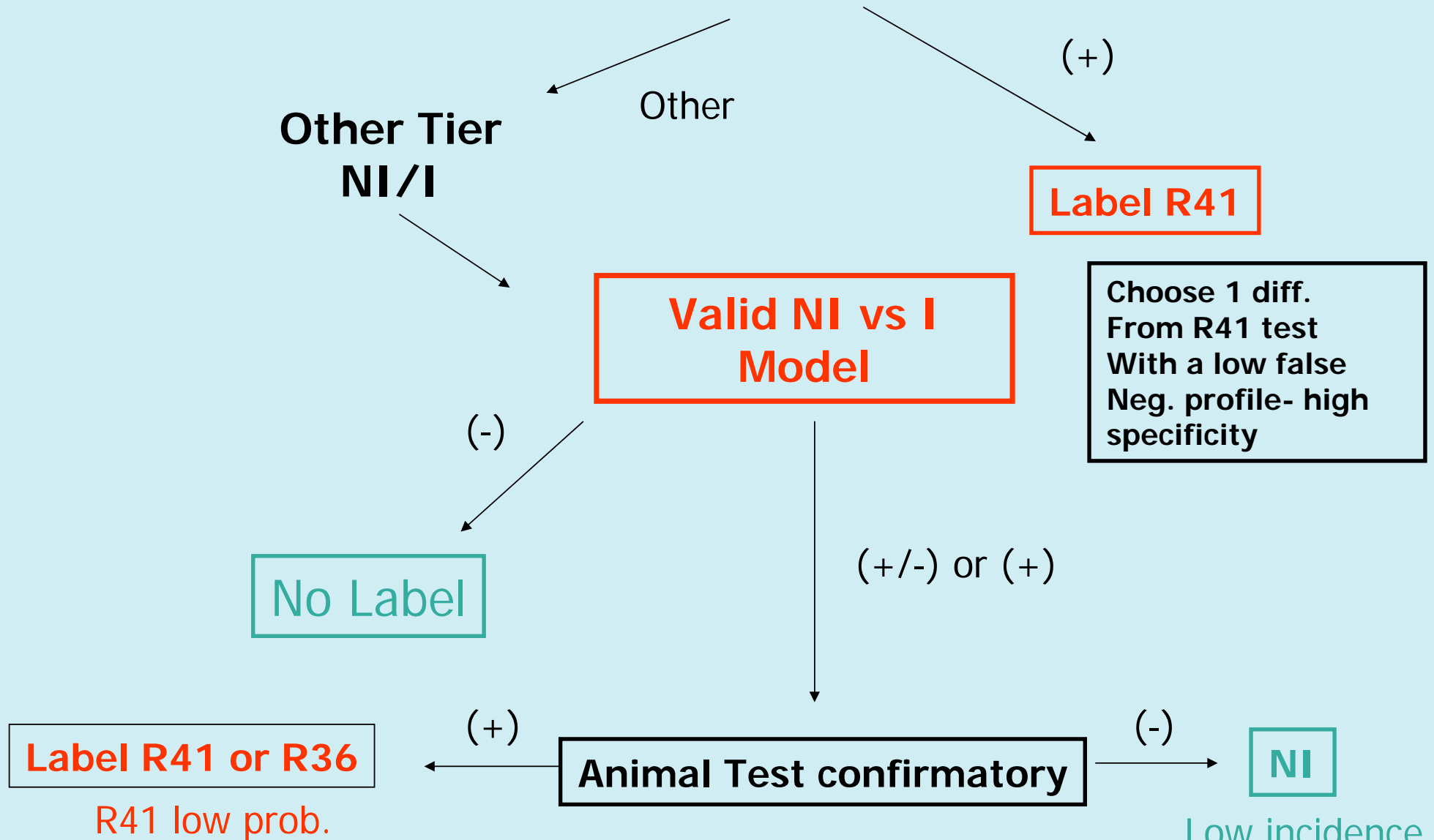
2. der **“BOTTOM UP Approach”**

→ man beginnt mit den Test zum Nachweis fehlender augenreizender Eigenschaften

Top Down Approach (R41)

4 Models

(Use Most appropriate one)



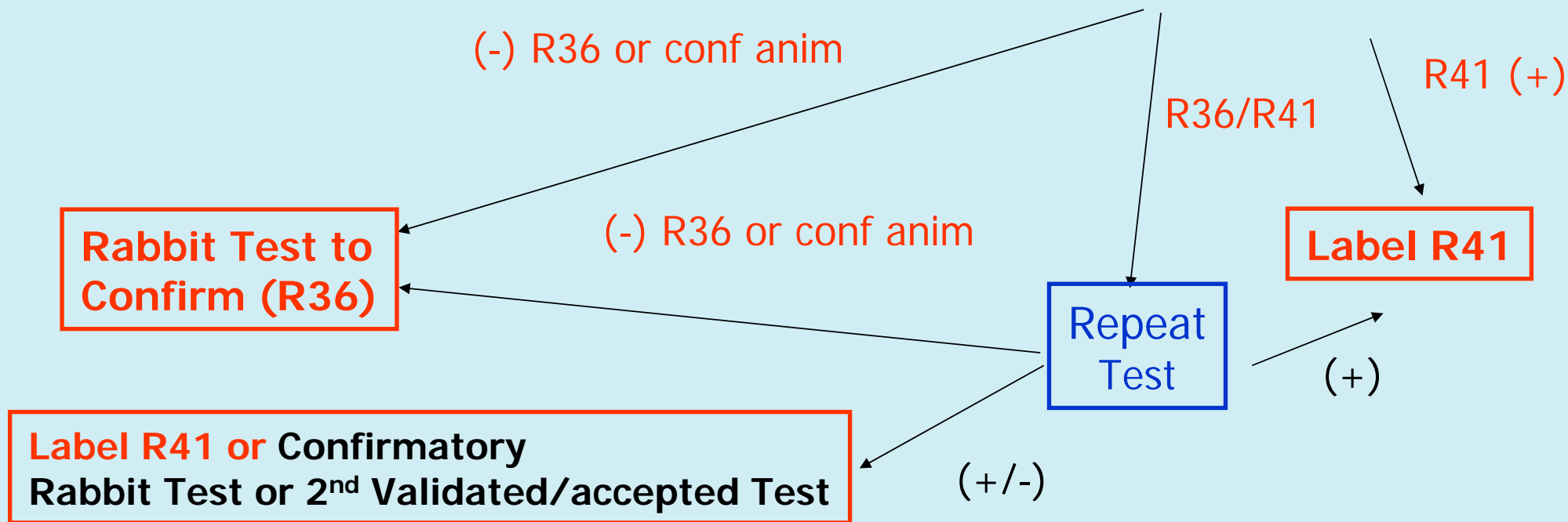
Bottom Up Approach

NI/I

Valid Models



Use 1 of 4 Models



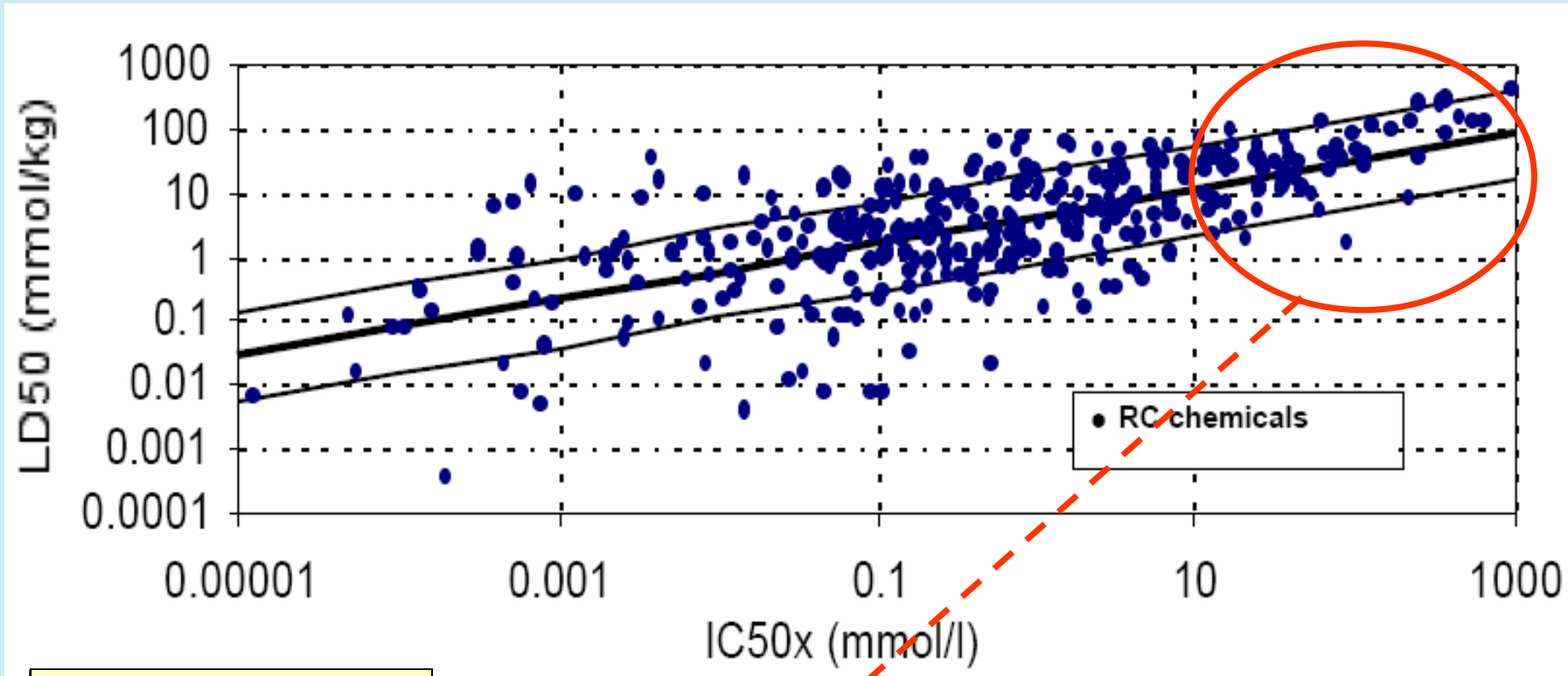
Systemic toxicity



- EU/US study to predict starting dose by cytotoxicity under review, human toxicity better predicted than by animal tests
- Prediction of non-toxic chemicals (70%) by cytotoxicity, joint EU/US validation study acceptance expected 2008
- Tiered testing strategy for acute dermal and inhalation toxicity
- A-Cute-Tox (FP6)



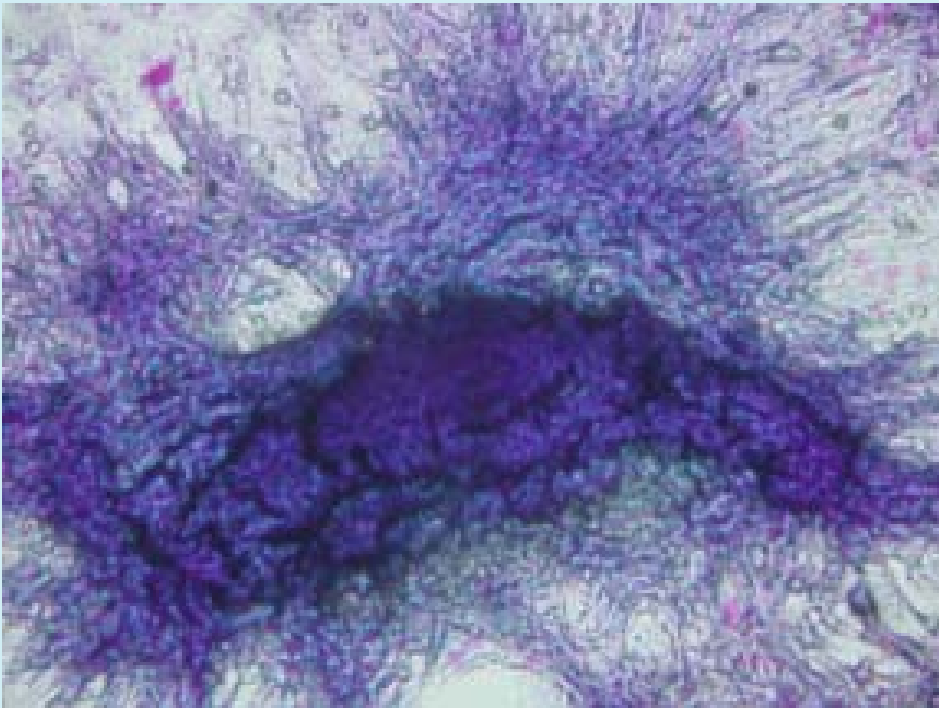
BfR Vorschlag zu REACH: Halle's Register der Cytotoxizität geeignet zum Nachweis, dass ein Stoff nicht akut toxisch wirkt



New Chemicals: Oral toxicity distribution	
LD ₅₀ [mg/kg]	chemicals [%]
≤ 25	0
> 25 - 200	3.1
>200 - 2000	21.1
>2000	75.8

zu diesen 2 Klassen
gehören 97% aller
Industriechemikalien

Mutagenicity / Cancer

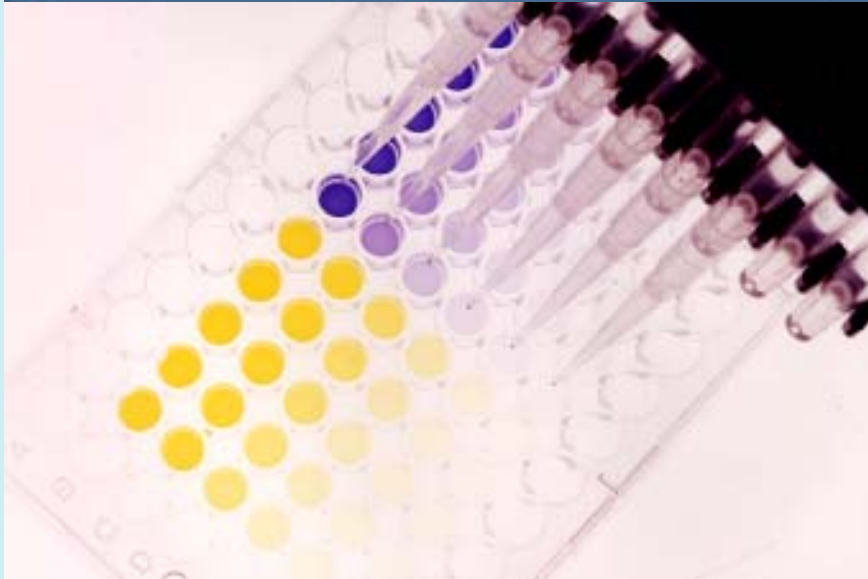


- 2 Cell transformation assays under validation, expected 2008, OECD test guideline in parallel
- In vitro micronucleus test validated by ECVAM 2006, OECD 2007 O.K.
- COMET assay under validation (lead JaCVAM)
- Validation skin models for genotoxicity testing
- Workshop false-positives, follow-up studies with COLIPA



CarcinoGenomics (FP6)

Sensitisation



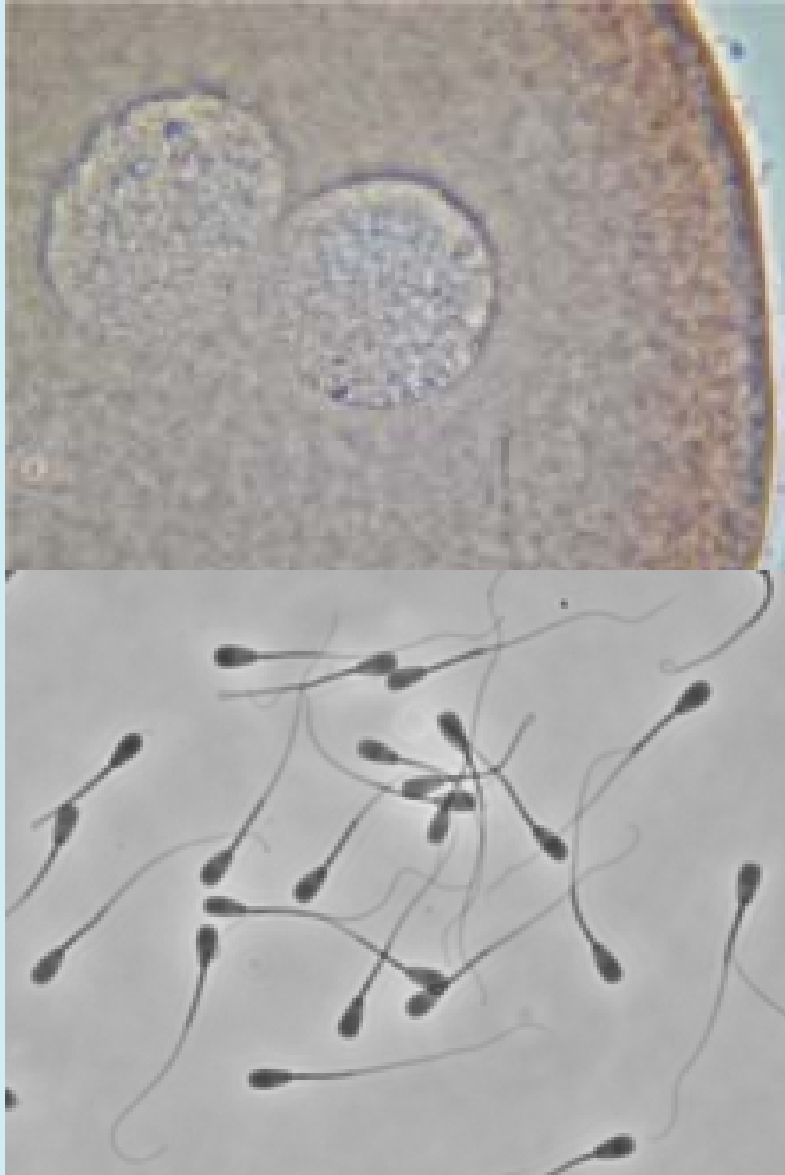
- **Local Lymph Node Assay (LLNA)** cut down approach under validation, results expected 2007
- **Three replacements tests** to start validation 2007
- **Non-radioactive LLNA** under evaluation
- **Sen-it-iv (FP6)**




Themen

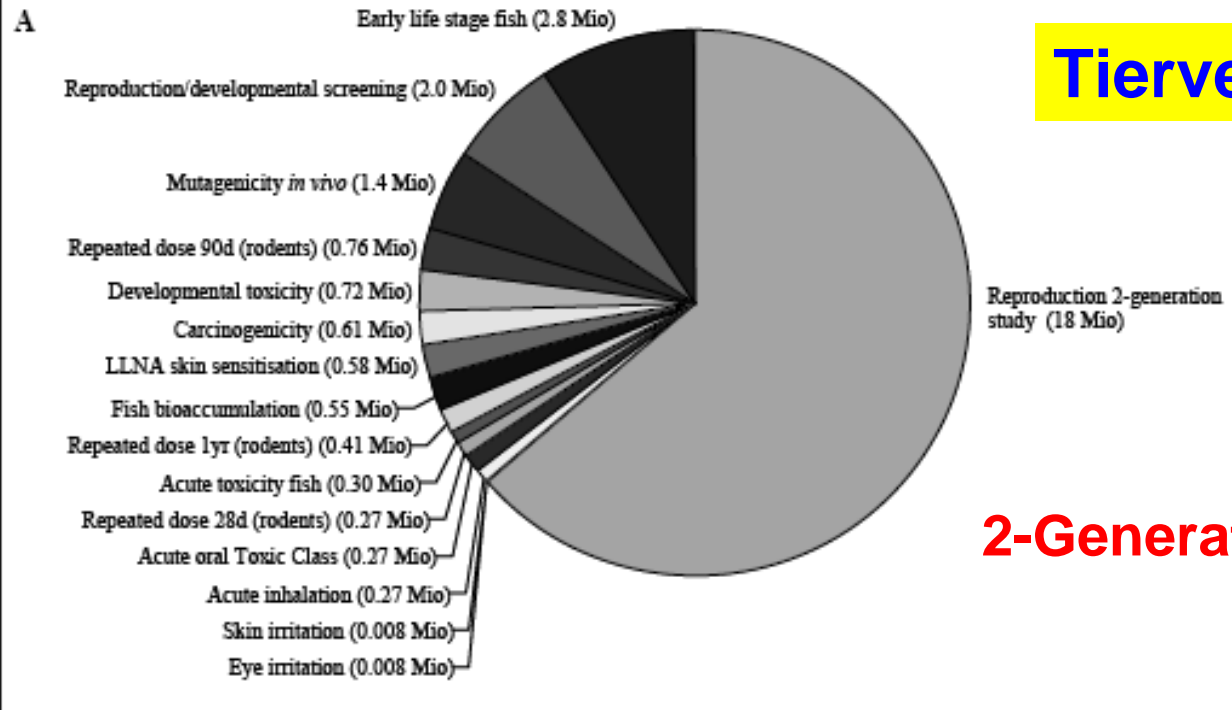
- I. **Initiativen der EU zur Reduzierung sicherheitstoxikologischer Tierversuche:
7. Änderung der EU Kosmetikrichtlinie & EU REACH Verordnung**
- II. **Beispiele von etablierten Alternativmethoden, die unter Federführung von ECVAM experimentell validiert wurden**
- III. **Lokale Toxizität – der Schwerpunkt der EU Kosmetikverordnung:
Haut, Auge & QSAR**
- IV. **Reproduktionstoxikologie – der Schwerpunkt von REACH**

Reproductive toxicity



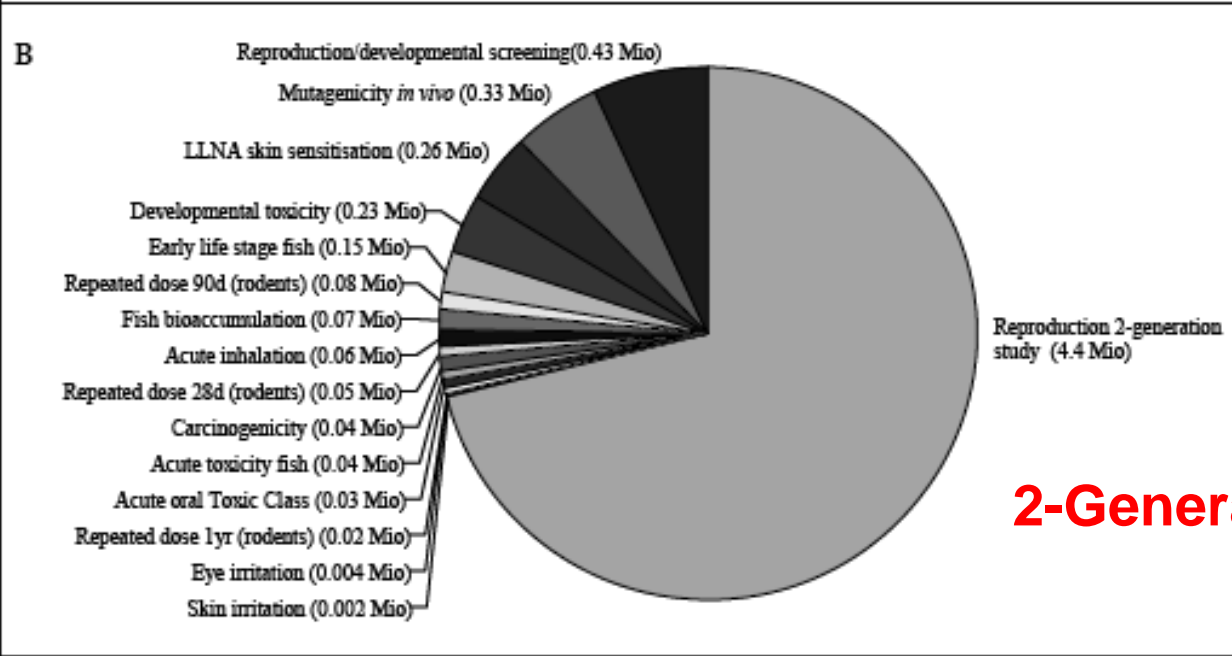
- Validated embryotoxicity tests to substitute for 2nd species and priority setting
- (Extended) one-generation study under validation, expected 2008
- Test battery for alerts under validation
- 11 endocrine disrupter tests under validation, expected 2008
-  (FP6)

Tierverbrauch durch REACH



A: Maximale Tierzahlen

2-Generations Studie 18 Mio.

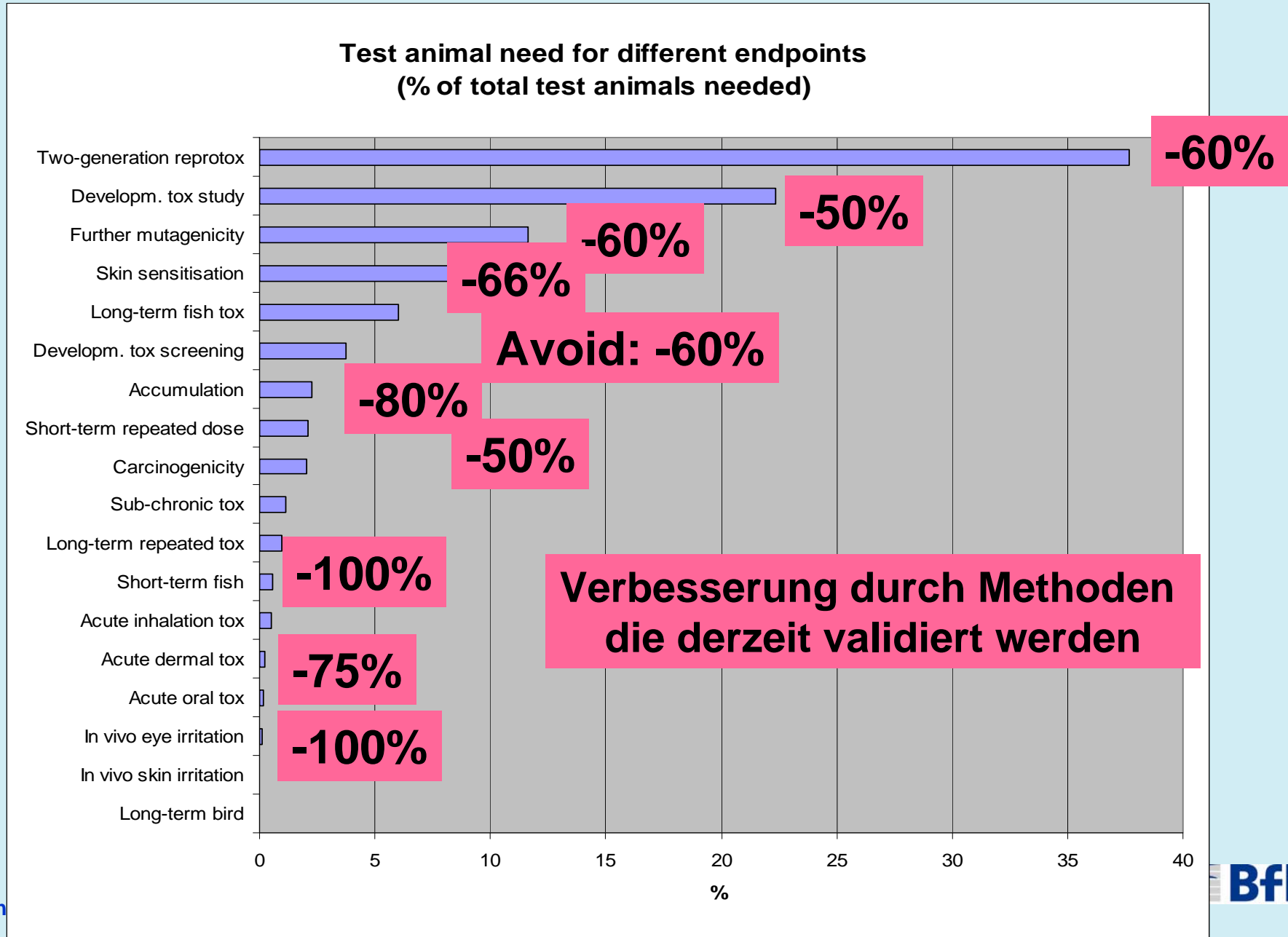


B: Minimale Tierzahlen

2-Generations Studie 4.4 Mio.

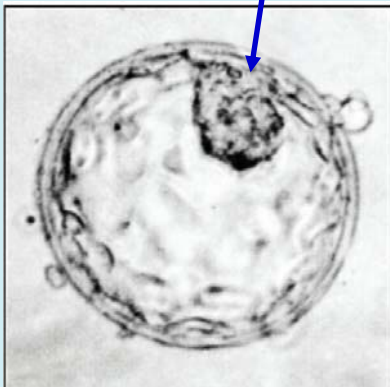
REACH: Geschätzter Tierversbrauch für einzelne Toxizitätstest

Quelle: EU Commission, van der Jagt et al., 2004

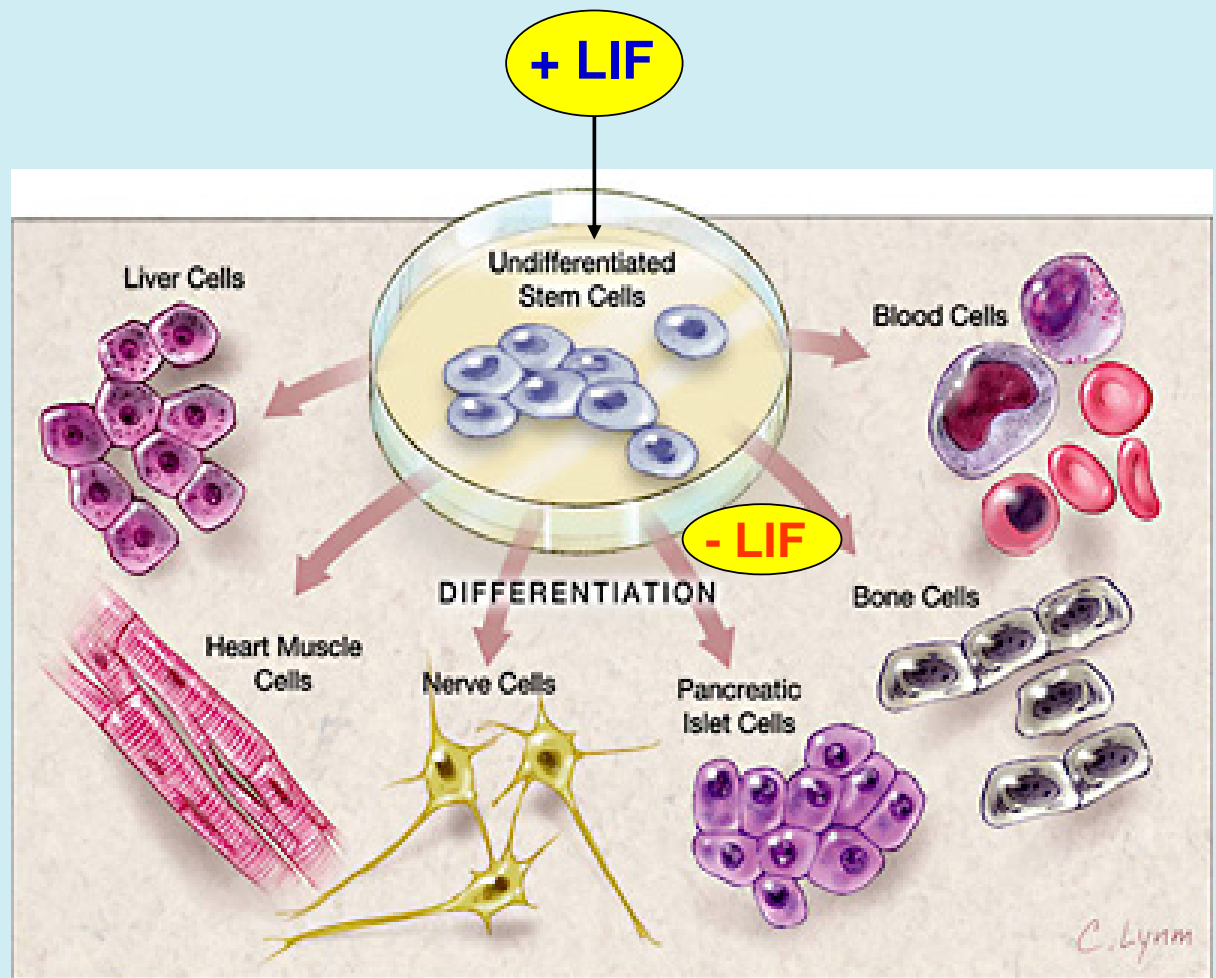


Herkunft und Entwicklungspotential von mESC

Inner Cell Mass



Maus Blastocyste



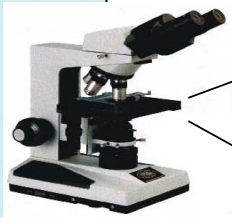
Messparameter im Embryonalen Stammzelltest mEST

embryonale Stammzellen

Endpoint 1:

inhibition of differentiation

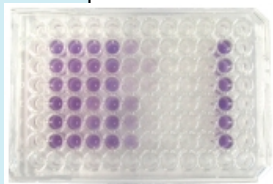
ES cells



Endpoint 2:

cytotoxic effects

ES cells

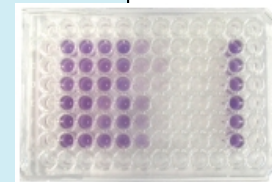


differenzierte Zellen

Endpoint 3:

cytotoxic effects

3T3 cells

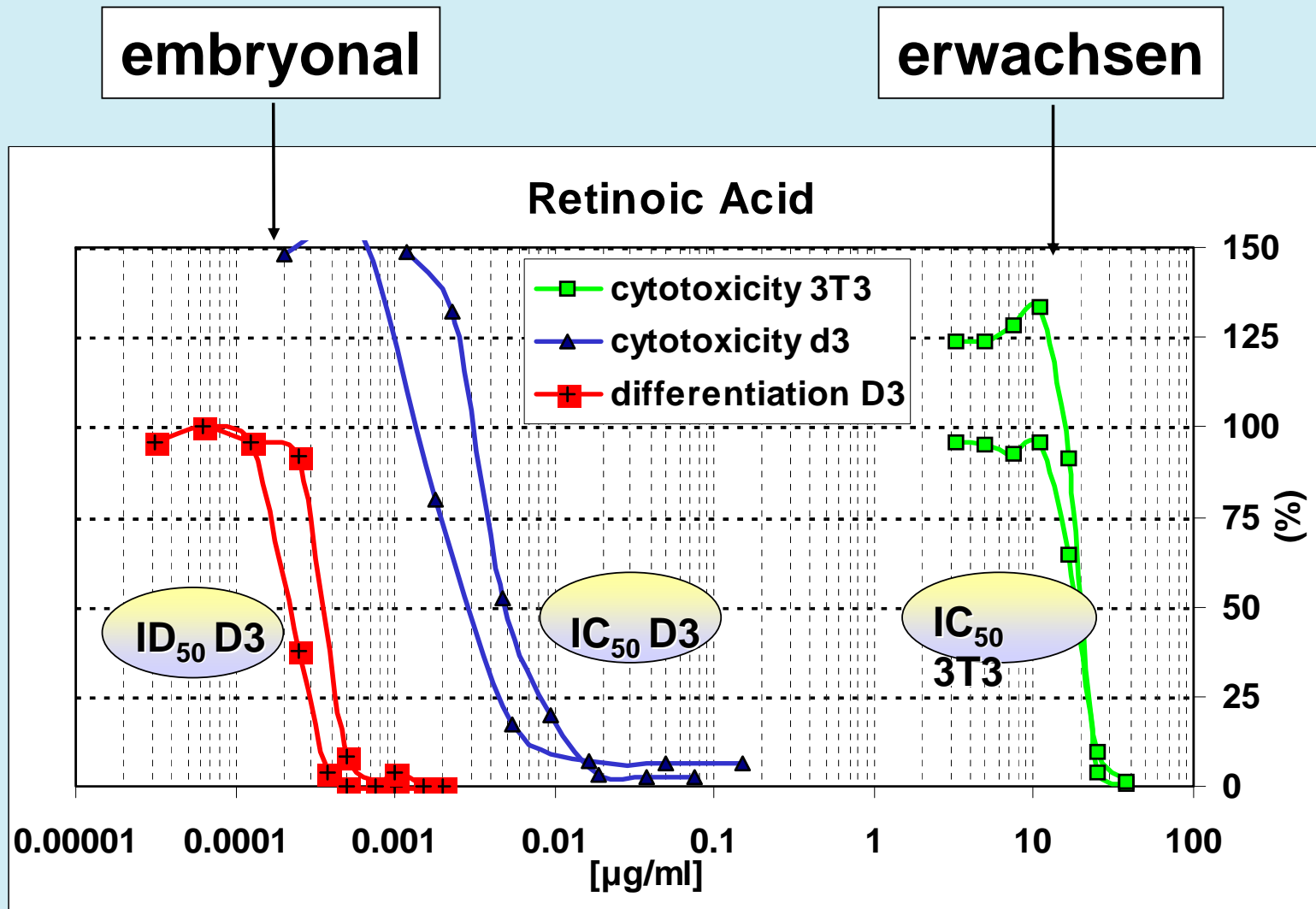


Endpoints: assessment from concentration response curves

- | | | |
|--|---|----------------------|
| 1. inhibition of differentiation in ES cells | → | ID ₅₀ |
| 2. cytotoxic effects on ES cells | → | IC ₅₀ D3 |
| 3. cytotoxic effects on 3T3 cells | → | IC ₅₀ 3T3 |

Embryotoxizitätsprüfung im mEST

Konzentrations-Wirkung-Kurve: Retinolsäure



Editorial

REACH Testing Requirements Must Not be Driven by Reproductive Toxicity Testing in Animals

Horst Spielmann and Richard Vogel⁴

3. It must be borne in mind that the chemicals used in drugs and pesticides are designed to interact with active molecules at the cellular level in the human body and in the pest species, respectively. In contrast, industrial chemicals are designed to improve the functions of chemical products for quite different purposes, often as a result of their physical properties, rather than their chemical reactivity. Thus, in contrast to drugs and pesticides, a large proportion of industrial chemicals are not toxic to reproduction.
4. This assumption is substantiated by experience obtained with more than 3000 new chemicals in the EU during the past 20 years, since only a few of these chemicals have been classified and labelled as toxic to reproduction.
5. There is no substantial evidence to prove a correlation between the adverse effects observed in two-generation studies in rodents and human reproduction and fertility.
6. When the two-generation study was introduced as an OECD Test Guideline in 1982, the test was not formally validated with respect to its relevance for human reproduction and fertility.

A retrospective analysis of the two-generation study: What is the added value of the second generation?

Gemma Janer*, Betty C. Hakkert, Wout Slob, Theo Vermeire, Aldert H. Piersma

National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), PO Box 1, 3720 BA Bilthoven, The Netherlands

Received 16 February 2007; received in revised form 10 April 2007; accepted 25 April 2007

Available online 6 May 2007

Reproductive Toxicology 24 (2007) 97–102

- 176 multi generation studies for 146 chemicals
- OECD 415 – one generation study
- OECD 416 – two generation study
- NOEL derived for reproductive endpoints

Peer-reviewed national or international data sources used

EU Risk Assessment Reports for Existing Substances
OECD Screening Information Dataset for High Production Volume Substances
Joint Meeting on Pesticide Residues
Environmental Health Criteria Monographs
Concise International Chemical Assessments Documents
US Agency for Toxic Substances and Disease Registry
US National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction
Canadian Pest Management Regulatory Agency
Health Council of the Netherlands
German Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance
California EPA Evaluation Reports

Ergebnis der Studie

The second generation in the two-generation studies considered affected neither the overall NOAEL nor the critical effect. Therefore, it had no impact on the ensuing risk assessment, nor on classification and labeling.

However, several substances did show an increased sensitivity of the F1 adults in comparison to the P0.

These results support the proposal of replacing the current 2-generation study by a 1-generation study with a more extensive assessment of parameters at F1 adulthood.

OECD 2007

OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME: BfR Vorschlag für eine verbesserte Prüfrichtlinie

Standard Project Submission Form - SPSF

env.tgcontact@oecd.org

PROJEKT NAME

Extended F1 Generation Study (TG 415)

EINGEREICHT VON

USA (Dr. Jerry Smrcek, U.S. National Coordinator)

Deutschland (Dr. Petra Greiner, DE National Coordinator)

Niederlande (Betty Hakkert, NL National Coordinator)



The European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing EPAA

- EU Parlament als Gesetzgeber
- EU Kommission + nationale Behörden
- Industrie – 7 europäische Industrieverbände
- NGOs – europäische Tierschutzverbände

EPAA Konferenzen

5. November 2005

18. Dezember 2006

5. November 2007

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit !

Horst Spielmann

FU Berlin & Federal Institute for Risk Assessment (BfR)
Diedersdorder Weg 1 • D-12277 Berlin
Tel. +49 30-8412-2270 • Fax +49 30-8412-2958
horst.spielmann@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de