Ergebnisse der ersten Phase des ECVAM-Projektes zur Prävalidierung und Validierung von drei *in vitro* Embryotoxizitätstests

Gabriele Scholz[1], Ingeborg Pohl[1], Andrea Seiler[1], Susanne Bremer[2], Nigel A. Brown[3], Aldert H. Piersma[4], Hermann Georg Holzhütter[5] und Horst Spielmann[1]

[1] ZEBET/BgVV, D-Berlin, [2] ECVAM, I-Ispra, [3] St. Georges Hospital Medical School, UK-London, [4] RIVM, NL-Bilthoven, [5] Institut für Biochemie der Charité, Humboldt Universität, D-Berlin

Zusammenfassung

Es wird über die ersten Ergebnisse einer ECVAM Prävalidierungs- und Validierungsstudie von drei in vitro Embryotoxizitätstests berichtet: die Kultur ganzer Rattenembryonen, den Micromass-Test und den embryonalen Stammzelltest. Drei Testsubstanzen mit unterschiedlichen embryotoxischen Eigenschaften (stark, schwach und nicht embryotoxisch) sowie eine positive und eine negative Kontrollsubstanz wurden wiederholt in jedem Test in je zwei Laboratorien experimentell geprüft. Die Ergebnisse wurden einer unabhängigen statistischen Analyse unterzogen. Es wurde dabei gezeigt, daß die Methodik der drei in vitro Embryotoxizitätstests jeweils von einem Labor in ein zweites Labor übertragbar war und daß reproduzierbare Ergebnisse erhalten wurden. Mit allen drei in vitro Methoden wurden die Testsubstanzen entspechend ihrer Embryotoxizität korrekt eingestuft. Im Rahmen dieser Studie wurde außerdem eine Datenbank mit Testchemikalien für die in vitro Embryotoxizitätstestung erarbeitet, aus der die Prüfsubstanzen für die Validierungsstudie mit den drei in vitro Tests ausgewählt werden sollen.

Summary: Results of the first phase of the ECVAM project „prevalidation and validation of three in vitro embryotoxicity tests"

The results of the experimental prevalidation of three in vitro embryotoxicity tests in an ECVAM study are reported: the rat whole embryo culture assay (WEC), the micromass assay (MM) and the embryonic stem cell test (EST). Three test chemicals assigned to the three classes of embryotoxicity, non-, moderate- and strong embryotoxic, and also a positive and a negative control chemical were repeatedly tested in each test in two laboratories. The data obtained were evaluated independently by a biostatistician. It could be shown that the standard protocols (SOPs) for the three in vitro embryotoxicity tests could be transferred to a second laboratory and that reproducible results were obtained. The three methods were able to discriminate the test chemicals according to their embryotoxic potential. In addition, within the scope of this study, a test chemical database for in vitro embryotoxicity testing was established that will be used in the following formal validation of the three in vitro tests.

Keywords: in vitro test, embryotoxicity, prevalidation study, embryotoxic potential, whole embryo culture, micromass assay, embryonic stem cell test

1 Einleitung

1997 wurde unter der Federführung von ZEBET mit einer vom Europäischen Validierungszentrum ECVAM finanzierten Studie zur Prävalidierung (Curren et al., 1995) und Validierung (Balls and Karcher, 1995; Balls et al., 1995) von drei *in vitro* Embryotoxizitätstests begonnen. Bei den Tests handelt es sich um Methoden, bei denen chemische Stoffe an kultivierten, ganzen Rattenembryonen (WEC*), an Kulturen dissoziierter Zellen von Extremitätenknospen und des Mittelhirns von Rattenembryonen (MM; Micromass) oder an totipotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus auf ihren Einfluß auf das Wachstum und die embryonale Differenzierung geprüft werden.

An der Prävalidierungsphase, die im Dezember 1997 erfolgreich abgeschlossen wurde, nahmen vier europäische Laboratorien teil, jeweils zwei für jede Testmethode. ZEBET führte als leitendes Labor den embryonalen Stammzelltest (EST) durch. Die drei anderen teilnehmenden Laboratorien waren die „*St. Georges Hospital Medical School*" der Universität von London (GB) als führendes Labor für den MM-Test und als zweites Labor für den WEC-Test, das „*National Institute of Public Health and the Environment*" (RIVM), Bilthoven (NL), als führendes Labor für den WEC-Test und als zweites Labor für den MM-Test, sowie ECVAM am „*Joint Research Centre*" in Ispra (I) als zweites Labor für den EST. Darüber hinaus erhielt das Institut für Biochemie der Charité (Humboldt Universität zu Berlin) einen Untervertrag für die biometrische Auswertung aller ermittelten Daten. Einen weiteren Untervertrag erhielt Nigel Brown (*St. Georges Hospital Medical School*, Universität von London) für die Erstellung einer Datenbank für Testchemikalien, die geeignet sind, in Validierungsstudien von *in vitro* Embryotoxizitätstests eingesetzt zu werden. Der Aufbau der Prävalidierungsstudie ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

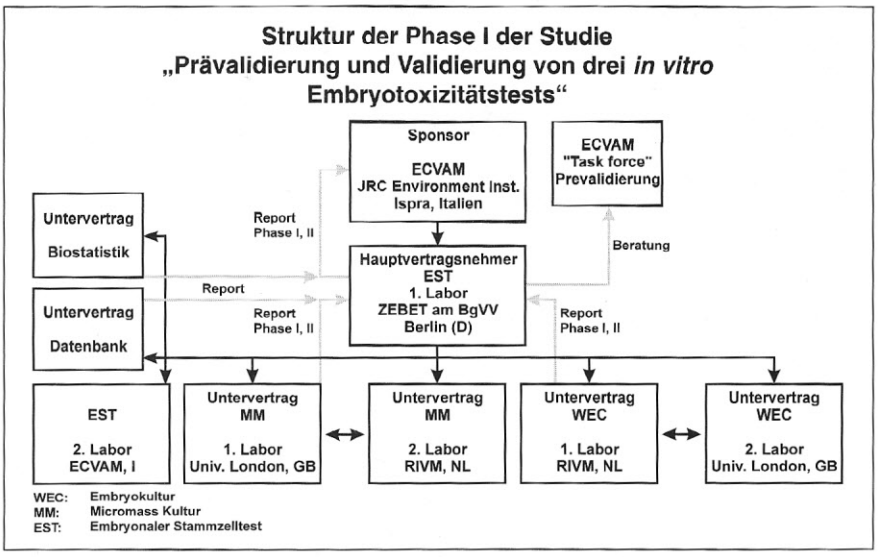


Abb. 1: Flußdiagramm der Durchführung der Studie „Prävalidierung von *in vitro* Embryotoxizitätstests" (in Anlehnung an Balls et al., 1995).
Das Diagramm zeigt die in die Studie involvierten Vertrags- und Untervertragsnehmer. Die Untervertragsnehmer berichten dem Hauptvertragsnehmer ZEBET über ihre Ergebnisse, die von ZEBET zusammengefaßt an den Sponsor ECVAM weitergegeben werden. Die Beziehungen der Institutionen untereinander sind durch Pfeile gekennzeichnet.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Embryonaler Stammzelltest (EST)

Embryonale Stammzellen der Maus können in Zellkultur mit Hilfe des „*Leucemia Inhibitory Factor*" (LIF) im undifferenzierten Stadium gehalten werden (Williams et al., 1988). Der EST, der bei ZEBET entwickelt wurde, nutzt die Fähigkeit dieser embryonalen Stammzellen, *in vitro* unter definierten Kulturbedingungen ohne Einwirkung von LIF spontan kontrahierende Herzmuskelzellen zu entwikkeln. Der Einfluß von Testsubstanzen auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen (Kontraktionen, die bei mikroskopischer Auswertung registriert werden) wird verglichen mit dem zytotoxischen Effekt (MTT-Test) auf die Stammzellen und dem zytotoxischen Effekt auf differenzierte, „erwachsene" Zellen (3T3 Mäuse-Fibroblasten). Die Halbhemmkonzentrationen für den zytotoxischen Effekt auf 3T3-Zellen und ES-Zellen und die Halbhemmkonzentrationen für die Differenzierung von ES-Zellen dienen zur Klassifizierung der Testsubstanzen in die drei Embryotoxizitätsklassen nicht, schwach oder stark embryotoxisch in einem logarithmischen, auf Diskriminanzanalyse basierenden Prädiktionsmodell (Laschinski et al., 1991; Spielmann et al.,1997).

2.2 Kultur ganzer Rattenembryonen (WEC)

Embryonen werden am Tag 10 der Schwangerschaft trächtigen Rattenweibchen entnommen und unter genau definierten Bedingungen in Gegenwart von Testsubstanzen kultiviert. Eine umfangreiche Zahl morphologischer und entwicklungsspezifischer Parameter wird zu Beginn und nach 48stündiger Entwicklung in der Kultur genau dokumentiert. Den Beobachtungen werden je nach ihrer Ausprägung Zahlenwerte auf einer Skala von 0-6 zugeordnet, die eine quantitative Auswertung der gewonnenen Daten in Dosis-Wirkungs-Kurven ermöglichen (Amacher et al., 1996; Bechter & Schön, 1988; Brown and Fabro, 1981; Piersma et al., 1995). Dabei wird zwischen spezifischen Effekten der Testchemikalien auf die Entwicklung bestimmter Organe (z.B. des Neuralrohrs) und einer generellen Wachstumsverzögerung (z.B. Kopf-Rumpf Länge) unterschieden.

2.3 Kultur von Zellen der Extremitätenknospen und des Mittelhirns (Micromass, MM) von Rattenembryonen

Rattenweibchen werden am Tag 13 der Schwangerschaft die Embryonen entnommen; an diesen werden unter dem Mikroskop die Extremitätenknospen und das Mittelhirn isoliert. Nach Dissoziation der Zellen werden diese in hoher Zelldichte (= *micromass*) in geeigneten Medien kultiviert, die eine Differenzierung in Knorpelzellen bzw. neuronale Zellen ermöglichen. Nach 6 Tagen Kultur in Gegenwart der Testsubstanzen wird geprüft, ob die embryonalen Zellen eine normale Differenzierung durchlaufen haben. Dies geschieht bei den Zellen der Extremitätenknospen durch eine für differenzierte Knorpelzellen spezifische Färbemethode mit Alcian Blau. Die Zellen des Mittelhirns bilden Nervenzellkolonien (Foci), in denen man nach spezifischer Anfärbung zwischen einer normalen und einer gestörten Differenzierung unterscheiden kann (Amacher et al., 1996; Flint and Orton, 1984; Kistler, 1987; Uphill et al., 1990). Der Einfluß der Behandlung auf die Differenzierung der beiden embryonalen Zelltypen wird verglichen mit dem rein zytotoxischen Effekt der Substanzen auf beide Zelltypen, der durch Färbung mit Neutralrot bestimmt wird. Die Halbhemmkon-

Tabelle: Liste der Testsubstanzen der Prävalidierungsphase

Testsubstanzen der Phase I-Prävalidierung		
Embryotoxizität	**Test Substanzen**	**CAS Nr.**
nicht embryotoxisch	Saccharin Natriumhydrat (Sac)	82385-42-0
schwach embryotoxisch	5,5 Diphenylhydantoin Natrium (DPH)	630-93-3
stark embryotoxisch	Cytosin -b-D-Arabinofuranosid- hydrochlorid (AraC)	69-74-9
	Kontrollen	
nicht embryotoxisch	Penicillin G Natriumsalz (Pen G)	69-57-8
stark embryotoxisch	5-Fluoruracil (5-FU)	51-21-8

zentrationen für die Zytotoxizität und die Differenzierung werden anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Rahmenbedingungen der Prävalidierung

3.1.1 Entwicklung von Standardprotokollen und Transfer der Methode in ein zweites Testlabor

Im ersten Abschnitt der Prävalidierungsphase wurden zunächst von den leitenden Labors Standardprotokolle (SOPs) entwickelt, und die Methode wurde anschließend in einem zweiten Labor etabliert. Die Übertragbarkeit der SOPs wurde durch Testung mit positiven und negativen Kontrollsubstanzen (5-Fluoruracil und Penicillin G) geprüft. Die Prüfung in einem zweiten Labor führte zur Klärung technischer Fragen in den SOPs, die aufgrund dieser Überprüfung verbessert wurden.

3.1.2 Auswahl von Testsubstanzen für die Prävalidierung

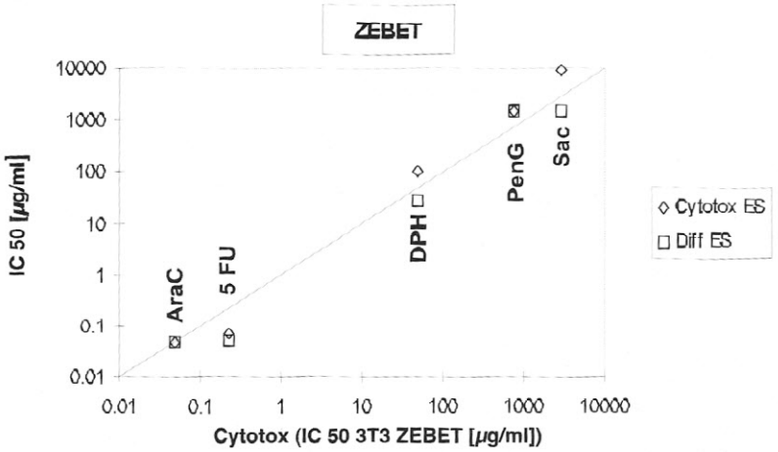
Für eine erste Beurteilung der Anwendbarkeit der drei Embryotoxizitätstests wurden drei Substanzen mit unterschiedlichen embryotoxischen Eigenschaften (s. Tabelle, ausgewählt aus Smith et al., 1983) sowie eine positive und eine negative Kontrollsubstanz in jedem der drei *in vitro* Tests wiederholt in den jeweils zwei Laboratorien geprüft.

3.2 Ergebnisse der Prävalidierungsstudie

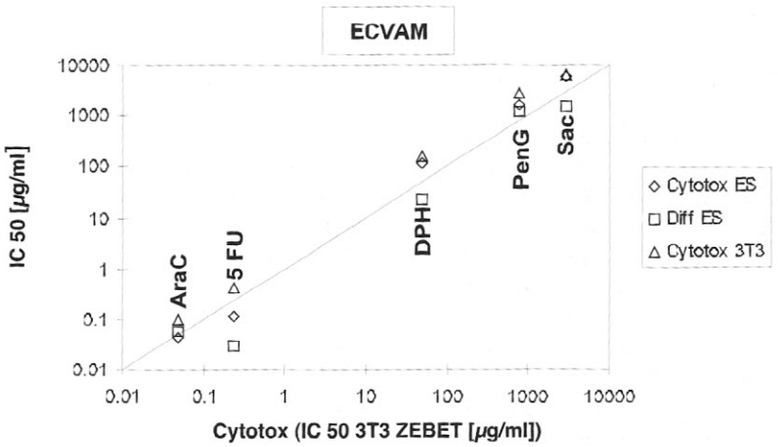
3.2.1 Biometrie

Die biometrische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Hermann Georg Holzhütter (Humboldt Universität zu Berlin). Werte der Halbhemmkonzentrationen wurden aus Dosis-Wirkungs-Kurven mit Hilfe des Programmes FITGRAPH (Holzhütter and Quedenau, 1995) berechnet. Die Variabilität der Endpunkte (*intra-* und *inter*-Laborvarianz) wurde durch zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt, welche die Wahrscheinlichkeit der Signifikanz einer Abweichung liefert und damit auf systematische Fehler hinweist. *Inter*-Laborvarianzen wurden darüberhinaus durch „Scatter-Plots„ mit Hilfe der „S-Plus4.0" Software dargestellt (nicht gezeigt). Die Klassifizierung des embryotoxischen Potentials der Test-Substanzen erfolgte anhand der in den Stndardprotokollen vorgeschlagenen Prädiktionsmodelle.

Ergebnisse des Embryonalen Stammzelltestes (EST)



ZEBET	Pen G µg/ml	Sac µg/ml	DPH µg/ml	5-FU µg/ml	Ara-C µg/ml
Cytotox 3T3	765	2934	49.4	0.2301	0.0494
Cytotox ES	1558	8959	104	0.0723	0.0486
Diff ES	1532	1560	27.3	0.0515	0.0466

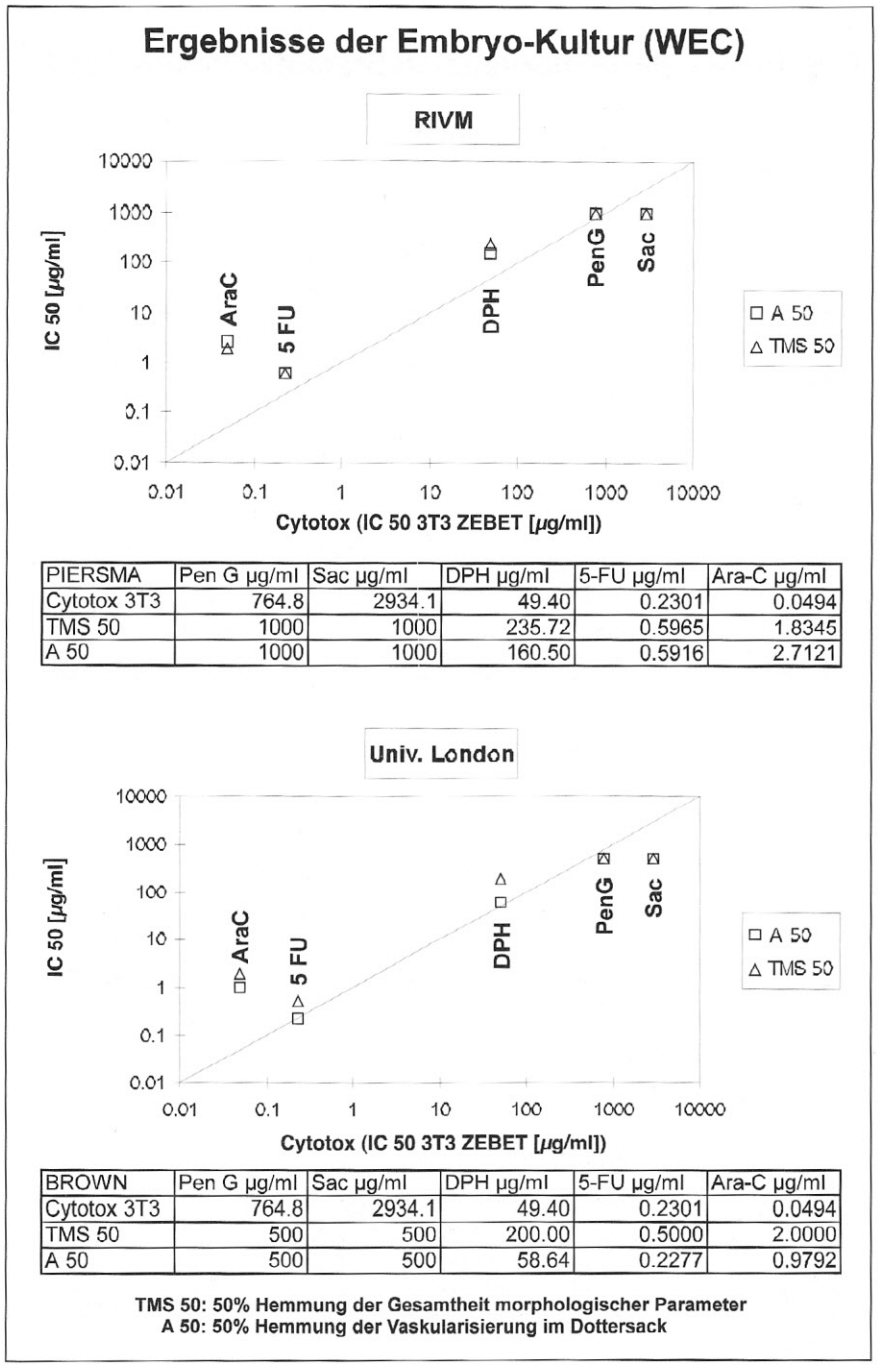


ECVAM	Pen G µg/ml	Sac µg/ml	DPH µg/ml	5-FU µg/ml	Ara-C µg/ml
Cytotox 3T3 ZEBET	765	2934	49.4	0.2301	0.0494
Cytotox ES	1561	5935	108.6	0.1191	0.0422
Diff ES	1200	1454	22.8	0.0285	0.0573
Cytotox 3T3	2779	6366	150.8	0.4293	0.0975

Abbildung 2: Mit dem EST gewonnene Daten bei ZEBET (oben) und ECVAM (unten). Die Halbhemmkonzentrationen für die Zytotoxizität an ES-Zellen (IC_{50} ES) und die Differenzierung an ES-Zellen (ID_{50} ES) für alle 5 getesteten Substanzen wurden gegen die Halbhemmkonzentrationen für die Zytotoxizität bei 3T3-Zellen (IC_{50} 3T3) auf der x-Achse aufgetragen. Die absoluten IC_{50} und ID_{50} Werte der beiden Laboratorien sind in der jeweiligen Tabelle aufgeführt.

3.2.2 Der Embryonale Stammzelltest (EST)

Embryonale Stammzellen sind generell gegenüber embryotoxischen Substanzen empfindlicher als „erwachsene" oder bereits differenzierte Zellen. Damit ist mit dem EST eine Unterscheidung zwischen zytotoxischen und embryotoxischen Substanzen möglich. Der EST lieferte sehr gut reproduzierbare Ergebnisse in beiden durchführenden Laboratorien. Die bei ZEBET als dem leitenden Labor und ECVAM als dem zweiten Labor gewonnenen Daten sind in der Abb. 2 dargestellt



PIERSMA	Pen G µg/ml	Sac µg/ml	DPH µg/ml	5-FU µg/ml	Ara-C µg/ml
Cytotox 3T3	764.8	2934.1	49.40	0.2301	0.0494
TMS 50	1000	1000	235.72	0.5965	1.8345
A 50	1000	1000	160.50	0.5916	2.7121

BROWN	Pen G µg/ml	Sac µg/ml	DPH µg/ml	5-FU µg/ml	Ara-C µg/ml
Cytotox 3T3	764.8	2934.1	49.40	0.2301	0.0494
TMS 50	500	500	200.00	0.5000	2.0000
A 50	500	500	58.64	0.2277	0.9792

TMS 50: 50% Hemmung der Gesamtheit morphologischer Parameter
A 50: 50% Hemmung der Vaskularisierung im Dottersack

Abbildung 3: Ergebnisse der Embryokultur aus dem leitenden (RIVM, oben) und dem zweiten Labor (Univ. London, unten).
Gezeigt sind die Halbhemmkonzentrationen von zwei morphologischen Endpunkten für 5 getestete Substanzen: (1) die Gesamtheit aller morphologischen Parameter und (2) die Vaskularisierung im Dottersack (y-Achse). Diese wurden gegen die Halbhemmkonzentration der Zytotoxizität in 3T3-Zellen im Stammzelltest (IC_{50} 3T3) aufgetragen (x-Achse). Die absoluten Werte der Halbhemmkonzentrationen sind in der jeweiligen Tabelle angegeben.

und jeweils den Werten für die Zytotoxizität bei „adulten" 3T3-Zellen (Ergebnisse von ZEBET) gegenübergestellt. Allein anhand der IC_{50} Konzentrationen lassen sich die Testsubstanzen als stark (5-Fluoruracil, 5-FU; Cytosinarabinosid, AraC), schwach (Diphenylhydantoin, DPH) und nicht embryotoxisch (Penicillin G, PenG; Saccharin, Sac) identifizieren. Die schwach bzw, stark embryotoxischen Substanzen DPH und 5-FU lassen darüberhinaus deutlich einen Unterschied zwischen differenzierungsabhängigen und zytotoxischen Effekten erkennen (die ID_{50} ES liegt deutlich unterhalb der Diagonalen, d.h. unterhalb der IC_{50} 3T3). Die Übereinstimmung aller drei Werte bei AraC spiegelt demgegenüber dessen eher zytotoxische Wirkungsweise wider.

Mit Hilfe des Prädiktionsmodells für den EST wurden vier von fünf Substanzen korrekt eingestuft. Die schwach embryotoxische Substanz Diphenylhydantoin wurde als nicht embryotoxisch klassifiziert. Auch im zweiten Labor gab es eine Fehlklassifizierung. Hier wurde die nicht embryotoxische Substanz Penicillin G als schwach embryotoxisch eingestuft. Wurden jedoch die Mittelwerte der Daten aus beiden Laboratorien gebildet und in das Prädiktionsmodell eingesetzt, so wurden alle fünf Substanzen korrekt eingestuft.

3.2.3 Kultur ganzer Rattenembryonen

Aufgrund der minimal effektiven Konzentrationen konnten in der Embryokultur die Testsubstanzen nach dem in der SOP definierten Prädiktionsmodell korrekt eingestuft werden. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar und in beiden Laboratorien vergleichbar, d.h. sowohl die *inter-* als auch die *intra*-Laborvarianz war ausreichend gering, was durch die Analyse des unabhängigen Biostatistikers gezeigt werden konnte. Die Abb. 3 zeigt die Ergebnisse beider Laboratorien im Vergleich zu den Zytotoxizitätswerten (IC_{50} 3T3) aus dem embryonalen Stammzelltest. Die Einstufungen der Testsubstanzen korrelieren hauptsächlich mit ihrem zytotoxischen Potential. Auffällig ist hier, daß der WEC-Test gegenüber AraC im Vergleich zum EST und zum MM-Test (s.u.) deutlich unempfindlicher ist. Dies könnte durch eine Diffusionsbarriere im intakten Embryo erklärt werden, die weder im EST noch im MM-Test gegeben ist. Die drei getesteten Testsubstanzen führten in der Embryokultur nicht zu spezifischen, also nur bestimmte Organe betreffenden embryotoxischen Effekten. Sie wurden deshalb als unspezifisch embryotoxisch bewertet.

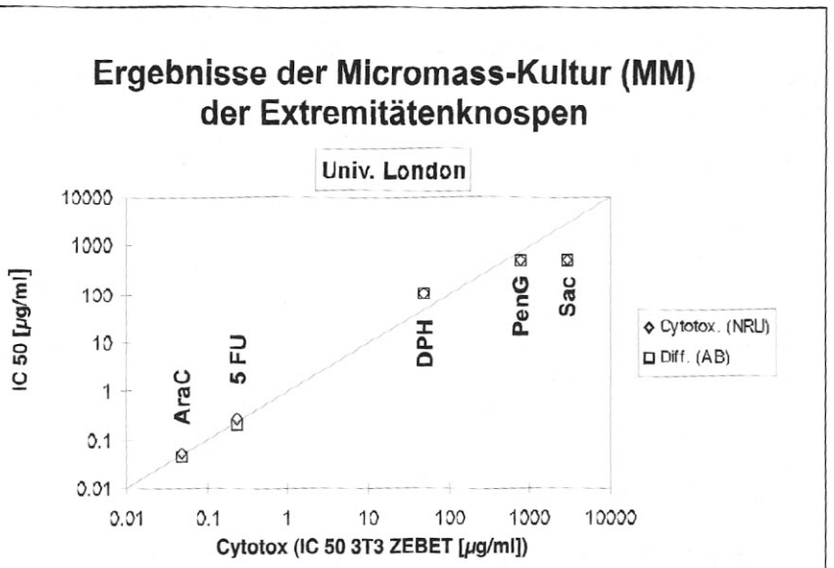
3.2.4 Micromass Kultur (MM-Test)

Mit dem MM-Test konnten die Testsubstanzen anhand ihrer Halbhemmkonzentrationen ebenfalls eingestuft werden, und

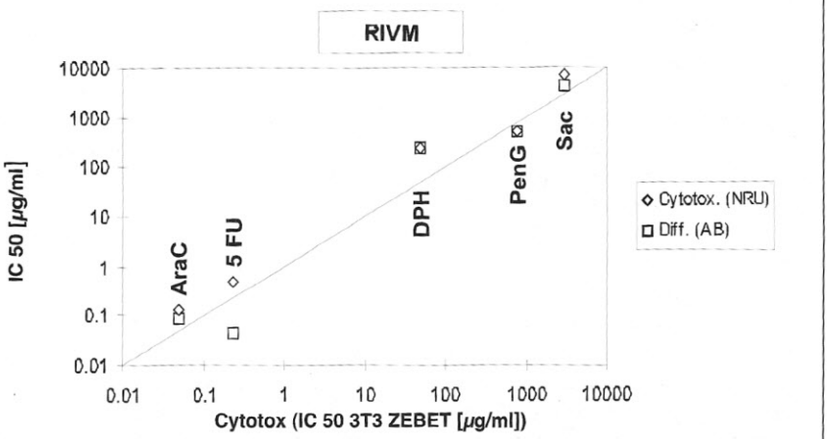
auch in diesem Test waren die *inter*- und *intra*-Laborvarianzen (mit Ausnahme der Halbhemmkonzentrationen für die Mittelhirn-Micromass-Kultur, s.u.) ausreichend gering. Es war jedoch kein Unterschied zwischen Differenzierung und Zytotoxizität feststellbar (s. Abb. 4). Das in der SOP beschriebene Prädiktionsmodell erfordert zur Einstufung eines Stoffes als embryotoxisch eine um den Faktor 2 höhere Halbhemmkonzentration für die Zytotoxizität (IC_{50}; Neutral Rot-Färbung) als für die Differenzierung (ID_{50}, Alcian Blau-Färbung), und zusätzlich müssen die IC_{50} und/oder die ID_{50} unter 100 µg/ml liegen. Da die IC_{50} Werte der Zytotoxizität sich kaum von den ID_{50} Werten der Differenzierung unterschieden, konnte eine Einstufung praktisch nur anhand der Zytotoxizitätsdaten erfolgen. In dieser Hinsicht muß das Prädiktionsmodell des MM-Tests noch verbessert werden. Darüber hinaus gestaltete sich die Auswertung der Mittelhirn-Micromass-Kultur als schwierig, da keine monoton abfallenden Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt werden konnten und somit die Bestimmung der IC_{50}- und ID_{50}-Werte sehr ungenau wurde. Es muß deshalb geprüft werden, ob für die Validierungsphase ein verbessertes Protokoll für die Mittelhirn-Micromass-Kultur gefunden werden kann, oder ob im MM-Test auf die Kultur von Zellen aus dem Mittelhirn ganz verzichtet werden soll und nur die Extremitätenzellen im MM-Test validiert werden.

3.3 Erarbeitung einer Datenbank von Testsubstanzen zur Prüfung auf embryotoxische Eigenschaften

Der erfahrene englische Embryotoxikologe Nigel Brown erarbeitete im Rahmen dieser Studie die bisher umfassendste Datenbank potentieller Testsubstanzen für *in vitro* Embryotoxizitätstests. Sie enthält über diese Stoffe alle verfügbaren Literaturdaten aus der Testung im Tierversuch in unterschiedlichen Spezies und soweit erhältlich auch Erfahrungen am Menschen. Die Datenbank enthält außerdem auch die Ergebnisse von früheren *in vitro* Embryotoxizitätsstudien. Darüber hinaus wurden Listen von Smith und Schwetz aus den USA in der Datenbank berücksichtigt, in der Prüfsubstanzen für die *in vitro* Embryotoxizitätstestung ausgewählt wurden (Smith et al., 1983; Schwetz and Harris, 1993). In der in dieser Studie erarbeiteten Datenbank werden die Stoffe zudem nach der Stärke ihrer Embryotoxizität klassifiziert. Eine endgültige Entscheidung über die Auswahl von 20 Testsubstanzen für die Prüfung in der Validierungsphase dieser Studie wird im Frühjahr 1998 getroffen.



BROWN	Pen G µg/ml	Sac µg/ml	DPH µg/ml	5-FU µg/ml	Ara-C µg/ml
Cytotox 3T3	765	2934	49.40	0.2301	0.0494
Cytotox. (NRU)	500	500	102.23	0.2754	0.0507
Diff. (AB)	500	500	107.47	0.2116	0.0459



PIERSMA	Pen G µg/ml	Sac µg/ml	DPH µg/ml	5-FU µg/ml	Ara-C µg/ml
Cytotox 3T3	765.00	2934.10	49.40	0.23	0.05
Cytotox. (NRU)	500.00	7013.60	242.47	0.50	0.13
Diff. (AB)	500.00	4487.40	233.57	0.04	0.09

Abbildung 4: Ergebnisse der Micromass-Kultur aus Extremitätenknospen aus dem leitenden Labor (Univ. London, oben) und dem zweiten Labor (RIVM, unten).
Die Ergebnisse der Mittelhirn-Micromass-Kultur sind nicht gezeigt. Die IC_{50} Werte der Zytotoxizität (Neutral Rot-Färbung, NRU) und die ID_{50} Werte der Differenzierung (Alcian Blau Färbung, AB) wurden den IC_{30} 3T3 Werten von ZEBET (Zytotoxizität) gegenübergestellt. Die absoluten Werte sind in der jeweiligen Tabelle aufgeführt.

4 Fortführung der Prävalidierungsstudie als Validierungsstudie im Jahr 1998

Ende 1997 wurde der Abschlußbericht über die Prävalidierung der drei *in vitro*

Embryotoxizitätstests bei ECVAM eingereicht und als erfolgreich beurteilt. 1998 wird die Studie nunmehr mit der formalen Validierung fortgesetzt. Daran werden insgesamt 12 Laboratorien beteiligt, es sind jeweils vier für jede Testmethode vorgesehen. Es steht ein Zeitraum von mindestens 2 Jahren zur Verfügung. Während einer initialen Trainingsphase ist eine weitere Verbesserung der Prädiktionsmodelle aufgrund der Ergebnisse der Prävalidierung in enger Kooperation zwischen den leitenden Laboratorien und dem Biostatistiker vorgesehen. Nach der Verbesserung der Testprotokolle (SOPs) und Prädiktionsmodelle sollen innerhalb von einem Jahr 20 Testsubstanzen unter blinden Bedingungen getestet werden. Für die Auswertung der Daten durch den Biostatistiker und die Erstellung des Abschlußberichtes stehen die verbleibenden 6 Monate zur Verfügung.

Literatur

Amacher, D. E., Stadler, J., Schomaker, S. J. and Verseil, C. (1996). The comparative testing of eight coded chemicals in the rat limb bud micromass and rat embryo culture systems. *ATLA 24,* 945-952.

Balls, M. and Karcher, W. (1995). The validation of alternative π=st methods. *ATLA 23,* 884-886.

Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H. and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations ECVAM workshop 5. *ATLA 23,* 129-147.

Bechter, R. and Schön, H. (1988). Use of the whole embryo culture system in drug safety assessment. *Toxic. in vitro 2,* 195-203.

Brown, N. A. and Fabro, S. (1981) Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology 24,* 65-78.

Brown, N. A., Spielmann, H., Bechter, R., Flint, O. P., Freeman, S. J., Jelinek, R. J., Koch, E., Nau, H., Newall, D. R., Palmer, A. K., Renault, J. Y., Repetto, M., Vogel, R. and Wigler, R. (1995). Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives. The report and recommendations of an ECVAM/ETS workshop (ECVAM workshop 12). *ATLA 23,* 868-882.

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 (the first report of the ECVAM Task Force on Prevalidation). *ATLA 23,* 211-217.

Flint, O. P. (1993). In vitro tests for teratogens: desirable endpoints, test batteries and current status of the micromass teratogen test. *Reprod.Toxicol. 7,* 103-111.

Flint, O. P. and Orton, T. C. (1984). An in vitro assay for teratogens with cultures of rat embryo midbrain and limb cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol. 76,* 383-395.

Holzhütter, H. G. and Quedenau, J. (1995). Mathematical modelling of cellular responses to external signals. *Journal of Biological Systems 3,* 127-138.

Kistler, A. (1987). Limb bud cell cultures for estimating the teratogenic potential of compounds: Validation of the test system with retinoids. *Archiv. Toxicol. 60,* 403-414.

Laschinski, G., Vogel, R. and Spielmann, H. (1991). Cytotoxity test using blastocyst-derived euploid embryonal stem cells: a new approach to in vitro teratogenesis screening. *Reproductive Toxicol. 5,* 57-64.

Piersma, A. H., Attenon, P., Bechter, R., Govers, M. J. A. P., Krafft, N., Schmid, B. P., Stadler, J., Verhoef, A. and Verseil, C. (1995). Interlaboratory evaluation of embryotoxicity in the postimplantation rat embryo culture. *Reprod. Toxic. 9,* 275-280.

Schwetz, B. A. and Harris, M. W. (1993). Developmental toxicology: status of the field and contribution of the National Toxicology Program. *Environmental Health Perspectives 100,* 269-282.

Smith, M. K., Kimmel, G. L., Kochhar, D. M., Shepard, T. H., Spielberg, S. P. and Wilson, J. G. (1983). A selection of candidate compounds for in vitro teratogenesis test validation. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 3,* 461-480.

Spielmann, H., Pohl, I., Döring, B., Liebsch, M. and Moldenhauer, F. (1997). The embryonic stem cell test (EST), an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. *In Vitro Toxicol. 10,* 119-127.

Uphill, P. F., Wilkins, S. and Allen, J. A. (1990). In vitro micromass teratogen test: results from a blind trial of 25 compounds. *Toxicol. In Vitro 4,* 623-626.

Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. and Gough, N. M. (1988). Myeloid leucemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature 336,* 684-687.

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

***Abkürzungen**

WEC: Whole Embryo Culture; MM: Micromass; EST: Embryonaler Stammzelltest; ES-Zellen: Embryonale Stammzellen; LIF: Leucemia Inhibitory Factor; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid; NRU: Neutral Red Uptake; AB: Alcian Blue; ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods; RIVM: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu; SOP: Standard Operating Procedure; ZEBET/BgVV, Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch