

- Beauchamp, T. L. and Childress, J. F. (1994). *Principles of Biomedical Ethics*, 560 pp. New York: Oxford University Press.
- Gordon, J. W. (1996). Transgenic technology and its impact on laboratory animal science. *Scand. J. Lab. Animal Sci.* 23, 235-249.
- Hubrecht, R. (1995). Genetically modified animals, welfare and UK legislation. *Animal Welfare* 4, 163-170.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M. and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427.
- Mephram, T. B., Moore, C. J. and Crilly, R. E. (1996). An ethical analysis of the use of xenografts in human transplant surgery. *Bulletin of Medical Ethics* 116, 13-18.
- Mephram, T. B., Combes, R. D., Balls, M., Barbieri, O., Blockhuis, H. J., Costa, P., Crilly, R. E., de Cock Buning, T., Delpire, V. C., O'Hare, M. J., Houdebine, L.-M., van Kreijl, C. F., van der Meer, M., Reinhardt, C. A., Wolf, E. and van Zeller, A.-M. (1998). The Use of Transgenic Animals in the European Union. The report and recommendations of ECVAM workshop 28. *ATLA* 26, 1-23.
- Poole, T. (1997). Transgenic animals: an alternative? Opponent's statement. In L. F. M. van Zutphen and M. Balls (ed.), *Developments in Animal and Veterinary Sciences, Vol. 27, Animal Alternatives, Welfare and Ethics* (267-272). Amsterdam: Elsevier.
- Rijkers, T., Peretz, A. and Ruther, U. (1994). Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Research* 3, 203-215.
- Rossant, J. and Nagy, A. (1995). Genome engineering: the new mouse genetics. *Nature Medicine* 365, 592.
- Russell, W. M. S. and Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co Ltd.
- Sandoe, P., Forsman, B. and Hansen, A. K. (1996). Transgenic animals: the need for ethical dialogue. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 23, 279-285.
- van der Meer, M. and van Zutphen, L. F. M. (1997). Use of transgenic animals and welfare implications. In L. F. M. van Zutphen and M. van der Meer (ed.), *Welfare Aspects of Transgenic Animals* (78-89). Berlin: Springer Verlag.
- Verhoog, H. (1996). Genetic modification of animals: should science and ethics be integrated? *The Monist* 79, 247-263.
- Wolf, E. (1997). Transgenic animals: an alternative? Proponent's statement. In L. F. M. van Zutphen and M. Balls (ed.), *Developments in Animal and Veterinary Sciences, Vol. 27, Animal Alternatives, Welfare and Ethics* (261-265). Amsterdam: Elsevier.

Korrespondenzadresse
ECVAM (TP 580) IRC Environment Institute I-21020 Ispra (VA)

Transgene Tiere im 3R-Konzept*

Franz P. Gruber
FFVFF, CH-Zürich

Zusammenfassung

Ob transgene Tiere zu den Alternativmethoden zu zählen sind oder nicht, wird kontrovers diskutiert. Es gibt positive Beispiele von transgenen Tieren, dank derer ein Versuch kürzer, weniger belastend und mit einer kleineren Zahl von Tieren durchgeführt werden kann. Bei anderen transgenen Stämmen erhöht sich dagegen die Tierzahl alleine durch die "Erzeugung" der Tiere. Auch stellt sich die Frage, ob transgene Tiere, wenn sie klinisch relevante Krankheitszeichen aufweisen, niedriger oder höher belastet sind als ihre nicht transgenen Vorgänger im Versuch. Inwieweit transgene Tiere in das Konzept der 3R passen, muß deshalb von Fall zu Fall entschieden werden.

Keywords: transgenic animals, 3R concept, suffering, animal numbers

Summary: There are positive examples of transgenic animals where transgenic technology has allowed the use of less animals to answer a specific research question. On the other hand, it requires large numbers of animals to produce transgenic strains. And there remains the question, when these animals show clinical signs of disease, if they suffer more or less than their "pretransgenic" counterparts. To what extent transgenic animals further the cause of the 3Rs must be evaluated on an individual basis.

1 Das 3R Konzept

Mit dem von Russell & Burch entwickelten Konzept haben sich Wissenschaft, Aufsichtsbehörden und Tierschutz auf eine Plattform des Konsenses geeinigt, die es erlaubt, anstehende Themen auf dem Gebiet der Tierversuche pragmatisch und emotionsfrei anzugehen. Niemand wird diffamiert, jeder kann seinen Teil beitragen, Tierversuche zu ersetzen, zu reduzieren oder in ihren Auswirkungen abzumildern.

Dieses bewährte Vorgehen hat in der Praxis Erfolge gezeigt. Es wäre jedoch falsch, das 3R-Konzept deshalb zu einem Dogma hochzustilisieren. Was mit der 3R-Brille gesehen Erfolg verspricht, kann von

einer anderen Warte aus gesehen unmoralisch sein. Denken Sie an medizinische Versuche, die in verschiedenen Staaten mit Kriegsgefangenen und KZ-Insassen gemacht wurden. Es besteht kein Zweifel, daß diese Versuche in das Konzept der 3R passen würden, trotzdem lehnen wir sie natürlich als unethisch kategorisch ab.

Wir sollen also im 3R-Konzept nicht das Maß aller Dinge sehen, dem sich jede andere Argumentationsweise zwangsläufig unterordnen müßte.

2 Die Empfehlungen von ECVAM

Über 30.000 transgene Tiere, überwiegend Mäuse, gibt es nach Schätzung von Ex-

perten, die sich 1997 zu einem von ECVAM, FRAME und der Universität von Nottingham organisierten Workshop in Southwell trafen. Diese auf diesem Workshop entstandenen ECVAM-Recommendations wurden in der Januar/Februar-Nummer von ATLA veröffentlicht (Mephram et al., 1998); die deutsche Kurzfassung finden Sie in diesem ALTEX-Heft (Delpire und Balls, 1998). Um ein unter allen Teilnehmern des Workshops konsensfähiges Papier erarbeiten zu können, mußten offensichtlich einige der ursprünglichen Forderungen fallengelassen werden. Es hieß in einem ersten Entwurf, daß zu folgenden Zwecken transgene Techniken nicht akzeptiert werden könnten:

- Induktion schwerer physiologischer Abnormalitäten
- signifikante Veränderungen des artspezifischen Verhaltens
- Steigerung der Wachstumsraten bei landwirtschaftlichen Nutztieren
- Herstellung transgener höherer Primaten

Von diesen Forderungen ist lediglich eine unverändert geblieben, daß nämlich die Herstellung transgener höherer Primaten als prinzipiell unannehmbar betrachtet werden sollte. Die Genehmigung transgener landwirtschaftlicher Nutztiere sollte dagegen nur „vorläufig“ erfolgen und bei den anderen Fällen muß die Einhaltung „des höchsten Tierschutzstandards“ gewährleistet sein.

3 Beispiele unterschiedlicher 3R-Relevanz transgener Tiere

Es sollte festgehalten werden, daß bei der Prüfung auf *Replace*-Relevanz der Ersatz einer Versuchstierart durch eine andere - transgene - Versuchstierart nicht als *Replace* im Sinne von Russell und Burch verstanden werden kann.

3.1 Transgene Mäuse statt Primaten, Polio- und Hepatitis B-Maus

Seit kurzem können in bestimmten Fällen Primaten bei der Prüfung von Polio-Impfstoffen durch polio-sensible transgene Mäuse ersetzt werden (Ren et al., 1990). Ähnlich gelagert ist der Ersatz von Primaten in der Hepatitis B-Forschung durch transgene Mäuse, die die gesamte Symptomatik der Hepatitis B-Infektion zeigen (Araki et al., 1989). Dies ist natürlich kein *Replace* im Sinne von Russell und Burch, auch werden die Tierzahlen nicht reduziert. Polio-Mäuse bzw. Hepatitis-Mäuse anstelle von Primaten hätten, wenn sich diese Tests durchsetzen, die Last der Infektionen zu tragen.

Trotzdem wird von manchen Wissenschaftlern, vor allem solchen, die aus ethischen und arten- bzw. tierschützerischen Überlegungen Versuche mit Primaten grundsätzlich ablehnen, in dieser Art der Impfstoffprüfung ein *Refinement* gesehen.

Es bleibt aber trotzdem ethisch unbefriedigend, den Ersatz einer Tierart durch eine andere auch als tierschutzrelevant einzuordnen. Dies vor allem, da für die Prüfung des Polio-Impfstoffes bald ein reiner *in vitro* Test verfügbar sein wird (Wood and Macadam, 1997).

3.2 Transgene Mäuse als Spender immortaler Zellkulturen, die Immorto-Maus

Gute 3R-Relevanz sollte dagegen einer in England generierten „Immorto-Maus“ zugestimmt werden (Jat et al., 1991). Bei dieser Maus handelt es sich um eine transgene Linie, bei der alle Zellen eine Eigenschaft tragen, wie sie sonst nur bei permanenten Zelllinien vorkommt: Die Zellen sind unsterblich. Diese Eigenschaft kommt jedoch nicht bei der normalen Körpertemperatur zum Tragen. Erst wenn aus solchen Mäusen Organe zum Anlegen von Zellkulturen gewonnen werden, kann durch Absenken der Brutschranktemperatur auf 33°C und gegebenenfalls durch Zugabe von spezifischen Zellbotengstoffen eine unlimitierte Teilung beobachtet werden. Wird die Bebrütungstemperatur wieder auf 37°C erhöht, nimmt die Zelle ihre ursprüngliche Eigenschaft der begrenzten Zellteilung an. Die so gewonnenen Zellkulturen haben nicht die Nachteile von *in vitro* transformierten Zellkulturen, die sehr oft kaum noch stoffwechselaktiv sind. Natürlich bleibt aber der Nachteil bestehen, daß nicht alle Zelleigenschaften mit denen des Menschen übereinstimmen. Ist erst einmal der größte Teil der Gewebe- und Organokulturen, die sich aus der Immorto-Maus anlegen lassen, existent, kann die Züchtung der Immorto-Maus auf ein Minimum reduziert und eventuell völlig eingestellt werden. Einige Immorto-Embryonen sollten dann jedoch zur Sicherheit kryokonserviert werden.

3.3 Transgene Tiere in der Toxikologie, Mutagenese und Karzinogenese

Andere Beispiele, denen auf dem oben erwähnten Workshop bedingte 3R-Relevanz zuerkannt wurden, kamen aus dem Bereich der Toxikologie, Mutagenese und Karzinogenese (Gossen und Vijg, 1993; Morrison und Ashby, 1994; Übersicht bei Løvik, 1997). Dies sind überwiegend *Reduce* Effekte. Durch den Einsatz bestimmter transgener Linien konnten die Tierzahlen bei manchen Toxizitätstests auf 20% reduziert werden. Durch den oft zu einem früheren Stadium der Belastung möglichen Abbruch ist in diesen Fällen auch ein *Refinement* zu erkennen.

Vom Standpunkt des Tierschutzes aus können solche Tiere jedoch höchstens als Übergangslösung akzeptiert werden. Anzu-

streben bleibt auf jeden Fall die auch behördlicherseits anerkannte versuchstierfreie Prüfung zuallererst im akuten Toxizitätstest.

3.4 Transgene Tiere in der immunologischen Grundlagenforschung

In der Schweiz wird in der experimentellen Immunologie die „Perforin-Maus“ als 3R-relevant eingestuft (Kägi et al., 1994). Diese Maus weist eine gentechnische Veränderung auf, die es ihr unmöglich macht, bestimmte Viren zu bekämpfen. Solange die Tiere frei von solchen Viren gehalten werden, sind sie in keiner Weise belastet. Früher wurden solche Tiere durch experimentelle Läsionen mit hoher Belastung „erzeugt“. Kritisch bei all den transgenen Linien, die als Fortschritt der Forschung beschrieben werden, muß in jedem Fall aber auch die Prüfung auf ein „viertes“ R erfolgen, inwieweit diese Eigenschaften nämlich relevant für bestimmte Krankheitssymptome des Menschen oder für den Wissensgewinn in der Grundlagenforschung sind.

3.5 Die „Alzheimer-Maus“ klinisch relevant?

Kritisch sind in diesem Zusammenhang verschiedene Alzheimer-Modelle zu sehen, die man mit Hilfe transgener Techniken aufzubauen versucht. Für das Studium dieser neurodegenerativen Erkrankung wurden bisher ausschließlich Primaten oder auch Ratten mit künstlich erzeugten Hirnläsionen als Versuchstiere verwendet. Durch die Einführung eines humanen *amyloid protein precursor* Gens (APP) in Mäuse erhofft man sich, das Studium dieser in unserer zunehmend älteren Population so wichtigen Erkrankung anstatt an Primaten an Mäusen erforschen zu können (Games et al. 1995). Da jedoch nur ein Teil der Alzheimer-Patienten aufgrund einer mutierten Form des APP erkrankt, muß die Frage gestellt werden, ob dieses Modell für alle Alzheimer-Erkrankungen klinisch relevant ist. Es gibt Alzheimer Formen, die mit einem bestimmten ApoE-Gen assoziiert sind, sowie eine Reihe von Spätformen der Krankheit, die sich ohne Mutation des APP entwickeln. Nach den oben erwähnten ECVAM-Empfehlungen sollten solche Modelle in Entstehung und Symptomatik der menschlichen Situation so ähnlich wie möglich sein. Für die Entstehung dürfte dies wohl bei den nicht genetisch disponierten Alzheimer-Patienten

ten nicht zutreffen. Auch wenn solche transgenen Mäuse wesentliche Symptome der Erkrankung zeigen, können sie doch nur für einen Teil der Patienten die Frage nach der Entstehung der Erkrankung beantworten. Dies führt wiederum zu der Ermessensfrage, ob der Teilerfolg das Modell rechtfertigen kann. Die Arbeit mit solchen Tieren darf auf jeden Fall nicht dazu führen, daß die Erforschung möglicher anderer Ursachen für die Alzheimer-Erkrankung vernachlässigt wird. Liegen nicht epidemiologische Anhaltspunkte für die Aluminiumbelastung als möglicher Ursache vor? Werden diese Untersuchungen nicht fortgesetzt?

Da die Belastung der APP-Mäuse offenbar sehr niedrig liegt und das Modell zumindest für einen Teil der Alzheimer-Patienten relevant sein kann, wird eine Ethik-Kommission hier wohl die Erzeugung dieser Maus befürworten müssen.

4 Konsequenzen

Die klinische Relevanz transgener Versuchstiere sollte bei der Genehmigung solcher Tiermodelle neben ihrer Tierschutzrelevanz eine zentrale Rolle spielen. Es genügt keinesfalls, sie nur zu behaupten oder zu wünschen. Einige Länder, wie die USA, scheinen keinerlei Genehmigungsverfahren für die Generierung transgener Mäuselinien zu kennen. Es ist zu befürchten, daß aus solchen Ländern auch übertriebene Meldungen über die Nützlichkeit verschiedener transgener Mäusestämme kommen, da ausschließlich Interesse an ihrer wirtschaftlichen Verwertung besteht.

Sollte es in der Schweiz 1998 nicht zu einem totalen Verbot des Generierens (und Verwendens) transgener Tiere kommen, ist diesem Aspekt bei den dann sicherlich nötigen Genehmigungsverfahren besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Eventuell sollte eine Kommission zur Beurteilung solcher Fragen installiert werden - obwohl die Anzahl von Kommissionen im biomedizinischen Bereich allmählich forschungshemmende Dimensionen annimmt.

Bei der Prüfung einer möglichen Reduktion der Tierzahlen dürfen auf keinen Fall weder die Tiere vergessen werden, die zur Entstehung von transgenen Linien verwendet werden, noch diejenigen, die als weitere Überschüßtiere die Tierzahlen in die Höhe treiben können.

Auch wenn bei manchen transgenen Tieren also eine 3R-Relevanz gegeben zu sein scheint, müssen doch auch noch grundsätzliche ethische Überlegungen, ob Tiere zum Nutzen des Menschen in dieser Weise manipuliert werden dürfen, diskutiert werden. Dies muß für jeden Einzelfall geschehen. Die allgemeine Behauptung, daß transgene Tiere „wichtige Werkzeuge“ für das *Refinement* seien (Wolf, 1997), kann nicht nachvollzogen werden. Ob für die Diskussion des Einzelfalls die Kriterien, wie sie von Müller (1995) aufgestellt wurden, ausreichend sind, muß dahingestellt bleiben. Müller spricht folgende Punkte an: Konsensorientierung, Tierschutz, ästhetische Gesichtspunkte und Vertrautheit. Es ist zu befürchten, daß mit diesen Kriterien letztlich keinerlei Einschränkung des Forscherdrangs durch ethische Überlegungen stattfindet. Das einzig Positive, das sich momentan bei der Diskussion um mögliche und nötige Einschränkungen bei der „Schöpfung“ neuer Tiere ergibt, ist die Tatsache, daß zumindest in Europa die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler dieser Diskussion nicht ausweichen.

Die Verpflichtung, weiterhin so intensiv wie möglich nach tierversuchsfreien Methoden zu forschen und diese verbindlich einzuführen, muß jedenfalls drängen, denn je die einzige ethisch einwandfreie Antwort der Wissenschaft auf die Problematik des Tierversuchs bleiben, ob dieser nun mit oder ohne transgene Tiere durchgeführt wird.

Literatur

- Araki, K., Miyazaki, H.-I., Hino, O., Tomita, N., Chisaka, O., Matsubara, K. and Yamamura, K.-I. (1989). Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 207-211.
- Delpire, V. und Balls, M. (1998). ECVAM Workshop über die Verwendung transgener Tiere in der EU: Ein Überblick. *ALTEX* 15,
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian, S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., McConlogue, L., Montoya-Zavala, M., Mucke, L., Paganini, I., Penniman, E., Power, M., Schenk, D., Seubert, P., Snyder, B., Fertie, S., Tan, H., Vitale, J., Wadsworth, S., Wolozin, B. and Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- Gossen, J. and Vijg, J. (1993). Transgenic mice as model systems for studying gene mutations in vivo. *Trends Genet.* 9, 27-31.
- Jat, P. S., Noble, M. D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L. and Kioussis, D. (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5096-5100.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-37.
- Løvic, M. (1997). Mutant and transgenic mice in immunotoxicology: an introduction. *Toxicology* 119, 65-76.
- Mephum, T. B., Combes, R. D., Balls, M., Barbieri, O., Blokhuis, H. J., Costa, P., Crilly, R. E., de Cock Buning, T., Delpire, V. C., O'Hare, M. J., Houdebine, L.-M., van Kreijl, C. F., van der Meer, M., Reinhardt, C. A., Wolf, E. and van Zeller, A.-M. (1998). The use of transgenic animals in the European Union. *ATLA* 26, 21-43.
- Morrison, V. and Ashby, J. (1994). A preliminary evaluation of the performance of the Muta Mouse (lacZ) and Big Blue (lacI) transgenic mouse mutation assays. *Mutagenesis* 9, 367-375.
- Müller, A. (1995). Übertreten verboten? Überlegungen zur moralischen Relevanz von Artgrenzen angesichts der Möglichkeit des artübergreifenden Gentransfers. *Tierlaboratorium* 18, 34-43.
- Ren, R., Costantini, F., Gorgacz, E. J., Lee, J. J. and Racaniello, V. R. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 63, 353-362.
- Wolf, E. (1997). Transgenic animals: an alternative? Proponenets statement. In L. F. M. van Zutphen and M. Balls (eds.), *Animal Alternatives, Welfare and Ethics* (271-275). Amsterdam: Elsevier.
- Wood, D. J. and Macadam, A. J. (1997). Laboratory tests for live attenuated poliovirus vaccines. *Biologicals* 25, 3-15.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Franz P. Gruber
Hegarstr. 9
CH- 8032 Zürich
Tel.: +41-1-3800830
Fax: +41-1-4228010
E-mail: altex@bluewin.ch

* Dieser Beitrag basiert im wesentlichen auf einem Vortrag, der am 27.8.1997 anlässlich des 10jährigen Bestehens der Stiftung Forschung 3R in Bern gehalten wurde.