

Zur Prädiktion der letalen Konzentration beim Menschen mit Hilfe von Zytotoxizitätsdaten von 50 MEIC-Stoffen*

Willi Halle, Horst Spielmann und Manfred Liebsch

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

Zusammenfassung

Verfahren zur Prädiktion der Toxizität unterschiedlicher Stoffe für den Menschen mit Hilfe von Zytotoxizitätsdaten sind von aktuellem Interesse. Ziel dieser Studie war die Klärung der Frage, ob sich die Zytotoxizitätsdaten aus dem Register der Zytotoxizität (RC) für eine solche Prädiktion eignen. Für die Untersuchungen wurden die aus der Literatur bekannten letalen Konzentrationen (LC) und die letalen Plasmakonzentrationen (LPC) des Menschen verwendet. Alle Berechnungen sollten einheitlich so durchgeführt werden, dass sich die in der Literatur vorliegenden Daten miteinander vergleichen lassen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt: Für die 50 MEIC-Stoffe sind die IC_{50x} -Werte aus dem Register der Zytotoxizität (RC) zur Prädiktion der letalen Konzentration beim Menschen besser geeignet als IC_{50} -Werte, die mit einem Zelltyp und einem zytotoxischen Endpunkt gewonnen wurden. Das trifft sowohl für die Werte der Parameter der linearen Regression als auch für die Werte des Prädiktionsfehlers (PE) zu. Mit der Berechnung der mittleren letalen Konzentration LC_x lassen sich die Parameter zur Vorhersage der Toxizität beim Menschen leicht verbessern. Die vergleichenden Untersuchungen zeigen aber auch, dass die Zytotoxizitätsdaten in allen Fällen besser zur Vorhersage der akuten oralen Toxizität im Tierversuch geeignet sind als zur Vorhersage der Toxizität beim Menschen.

Die Ergebnisse bestätigen erneut die Qualität und Zuverlässigkeit der Zytotoxizitätsdaten des RC für unterschiedliche Fragestellungen in der Zytotoxikologie.

Summary: Prediction of human lethal concentrations by cytotoxicity data from 50 MEIC chemicals
Procedures for predicting human toxicity on the basis of

cytotoxicity data for different chemicals are of current interest. The study was designed to clarify the possibility of predicting human toxicity by using the cytotoxicity values IC_{50x} of the 50 MEIC chemicals listed in the Registry of Cytotoxicity (RC). All calculations with the data of cytotoxicity and in vivo toxicity were carried out uniformly by using standardised methods with the aim of comparing the results in the literature with each other.

The following results were obtained: Firstly, the IC_{50x} values in the RC are suited better for predicting human toxicity than IC_{50} values determined in cell culture experiments with one cell type and one cytotoxic endpoint. These results are correct for the values of linear regression parameters as well as for the values of the prediction error (PE) defined by Ponsoda et al. (1997). Secondly, by using the geometrical mean of four lethal concentrations (LC_x) - calculated from the tabulated lethal concentration (LC), lethal plasma concentration (LPC), clinical lethal concentration (CLC) and forensic lethal concentration (FLC) - the parameters for predicting the human toxicity were slightly improved. Moreover, these comparative examinations demonstrate that in all cases the cytotoxicity data are suited better for predicting acute animal toxicity than for predicting acute human toxicity.

The results are confirming, once more, the reliability and general validity of RC cytotoxicity data to investigate in vitro/in vivo correlations in acute toxicity testing.

Keywords: 3R, replacement, Registry of Cytotoxicity, MEIC-chemicals, prediction of human toxicity, prediction error, human lethal concentration, human lethal plasma concentration, in vitro/in vivo correlation, hepatocytes, Hep G2-cells, acute oral toxicity

1 Einleitung

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dienten die 50 Stoffe des MEIC-Programms. Es handelt sich um ein von der *Scandinavian Society of Cell Toxicology* organisiertes und unter der wissen-

schaftlichen Leitung von Björn Ekwall entwickeltes internationales Projekt (MEIC = *Multicenter Evaluation of In Vitro Cytotoxicity*), u.a. zur Abklärung der Beziehung zwischen der Human-Toxizität und der Zytotoxizität *in vitro* von 50 ausgewählten und in standardisierter Form

vorliegenden Stoffen (Bondesson et al., 1989).

Für diese 50 Stoffe liegen ihre letalen Konzentrationen (LC) und ihre letalen Plasmakonzentrationen (LPC) beim Menschen aus drei Originalarbeiten vor (Bariile et al., 1994; Ekwall et al., 1998; Ponsoda et al., 1997). Mit diesen Daten bieten sich neue Möglichkeiten zur Einschätzung der Vorhersage der Toxizitätsstärke beim

* Wir widmen diese Studie Björn Ekwall (Schweden), der mit seiner *Multicenter Evaluation of In Vitro Cytotoxicity* (MEIC) der *In Vitro* Toxicology neue wissenschaftliche Impulse gegeben hat.

Menschen auf der Grundlage der Zytotoxizitätsdaten (IC_{50}) von *in vitro* kultivierten Säugtier-Zellen.

Erste Schritte für ein solches Verfahren sind seit 1994 bekannt. Zur Quantifizierung des paarweisen Vergleiches der IC_{50} -Werte mit den LC-Werten (Ponsoda et al., 1997) und der IC_{50} -Werte mit den LPC-Werten (Barile et al., 1994) für 49 der 50 MEIC-Stoffe mit der linearen Regressionsanalyse verwendeten die Autoren jeweils einen Zelltyp und einen zytotoxischen Endpunkt pro Stoff. Die Ergebnisse der beiden Autorengruppen können allerdings nicht miteinander verglichen werden, da unterschiedliche Ansätze für die Berechnungen verwendet wurden.

In dem Register der Zytotoxizität (RC) liegen von 347 Stoffen die mittleren IC_{50} -Werte (IC_{50x}) vor, d.h. im RC wird für jeden Stoff aus wenigstens zwei IC_{50} -Einzelwerten das geometrische Mittel gebildet (Halle, 1998). Die Vorteile dieses Verfahrens zur Vorhersage der akuten Toxizität im Tierversuch wurden bereits dargestellt (Halle und Spielmann, 1994; Halle et al., 1997; Spielmann et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit ist es zu prüfen, ob für die 49 MEIC-Stoffe eine Prädiktion der humanen letalen Konzentration in einem für praktische Belange akzeptierbaren Konzentrationsbereich möglich ist und ob sich die Prädiktion der Human-Toxizität durch Verwendung der IC_{50x} -Werte aus dem RC verbessern lässt. Zusätzlich sollten die Berechnungen einheitlich so durchgeführt werden, dass sowohl die Daten aus der Originalliteratur als auch die neuen Berechnungen miteinander vergleichbar sind. Zu diesen Fragestellungen liegen bisher in der Literatur keine Ergebnisse vor.

So wie in vorangegangenen Untersuchungen (Halle und Spielmann, 1997) sollten auch weitere Belege für eine allgemeine Verwendbarkeit der im RC erfassten Zytotoxizitätsdaten (IC_{50x}) zur Vorhersage der Toxizitätsstärke von Stoffen im Organismus und für unterschiedliche Fragestellungen in der Zytotoxikologie zusammengestellt werden. Eine solche Verfahrensweise trägt dazu bei, quantifizierbare Auskünfte über die Zuverlässigkeit der Daten im RC zu gewinnen.

Auf der Grundlage der Daten im RC entwickelten wir praktikable Verfahren zur Vorhersage der akuten oralen Toxizität im Tierversuch (LD_{50} p.o.) und zur Einstufung von Stoffen in EU-Toxizitätsklassen mit

einer berechneten Einsparung von rund 30% an Versuchstieren (Halle et al., 1997; Spielmann et al., 1999). Ausgangspunkt für diese Verfahren bildet die lineare Regressionsanalyse zur Abschätzung der Beziehung zwischen den log-transformierten Wertepaaren IC_{50x} - LD_{50} p.o. auf molarer Basis für Ratte/Maus für die 347 Stoffe im RC. Die Standard-Regressionsgerade nach $\log LD_{50} = a + b \cdot \log IC_{50x}$ ist charakterisiert durch den Intercept-Wert $a = 0,625$ und den Regressionskoeffizienten $b = 0,435$. Um die *in vivo* Toxizität (LD_{50}) vorhersagen zu können, muss diese der y-Achse zugeordnet sein. Von den 347 Stoffen sind 252 Stoffe (72,6%) in einem LD_{50} -Dosis-Bereich um die Regressionsgerade lokalisiert, der durch den empirischen Faktor $FG = < \log 5$ mit der oberen und unteren Prädiktionsgrenze charakterisiert ist. In 72,6% der Fälle lässt sich die LD_{50} demnach in einem relativ engen Dosisbereich von wenig mehr als einer Größenordnung einer Dosis Einheit vorhersagen, zum Beispiel in einem Falle von 1 bis 25 mmol/kg Körpergewicht. Die außerhalb dieses FG-Bereiches liegenden Stoffe weichen als falsch positive und falsch negative Wertepaare um mehr als das fünffache von den geschätzten LD_{50} -Werten (y) auf der Regressionsgeraden ab. Aus diesen Ergebnissen, mit einer relativen großen Zahl an Stoffen gewonnen, wird geschlussfolgert, dass auch alle neu zu prüfenden Stoffe ein gleiches Verteilungsmuster wie die Wertepaare dieser 347 Stoffe aufweisen. Ein Beweis für eine solche Allgemeingültigkeit der Standardregressionsgeraden wurde mit dem Befund erbracht, dass sowohl von den ersten 117 Stoffen des RC aus dem Jahre 1988 als auch nach der neuesten Erweiterung des RC von 107 zusätzlichen Stoffen sich die Werte der Parameter der linearen Regression nicht signifikant von den Werten der Regressionsparameter für die 347 Stoffe unterscheiden. Zu dieser außerordentlich guten Reproduzierbarkeit der geschätzten Parameter finden sich ausführliche Hinweise in einer seit 1998 vorliegenden Monographie zum RC (Halle, 1998).

Auf die standardisierte Auswahl der IC_{50} -Einzelwerte aus der Originalliteratur und der Werte der akuten oralen Toxizität Ratte/Maus zur Aufnahme eines Stoffes in das RC kann an dieser Stelle nicht eingegangen werden.

Parallel zu diesen Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass zwischen den mittleren IC_{50} -Werten (IC_{50x}) im RC und den aus sechs Arbeiten aus der Literatur stammenden IC_{50} -Werten von Hepatozyten und Hepatomzellen eine signifikante Korrelation besteht mit Werten des Korrelationskoeffizienten $r > 0,9$ bei einer Anzahl der Stoffe pro Gruppe $n > 15$ (Halle und Spielmann, 1997). Dieses Ergebnis ist von besonderem Interesse, da im RC die IC_{50} -Werte von Hepatozyten und Hepatomzellen nicht mit erfasst worden sind, die RC-Daten jedoch hier für Vergleiche mit den Daten von Leberzellen verwendet werden. Darüber hinaus liefert das Ergebnis auch einen weiteren Beweis für die Allgemeingültigkeit der IC_{50x} als numerische Größe für Aussagen der Zytotoxizitätsstärke von Stoffen mit unterschiedlichen chemischen Strukturen und biologischen Wirkungen an unterschiedlichen Zellsystemen. Weitere Belege für ein breites Spektrum der Anwendbarkeit dieser RC-Daten enthält diese Arbeit.

2 Methoden und Verfahren

Für die vergleichenden Untersuchungen dienten im ersten Schritt die Arbeiten von Ponsoda et al. (1997) und von Barile et al. (1994).

Ponsoda et al. (1997) untersuchten die Möglichkeit, mit Hilfe von Zytotoxizitätsdaten (IC_{50}) von 49 der 50 MEIC-Stoffe Rückschlüsse auf die letale Konzentration (LC) dieser Stoffe beim Menschen zu ziehen. Zu diesem Zweck wurden die IC_{50} -Werte von Hepatozyten adulter Ratten und von Hepatomzellen (Zelllinie Hep G2) mit den tabellarisch erfassten mittleren letalen Konzentrationen für die MEIC-Stoffe verglichen. Als zytotoxischen Endpunkt wählten die Autoren den MTT-Test und eine Einwirkungszeit tE der Stoffe von 24 h. Die Autoren definieren die LC als den gemittelten Schätzwert der absorbierten Fraktion eines Stoffes durch den Darm und des Verteilungsvolumens eines Stoffes im Blut mit der letalen Blutkonzentration in μM aus insgesamt 12 Literaturquellen. Die Autoren führten bei 40 der insgesamt 49 untersuchten MEIC-Stoffe einen Vergleich zwischen den IC_{50} -Werten und den LC-Werten mit dem einfachen linearen Regressionsmodell durch. Als weiterer Parameter für die Wertepaare IC_{50} - LC diente ihnen der Prädiktionsfehler (PE) für eine

quantifizierbare Einschätzung der Vorhersage der letalen Toxizität. Von Ponsoda und Mitarbeitern wird der Faktor PE als Summe der Quadrate der Differenz zwischen $\log IC_{50}$ und $\log LC$, dividiert durch n (als Anzahl der Stoffe pro Gruppe) angegeben. In eine allgemeine Form gebracht, lautet die Gleichung $PE = \text{Summe} (\log x - \log y)^2 / n$. Je niedriger der PE-Wert liegt, desto besser lassen sich die *in vitro* Daten mit den *in vivo* Daten vergleichen. Die Autoren geben allerdings keine Bewertungsskala an. Für Vergleichszwecke berechneten die Autoren von den MEIC-Stoffen auch die PE-Werte für die Wertepaare mit der IC_{50} und der akuten oralen Toxizität (LD_{50} p.o.) für Ratte/Maus.

In unseren Untersuchungen haben wir diese Daten mit den dem RC zugrunde liegenden Daten zur Zytotoxizität (IC_{50x}) und *in vivo* Toxizität (LD_{50} p.o.) verglichen. Für diesen Vergleich wurden auch die LPC-Werte von Barile et al. (1994) herangezogen. Die Werte liegen in mg/ml als nicht gemittelte Einzelwerte vor. Die Autoren verwendeten ebenfalls das lineare Regressionsmodell für die Wertepaare IC_{50} -LPC. Als zytotoxischen Endpunkt wählten sie die Proteinsynthese von Lungenepithelzellen der Ratte (Zelllinie CCL-149) bei einer Expositionszeit t_E von 24 h. Neben der letalen Konzentration und der letalen Plasmakonzentration sind für die 50 MEIC-Stoffe von Ekwall et al. (1998) auch die klinische letale Konzentration (CLC) und die forensische letale Konzentration (FLC) für den Menschen als $\log M$ -Werte zusammengestellt worden. Wir berechneten das geometrische Mittel der vier letalen Konzentrationen LC, LPC, CLC, und FLC als LCx für jeden MEIC-Stoff und prüften mit der linearen Regression die Möglichkeit einer Vorhersage der mittleren letalen Konzentration (LCx) mit den IC_{50x} -Werten aus dem RC. Für einen zusätzlichen Vergleich der Wertepaare *in vitro* - *in vivo* verwendeten wir den von uns früher eingeführten und im RC beschriebenen empirischen Faktor $FG \leq \log 5$. Mit diesem Faktor lässt sich nach Berechnung der einfachen linearen Regression der prozentuale Anteil der Wertepaare bestimmen, die nicht mehr als $\pm 0,699$ von den logarithmierten Werten auf der Regressionsgeraden $\log y = a + b * \log x$ abweichen. Alle Berechnungen wurden mit den Konzentrationen in mmol/Li-

ter (mM) und mit den Dosen in mmol/kg Körpergewicht (mmol) durchgeführt. Als Voraussetzung für eine Prädiktion der *in vivo* Toxizitäten sind diese stets der y-Achse zugeordnet. Mit dem Durbin-Watson-Koeffizienten (DW in Tab. 1) nach Lozán wurde der Grad der Abhängigkeit der Residuen untereinander - die Autokorrelation (Selbstkorrelation) - geprüft. Bei DW-Werten zwischen 1,5 und 2,5 kann nicht auf eine Autokorrelation geschlossen werden, und der gewählte Ansatz kann akzep-

zwischen den LP-Werten und den LPC-Werten auf molarer Basis ein hochsignifikanter linearer Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,939$.

3 Ergebnisse

3.1 Letale Konzentration (LC)

Mit der einfachen linearen Regressionsanalyse $\log LC = a + b * \log IC_{50}$ untersuchten wir von 49 MEIC-Stoffen den Zusammenhang zwischen den LC-Werten und MTT-

Tabelle 1: Vergleich der Zytotoxizität mit der letalen Konzentration beim Menschen und der akuten oralen Toxizität im Tierversuch (LD_{50} p.o.) mit der einfachen linearen Regressionsanalyse für die 50 MEIC-Stoffe.

Nr.	Zytotoxizität	<i>in vivo</i> Toxizität	n	r	a	b	DW	im FG-Bereich	
								%	(n)
1	MTT Hepatozyten	LC	49	0,744	-0,825	0,884	1,87	51,0	(25)
2	MTT Hep G2	LC	49	0,764	-1,123	0,966	1,86	55,1	(27)
3	IC_{50x}	LC	49	0,789	-0,684	0,904	1,58	63,3	(31)
4	Prot	LPC	49	0,586	-1,01	0,685	1,81	63,3	(31)
5	IC_{50x}	LPC	49	0,736	-0,765	0,788	1,99	67,3	(33)
6	IC_{50x}	LCx	50	0,801	-0,659	0,844	1,92	68,0	(34)
7	IC_{50x}	LD_{50} p.o.	50	0,839	0,276	0,689	2,01	80,0	(40)

Bei den $\log x$ -Werten handelt es sich entweder um die IC_{50} -Werte von Hepatozyten (Nr.1) oder Hepatomzellen (Nr.2) im MTT-Test von Ponsoda et al. (1997) oder um die IC_{50x} -Werte aus dem RC.

Für die $\log y$ -Werte wurden die LC-Werte von Ponsoda et al. (1997) oder die LD_{50} p.o.-Werte Ratte/Maus aus dem RC verwendet.

Entsprechend einer Festlegung im RC werden die p.o.-Werte für die Maus nur dann verwendet, wenn keine Werte für die Ratte existieren.

Die Konzentrationen wurden als mmol/Liter (mM) und die Dosen als mmol/kg Körpergewicht (mmol) eingesetzt.

tiert werden, das heißt, die Voraussetzungen für die Anwendung des Regressionsmodells ohne das Vorliegen systematischer Fehler sind erfüllt (Lozán, 1992).

Für nachvollziehbare Berechnungen mit den 49 MEIC-Stoffen muss noch auf zwei Ausnahmen hingewiesen werden: Bei den insgesamt 50 MEIC-Stoffen sind in den für die Berechnungen herangezogenen Publikationen der LC-Wert für Diphenylhydantoin (MEIC-Nr. 44) und der LPC-Wert für Natriumchlorid (MEIC-Nr. 13) nicht mit aufgeführt. Für diese 48 Stoffe besteht

Werten (IC_{50}) von Hepatozyten und Hepatomzellen aus der Arbeit von Ponsoda et al. (1997) einerseits und zwischen den LC-Werten und IC_{50x} -Werten aus dem RC andererseits. Die Werte in Tabelle 1 zeigen, dass eine stärkere Korrelation zwischen den Wertepaaren IC_{50x} -LC existiert als zwischen den Paaren MTT-LC. Mit Werten des DW von 1,58 bis 1,87 kann nicht auf eine Autokorrelation der Residuen geschlossen werden. Ferner ist der Befund von Bedeutung, dass mit den MTT-Daten rund 19% bzw. 13% weniger

Tabelle 2: Vergleich der Werte des Prädiktionsfehlers (PE) für die 49 MEIC-Stoffe entsprechend der allgemeinen Formel $PE = \text{Summe} (\log x - \log y)^2/n$.

Nr.	Zytotoxizität	<i>in vivo</i> Toxizität	n	PE
1	MTT Hepatozyten	LC	49	1,698
2	MTT Hep G2	LC	49	2,194
3	IC _{50x}	LC	49	1,299
4	IC _{50x}	LCx	49	1,121
5	MTT Hepatozyten	LD ₅₀ p.o.	49	0,758
6	MTT Hep G2	LD ₅₀ p.o.	49	0,736
7	IC _{50x}	LD ₅₀ p.o.	50	0,543

Bei den $\log x$ -Werten handelt es sich entweder um die IC₅₀-Werte von Hepatozyten (Nr.1) oder Hepatomzellen (Nr.2) im MTT-Test von Ponsoda et al. (1997) oder um die IC_{50x}-Werte aus dem RC.

Für die $\log y$ -Werte wurden die LC-Werte von Ponsoda et al. (1997) oder die LD₅₀ p.o.-Werte Ratte/ Maus aus dem RC verwendet.

Entsprechend einer Festlegung im RC werden die p.o.-Werte für die Maus nur dann verwendet, wenn keine Werte für die Ratte existieren.

Die Konzentrationen wurden als mmol/Liter (mM) und die Dosen als mmol/kg Körpergewicht (mmol) eingesetzt.

Stoffe im FG-Bereich lokalisiert sind als mit den IC_{50x}-Daten aus dem RC. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich mit den IC_{50x}-Werten die LC eindeutiger vorhersagen lässt als mit den IC₅₀-Werten von Leberzellen im MTT-Test.

3.2 Die letale Plasmakonzentration (LPC)

Mit den LPC- und IC₅₀-Werten erzielten wir für die 49 der 50 MEIC-Stoffe ein besseres Ergebnis als mit den LC-Werten, denn 63% der Wertepaare liegen im FG-Bereich (Tab. 1, Nr. 4). Allerdings wird mit $r = 0,586$ der niedrigste Wert des Korrelationskoeffizienten überhaupt erreicht (Nr. 4). Bezogen auf die Anzahl der Wertepaare IC₅₀ - LPC und IC_{50x} - LPC im FG-Bereich steigt mit den IC_{50x}-Werten der prozentuale Anteil der Stoffe im FG-Bereich geringfügig an, von 63% auf 67%.

3.3 Die Vorhersage der mittleren letalen Konzentration (LCx) mit der mittleren Zytotoxizität (IC_{50x})

In der Tabelle 1 sind die Werte der linearen Regressionsanalyse für die Wertepaare IC_{50x} - LCx (Nr.6) vergleichbar mit den Wertepaaren IC_{50x} - LD₅₀ p.o. Ratte/Maus (Nr. 7) zusammengestellt. Mit Korrelationskoeffizienten r um 0,8 ($r^2 = 0,64$) besteht eine statistisch hochsignifikante Beziehung zwischen den IC_{50x}- und LCx-

Werten. Im Bereich der niedrigsten zytotoxischen Grenzkonzentration der 50 MEIC-Stoffe von 0,0032 mM für Hexachlorophene bei Lungenepithelzellen bis rund 1000 mM liegen, wie zu erwarten war, die fünf Ausgleichsgeraden von Nr. 1 bis Nr. 5 in dem Bereich $FG \leq \log 5$, der durch die Regressionsgerade in Nr. 6 für die mittlere letale Konzentration LCx definiert ist. Allerdings können die Vorteile der Vorhersage der LCx durch die IC_{50x} nicht in dem Umfange genutzt werden wie die Vorhersage der akuten oralen Toxizität im Tierversuch mit der IC_{50x}, denn nur 68% der Stoffe sind in dem Bereich lokalisiert, der durch den Faktor $FG \leq \log 5$ definiert ist.

3.4 Prädiktionsfehler (PE)

Die PE-Werte stehen in der Arbeit von Ponsoda et al. (1997) im Mittelpunkt; sie sind in der Tabelle 2 verzeichnet. Mit den IC_{50x}-Werten des RC liegt der PE-Wert um rund 24% und 41% niedriger als die PE-Werte der Leberzellen (Tab. 2, Nr. 1 und Nr. 2). Der PE-Wert kann mit der mittleren letalen Konzentration (LCx) weiter verbessert werden (Tab. 2, Nr. 4). Wenn in der Gleichung die LC durch die akute orale Toxizität (LD₅₀ p.o.) für Ratte/Maus aus dem RC ersetzt wird, verbessert sich der PE-Wert mit den RC-Daten um durchschnittlich 27% gegenüber den IC₅₀-Werten der Leberzellen.

4 Diskussion

Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten, die Toxizität der 50 MEIC-Stoffe für den Menschen vorherzusagen. Mit unserem Verfahren, die mittlere letale Konzentration LCx und die Zytotoxizitätsdaten aus dem Register der Zytotoxizität mit der linearen Regressionsanalyse auf eine Abhängigkeit zu prüfen, lieferten ein überraschend gutes Ergebnis. Für 68% der Stoffe lässt sich die Toxizitätsstärke in einem relativ engen Bereich von etwas mehr als einer Größenordnung einer Konzentrationseinheit vorhersagen.

Vergleichende Untersuchungen zu bereits publizierten Daten sind wie im vorliegenden Falle deshalb berechtigt, weil zusätzliche Informationen zu einer aktuellen Problematik gewonnen werden konnten, wie sie die Prädiktion der letalen Konzentration beim Menschen darstellt. Die Berechnungen wurden so durchgeführt, dass die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse miteinander verglichen werden können. Für eine Einschätzung der Prädiktion der letalen Konzentration waren die Berechnungen aber auch aus zwei weiteren Gründen erforderlich: (1) Ponsoda et al. (1997) ordneten die LC der x-Achse zu; (2) die Berechnungen wurden von den Autoren ohne diejenigen neun MEIC-Stoffe durchgeführt, bei denen der Quotient IC₅₀/LC einen Wert > 100 erreicht (Digoxin, Xylene, Paraquat, Thallium sulfate, Lindane, Isoniazid, Barium nitrate, Amphetamine sulphate, Atropine sulphate). Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen sollten diese Stoffe in die Berechnungen einbezogen werden. Auf die Problematik willkürlicher Streichungen von Werten oder Wertepaaren bei statistischen Berechnungen haben wir bereits früher hingewiesen (Halle, 1995).

Sowohl für die letale Konzentration (LC) als auch für die letale Plasmakonzentration (LPC) gilt, dass mit den IC_{50x}-Werten aus dem RC bessere Voraussetzungen für eine Prädiktion der Toxizität beim Menschen gegeben sind als bei Verwendung von IC₅₀-Werten, die an einem Zelltyp und mit einem zytotoxischen Endpunkt gewonnen wurden. Die Werte in Tabelle 1 lassen aber auch erkennen, dass sich die Möglichkeit der Prädiktion einer Toxizität beim Menschen noch verbessern lässt, wenn die mittlere letale Konzentration (LCx) für

die Berechnungen verwendet wird. Allerdings werden noch nicht die günstigen Werte der Parameter der linearen Regression erreicht, wie sie zur Vorhersage der akuten oralen Toxizität im Tierversuch (LD_{50} p.o.) für die 50 MEIC-Stoffe vorliegen.

Die Ergebnisse lassen ferner erkennen, dass die IC_{50x} -Werte des RC wenigstens mit gleicher Qualität und Zuverlässigkeit für unterschiedliche Fragestellungen in der Zytotoxikologie eingesetzt werden können wie Zytotoxizitätsdaten, die an einem Zellsystem und mit einem zytotoxischen Endpunkt gewonnen wurden. Speziell für die 49 MEIC-Stoffe gilt, dass sich die IC_{50x} -Werte aus dem RC für eine Vorhersage der Toxizität beim Menschen besser eignen als Zytotoxizitätsdaten, die mit anderen Verfahren gewonnen wurden. Ferner lässt sich die LPC präziser vorhersagen als die LC.

Unter Berücksichtigung des berechneten Prädiktionsfehlers (PE) lassen sich mit den RC-Daten bessere Resultate erzielen als mit den IC_{50} -Werten von Hepatozyten und Hepatomzellen. Weitere Beispiele für eine breitere Anwendung und für bessere Resultate mit den RC-Daten liegen zusätzlich vor (Halle und Spielmann, 1997).

Für eine zusammenfassende Beurteilung, mit Hilfe von Zytotoxizitätsdaten die Toxizität beim Menschen vorherzusagen, möchten wir noch auf die Beziehung zwischen der IC_{50x} und der akuten oralen Toxizität (LD_{50} p.o.) bei Ratte/Maus hinweisen. Ein Vergleich der Werte in Tabelle 1, Nr. 6 mit Nr. 7 zeigt, dass trotz Berechnung der mittleren letalen Konzentration LCx nicht die günstigen Parameterwerte zur Vorhersage der LD_{50} p.o. erreicht werden. Auch aus den PE-Werten in Tabelle 2 ist zu ersehen, dass sich die Zytotoxizitätsdaten besser zur Vorhersage der akuten oralen Toxizität im Tierversuch eignen als zur Vorhersage der Toxizität beim Menschen. Allein anhand der PE-Werte kommen Ponsoda et al. (1997) zu einem gleichen Schluss. Die Autoren verweisen in diesem Zusammenhang darauf, dass die Angaben zur letalen Konzentration beim Menschen ungenauer sein können als die im Tierexperiment unter mehr oder weniger gut kontrollierbaren Versuchsbedingungen bestimmten LD_{50} -Werte.

Ponsoda et al. (1997) fassen in einer Tabelle von sieben Zellkultursystemen (Ascites- und Muskelzellen, Nieren- und Synovialzellen, Neurone) die aus den IC_{50}

-Werten berechneten PE-Werte zusammen: Die Werte von 1.57 bis 2.34 für 47 bis 49 MEIC-Stoffe sind höher als der PE-Wert in Tabelle 2 für die IC_{50x} . Ein PE-Wert für Keratinozyten mit $PE = 1,3$ kann nicht mit für einen Vergleich herangezogen werden, da Wallace et al. (1993) in der zitierten Publikation keine IC_{50} Werte publiziert haben.

Zur Bewertung des Faktors PE lässt sich auf Grund der Ergebnisse folgende vorläufige Skala der Beziehung zwischen der *in vitro* und *in vivo* Toxizität aufstellen:

PE > 2,0 schlecht

PE 2,0 bis $\geq 1,0$ gut

PE < 1,0 bis $\geq 0,6$ sehr gut

PE < 0,6 ausgezeichnet

Zusammenfassend lässt sich aus der vorliegenden Studie der Schluss ziehen, dass für eine Prädiktion der letalen Konzentration (LC) beim Menschen aus Zytotoxizitätsdaten die IC_{50x} -Werte des RC besser geeignet sind als die IC_{50} -Werte, die an einem Zellsystem und mit einem zytotoxischen Endpunkt bestimmt wurden. Ferner lässt sich die letale Plasmakonzentration (LPC) präziser vorhersagen als die LC.

Literatur

- Barile, F. A., Dierickx, P. J., and Kristen, U. (1994). In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biology and Toxicology* 10, 155-162.
- Bondesson, I., Ekwall, B., Hellberg, S., Romert, L., Stenberg, K., and Walum, E. (1989). MEIC - A new international multicenter project to evaluate the relevance to human toxicity of in vitro cytotoxicity tests. *Cell Biology and Toxicology* 5, 331-348.
- Ekwall, B., Clemenson, C., Crafoord, B., Ekwall, B., Hallander, S., Walum, E. and Bondesson, I. (1998). MEIC Evaluation of acute systemic toxicity. Part V. Rodent and human toxicity data for the 50 reference chemicals. *ATLA* 26, 571-616.
- Halle, W. (1995). Antwort auf den Kommentar von P. Günzel und B. Spiegel. *ALTEX* 12, 105-107.
- Halle, W. (1998). Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD_{50}) zur Einsparung

von Tierversuchen. *Schriften des Forschungszentrums Jülich: Reihe Lebenswissenschaften/ Life Sciences*, Band 1, 92 Seiten.

- Halle, W. und Spielmann, H. (1997). Die Prädiktion der akuten Toxizität mit Hilfe von Zytotoxizitätsdaten. In H. Schöffl, H. Spielmann und H. A. Tritthart (Hrsg.), *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen; Band IV, Forschung ohne Tierversuche 1996* (10-19). Wien, New York: Springer Verlag.
- Halle, W., Liebsch, M., Traue, D. und Spielmann, H. (1997). Reduktion der Tierzahlen bei der Einstufung von Stoffen in die EU-Toxizitätsklassen für akute orale Toxizität mit Hilfe von Daten aus dem Register der Zytotoxizität (RC). *ALTEX* 14, 8-15.

Lozán, J. L. (1992). *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*. 237 Seiten; Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey.

Ponsoda, X., Núñez, C., Castell, J. V., and Gómez-Lechón, M. J. (1997). Evaluation of the cytotoxic effects of MEIC chemicals 31-50 on primary culture of rat hepatocytes and hepatic and non-hepatic cell lines. *ATLA* 25, 423-436.

Spielmann, H., Genschow, E., Liebsch, M., and Halle, W. (1999). Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD_{50}) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. *ATLA* 27, 957-966.

Wallace, K. A., Harbell, J. W., Janus, J., and Curren, R. D. (1993). The use of normal human keratinocytes and the neutral red uptake bioassay to assess MEIC compounds number 31-50. *In Vitro-cellular and developmental biology: Animal* 29, 98A.

Danksagung

Die Studie wurde mit Fördermitteln der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) im BgVV unterstützt.

Korrespondenzadresse

Dr. habil. Willi Halle
c/o ZEBET im BgVV
Diedersdorfer Weg 1
D-12277 Berlin
Tel. +49-(0)1888-412-2270
Fax +49-(0)1888-412-2958
E-mail: zebet@bgvv.de