

Tierversuchsfreie toxikologische Prüfmethoden für REACH

*Dr. Robert Landsiedel und Naveed Honarvar, Susanne Kolle,
BASF SE, 67056 Ludwigshafen am Rhein*

Tierversuchsfreie Methoden für toxikologische Prüfung unter REACH werden fast ausschließlich für die Endpunkte der Mutagenität und der lokalen Toxizität an Haut und Auge eingesetzt. Für die Prüfung der lokalen Toxizität von Chemikalien sind Methoden zur Untersuchung der Hautreiz- und Hautätzwirkung vollständig regulatorisch anerkannt, für die Augenreizwirkungen können zumindest starke Reizwirkungen mit regulatorisch anerkannten Methoden geprüft werden und für die hautsensibilisierende Wirkung ist zur Zeit keine tierversuchsfreie Methode regulatorisch anerkannt. Dennoch ist es auch heute schon möglich alle drei Endpunkte ohne Tierversuche zu prüfen und die Prüfergebnisse für REACH zu verwenden. Dies soll im Folgenden erläutert werden. Daten zu den drei Endpunkten der lokalen Toxizität müssen nach den Anhängen der EU-Verordnung 1907/2006 REACH für alle Chemikalien, die unter REACH registriert werden, erfasst und ggf. neu ermittelt werden, falls aussagekräftige Daten noch nicht vorliegen. In der REACH-Verordnung sind die toxikologischen Informationsanforderungen nach dem Produktionsvolumen und Gefährdungspotenzial der Chemikalien gestaffelt. Pro Substanz werden für die Prüfung der hautsensibilisierenden Wirkung 30 Meerschweinchen oder 20 Mäuse, für die Prüfung der Hautätz- und Hautreizwirkung drei Kaninchen und für die Augenreizwirkung ebenfalls drei Kaninchen eingesetzt.

Zur Prüfung der Hautätz- und Hautreizwirkung war bis vor wenigen Jahren ausschließlich der Test am Kaninchen (OECD Prüfvorschrift Nr. 404) gesetzlich anerkannt. Ende des Jahres 2004 wurde zunächst die Prüfung der Ätzwirkung an der Haut und seit dem Jahr 2010 auch die Prüfung der Reizwirkung an der Haut an rekonstruierten humanen Hautmodellen regulatorisch akzeptiert (OECD Prüfvorschrift Nr. 431 bzw. Nr. 439). Seit 2010 ersetzen beide Methoden die Prüfung der Hautätz- und Hautreizwirkung am Kaninchen vollständig.

Starke Augenreizwirkungen können mit dem Bovine Corneal Opacity and Permeability Test (BCOP, OECD Prüfrichtlinie Nr. 437) geprüft werden. Die hierfür erforderliche Test-Apparatur, das Opacitometer, haben wir entwickelt und validiert. Für die Prüfung schwacher Augenreizung ist nach wie vor ein Tierversuch mit Kaninchen gefordert. Um jedoch auch zur Prüfung der Augenreizwirkung vollständig auf Tierversuche verzichten zu können, haben wir für den Nachweis nicht-starker Augenreizwirkungen ein rekonstruiertes Hornhautmodell (EpiOcular™) intern evaluiert. Auch diese Methode wird derzeit von ECVAM validiert. Aus beiden Methoden haben wir eine Teststrategie entwickelt und validiert, die wir bereits seit zwei Jahren als vollständigen Ersatz des Draize Tests zur Prüfung der Augenreizwirkung am Kaninchen nutzen.



Zur Ermittlung, ob Stoffe beim Kontakt mit der Haut Allergien auslösen können, ist der so genannte Local Lymph Node Assay (LLNA; OECD Prüfvorschrift Nr. 429) mit Mäusen als Methode der Wahl vorgeschrieben. Der LLNA stellt eine Refinement-Reduction-Methode im Sinne des 3R-Konzeptes dar, kommt jedoch nicht ohne Tiere aus. Tests an Meerschweinchen (OECD Prüfvorschrift Nr. 406), sind nach REACH mit besonderer Begründung ebenfalls erlaubt. Hautsensibilisierung ist ein komplexer Prozess, der nicht durch eine einzige in vitro Methode hinreichend abgebildet werden kann. Ausgehend von der Erfassung der ausschlaggebenden Mechanismen, die in den Zellen der Haut ablaufen, wenn Kontaktallergien entstehen, haben wir eine Batterie von drei Testsystemen vorgeschlagen: Den Direct Peptide Reactivity Assay, der die Reaktion von allergisierenden Stoffen mit Proteinen in der Haut widerspiegelt; den LuSens (oder KeratinoSens™) Reporter Assays, die, wie erwähnt, die Reaktion der hornbildenden Zellen mit den sensibilisierenden Stoffen abbilden; den Monozyten-Aktivierungs-Assays MUSST und h-CLAT, die die Aktivierung der lokal in der Haut befindlichen Immunzellen beinhalten. Diese tierversuchsfreie Prüfstrategie haben wir umfassend evaluiert und nachgewiesen, dass sie dem bislang gesetzlich vorgeschriebenen Tierversuch (dem Local Lymph Node Assay, LLNA) überlegen ist. Allergische Wirkungen von Fremdstoffen am Menschen werden zu 94% korrekt vorhergesagt, eine außerordentlich hohe Prädiktivität, die über der des LLNA liegt (89%).

Wir haben bereits im Herbst 2009 unser eigenes Labor für regulatorische Haut- und Schleimhautprüfungen vollständig auf tierversuchsfreie Verfahren umgestellt. Obwohl die Prüfung der Augenreizwirkung und die Hautsensibilisierungs-Prüfstrategie noch nicht offiziell anerkannt sind, verwenden wir sie bereits heute für anstehende REACH-Dossiers. Mit den drei tierversuchsfreien Teststrategien können – rechtzeitig zur nächsten REACH Phase bis 2018 – 20 bis 36 Tiere pro Substanz eingespart werden.

