

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)

Willi Halle, Manfred Liebsch, Dieter Traue und Horst Spielmann

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

Zusammenfassung

Es wird ein neues Verfahren vorgestellt, mit dem dank Zytotoxizitätsdaten von *in vitro* kultivierten Säuger-Zelllinien die Zahl der Versuchstiere reduziert werden kann, die zur Einstufung von Stoffen in die vier EU-Toxizitätsklassen gemäß ihrer akuten oralen Giftigkeit erforderlich sind. Dafür steht das „Erweiterte Register der Zytotoxizität“ (RC) zur Verfügung, in dem von 347 Stoffen die mittlere IC_{50} (IC_{50x}) und die LD_{50} p.o. Ratte/Maus erfasst sind. Mit den Literaturdaten des RC haben wir eine Standardregressionsgerade berechnet, deren Parameter zur Schätzung eines Vorhersage-Dosisbereiches der LD_{50} p.o. verwendet werden. Die definierten minimalen, mittleren und maximalen Vorhersagedosen der oralen Giftigkeit bilden die Grundlage für die Einstufung der Stoffe in die vier EU-Toxizitätsklassen (TKn) für die akute orale Toxizität. Die Treffsicherheit der Einstufung mit Hilfe der RC-Daten beträgt 81 % bis 88 %. Es wird eine Teststrategie zur Einstufung eines Stoffes in eine TK mit Hilfe des neuen Verfahrens beschrieben, bei dem im ersten Schritt die Zytotoxizitätsdaten verwendet und erst in einem zweiten Schritt weniger Versuchstiere eingesetzt werden, um die vorhergesagte TK zu bestätigen. Im Vergleich zur Prüfung der Stoffe im Tierversuch mit der ATC Methode, für die durchschnittlich 9,11 Versuchstiere für die sichere Einstufung eines Stoffes in eine TK erforderlich sind, ist mit dem neuen kombinierten RC-ATC-Verfahren mit einer Einsparung von rund 30 % der Versuchstiere zu rechnen. Das Verfahren sollte mit dem Ziel der Aufnahme in internationale behördliche Richtlinien validiert werden.

Keywords: acute toxicity, LD_{50} , *in vitro/in vivo* correlation, prediction model, cytotoxicity, ATC-method, reduction of animal numbers

Summary: Reduction of the number of animals used for the classification of the acute oral toxicity of chemicals by taking into account cytotoxicity data from the Registry of Cytotoxicity (RC).

*Using cytotoxicity data a new classification procedure is introduced which will allow to allocate chemicals to the four toxicity classes for acute oral toxicity according to EU regulation. Simultaneously, the new procedure allows to reduce animals in experiments for determination these four toxicity classes. The cytotoxicity data estimated from *in vitro* cultivated mammalian cell lines were taken from the „Registry of Cytotoxicity“ (RC) in which the mean IC_{50} (IC_{50x}) of 347 chemicals are stored as well as the acute oral toxicity data (LD_{50}) for rats and mice taken from NIOSH registry. As we have previously reported these literature data of the RC have been used to calculate a standard regression line for predicting the dosage range of acute oral toxicity in the two species. The maximum, mean and minimum dosages of oral toxicity were predicted from the RC data and furthermore, these dosages were the basis for allocating chemicals into the four classes of acute oral toxicity defined by the EU. The accuracy for predicting the toxicity classes of the 347 chemicals registered in the RC in comparison to the toxicity classes of the corresponding NIOSH LD_{50} values amounts 81 per cent to 88 per cent. We have developed a tier testing strategy for the classification of chemicals into EU toxicity classes which takes into account the cytotoxicity data as predicted mean LD_{50} in connection with the protocol steps described in Acute Toxic Class (ATC) method. Compared with the ATC method the new combined RC-ATC procedure will allow to reduce animal numbers for allocating chemicals to the EU toxicity classes by about 30 per cent. We suggest to validate the RC-ATC procedure in order to achieve regulatory acceptance at the international level.*

1 Einleitung

Das erweiterte Register der Zytotoxizität (RC) enthält von 347 unterschiedlichen (non-selected) Chemikalien und Arzneimitteln Zytotoxizitätsdaten von in vitro kultivierten Säuger-Zelllinien in Form der mittleren IC_{50} (Halle und Spielmann, 1994). Zusätzlich sind im RC die akuten oralen LD_{50} -Werte von Ratte/Maus aus dem Toxizitätsregister „Registry of toxic effects of chemical substances“ (RTECS) des amerikanischen Instituts für Arbeitsschutz – NIOSH (National Institute of Occupation, Safety and Health) – des Jahres 1984 (Tatken und Lewis, 1984) registriert. Mit diesen Daten läßt sich mit dem einfachen linearen Regressionsmodell eine Standardregressionsgerade für die Beziehung zwischen der Zytotoxizität und der akuten oralen Toxizität berechnen. Nach der Entwicklung des Verfahrens mit erstmaliger Anwendung des linearen Regressionsmodells für Untersuchungen der Beziehung zwischen Toxizitätsdaten in vitro und in vivo (Halle, 1985) wurde die Grundlage für den Nachweis der allgemeingültigen Bedeutung dieser Standardgeraden für die Vorhersage der akuten oralen Toxizität (LD_{50}) durch Zytotoxizitätsdaten aus sechs Literaturarbeiten geschaffen (Halle et al., 1987). Nachfolgende Untersuchungen zur Beziehung zwischen der Zytotoxizität – in vitro – und der oralen Toxizität – in vivo – bestätigten den früheren Befund (Halle, 1993 und 1995; Halle und Spielmann, 1992a, b, 1994) und bildeten die Grundlage für das hier vorgestellte neue Verfahren.

In der vorliegenden Arbeit wird geprüft, ob mit den im RC erfaßten Daten auch eine sichere Einstufung von Chemikalien in die behördlich in der Gefahrstoff-Verordnung festgelegten Toxizitätsklassen (TKn) zur Beurteilung der akuten oralen Toxizität von Industriechemikalien möglich ist. Unseren vergleichenden Untersuchungen legen wir zwei von Schleder et al. (1992 und 1995) für Tierversuche mit der „Acute Toxic Class Method“ verwendeten Klassifikationssysteme und eine definierte Rangordnung der Toxizitätsstärke von Stoffen von Purchase et al. (1987) zugrunde. Drei Schwerpunkte werden behandelt: (1) Darstellung der Möglichkeit, aus den Zytotoxizitätsdaten des RC einen Stoff in eine Toxizitätsklasse (TK) einzustufen, (2) Hinweise für eine praktische Nutzung

des Verfahrens mit Abschätzung der Einsparung von Versuchstieren unter Zugrundelegung der ATC-Methode, (3) Hinweise für die Bestimmung eines zytotoxischen Endpunktes (IC_{50}) im Zellzuchtlabor.

2 Das Register der Zytotoxizität

Von den im RC registrierten 347 Stoffen (Chemikalien und Arzneimittel) wird die IC_{50} als geometrisches Mittel von zwei oder mehr IC_{50} -Einzelwerten pro Substanz mit der akuten oralen LD_{50} für Ratte/ Maus mit dem einfachen linearen Regressionsmodell in Beziehung gesetzt.

Für die 347 Wertepaare IC_{50x} - LD_{50} p.o. läßt sich eine Standardregressionsgerade nach $\log LD_{50} = a + b \cdot \log IC_{50x}$ mit den Parametern $a = 0,625$ und $b = 0,435$ berechnen (Halle und Spielmann, 1997).

Einzelheiten über die Einbeziehung von aus der Literatur recherchierten Zytotoxizitätsdaten von Säuger-Zelllinien zur Berechnung einer IC_{50x} finden sich bei Halle und Spielmann (1992a). In das RC werden nur Stoffe mit zwei oder mehr IC_{50} -Werten pro Stoff aufgenommen. Die IC_{50} -Werte stammen von unterschiedlichen zytotoxischen Endpunkten und unterschiedlichen Zelllinien. Auch die Anzahl

der IC_{50} -Werte pro Stoff schwankt von 2 bis 32. Trotz dieser Heterogenität der einzelnen IC_{50} -Werte konnte eine gute Reproduzierbarkeit der ursprünglichen Werte der Regressionsparameter nachgewiesen werden, sowohl nach Erhöhung der Zahl der Stoffe von 102 (Halle und Spielmann, 1992a) auf 347 (Halle und Spielmann, 1994) als auch nach Aufnahme weiterer IC_{50} -Werte von bereits im RC registrierten Stoffen (Halle, 1995; Halle und Spielmann, 1997).

Aus der Graphik in Abbildung 1 ist die Verteilung der 347 Wertepaare IC_{50x} - LD_{50} p.o. Ratte/Maus im doppellogarithmischen Koordinatensystem dargestellt. 252 Substanzen (72,6 %) liegen in einem Dosisbereich um die Regressionsgerade, der in Abbildung 1 markiert und durch den empirisch gewählten Faktor $F_G \leq \log 5$ definiert ist. Durch diesen definierten LD_{50} -Dosisbereich lassen sich eine minimale, mittlere und maximale Vorhersagedosis berechnen, die sich jeweils um den Faktor fünf unterscheiden. Die außerhalb dieses Bereiches liegenden 95 Substanzen weichen als falsch positive und falsch negative Wertepaare um mehr als das fünffache von den geschätzten LD_{50} -Werten (\hat{y}) auf der Geraden ab.

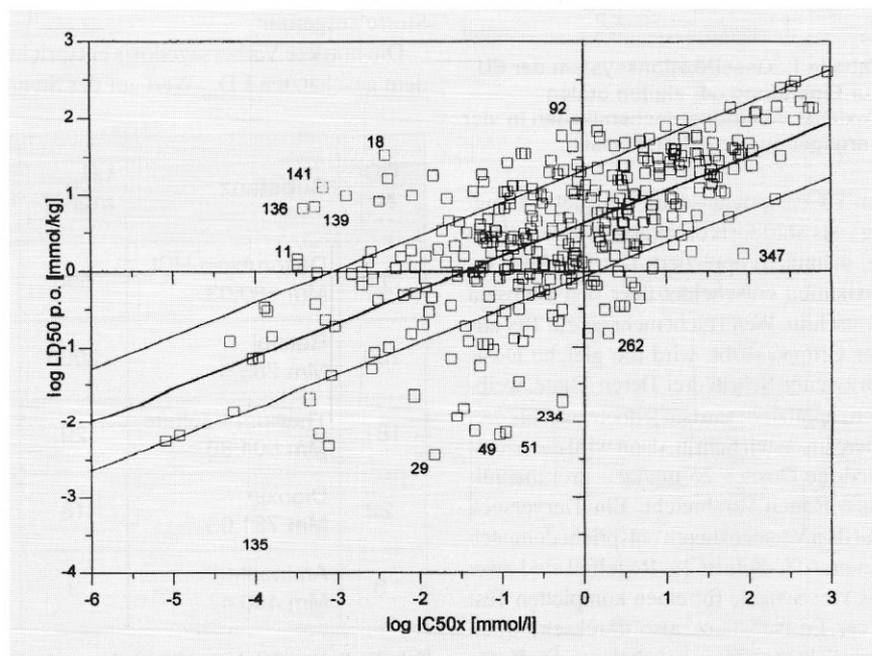


Abbildung 1: Standardregressionsgerade für die Wertepaare IC_{50x} (in mmol/l) und LD_{50} p.o. Ratte/Maus (in mmol/kg Körpergewicht) für 347 Stoffe aus dem „Erweiterten Register der Zytotoxizität“ (RC). Der Faktor $F_G \leq \log 5$ definiert einen markierten Bereich um die Regressionsgerade, der um $\pm 0,699$ von den geschätzten LD_{50} -Werten auf der Geraden (\hat{y}) abweicht und damit die mittlere (\hat{y}), maximale und minimale Vorhersagedosis definiert. (In Anlehnung an W. Halle und H. Spielmann, *ALTEX 11*, 148-153, 1994.)

3 Die „Acute Toxic Classic Method“ (ATC-Methode)

Für die akute orale Toxizitätsprüfung von Industriechemikalien nach dem Chemikaliengesetz ist von Schlede et al. (1992) die ATC-Methode entwickelt worden. Sie ist international validiert und wird seit 1996 von der OECD als Ersatzmethode an Stelle der klassischen Bestimmung der akuten oralen LD_{50} akzeptiert (OECD Guideline 423, adopted 22.03.96).

Der ATC-Methode liegt das Klassifikationssystem der EU zur Einstufung der akuten oralen Toxizität von Industriechemikalien in vier vorgegebene Toxizitätsklassen (TKn) zugrunde, das in der deutschen Gefahrstoff-Verordnung gesetzlich umgesetzt wurde (Tabelle 1).

Bei der ATC-Methode handelt es sich um ein sequentielles Prüfverfahren mit feststehenden Prüfdosen: Im ersten Schritt wird eine Dosis, die einer willkürlich ausgewähl-

TK	Toxizitätsbereich mg/kg Körpergewicht (KG)
0	> 2000
1	> 200 bis ≤ 2000
2	> 25 bis ≤ 200
3	≤ 25

Tabelle 1: Klassifikationssystem der EU zur Einstufung der akuten oralen Toxizität von Industriechemikalien in vier vorgegebene Toxizitätsklassen.

ten TK entspricht – zum Beispiel 200 mg/kg – als Startdosis drei Versuchstieren (Ratte, männlich) appliziert. Der Grad der Intoxikation entscheidet über den nächsten Testschritt. Wenn nicht mehr als ein Tier aus der Gruppe stirbt, wird die gleiche Dosis im zweiten Schritt drei Tieren (Ratte, weiblich) appliziert; sterben jedoch zwei bis drei Tiere im ersten Schritt, dann wird die nächst niedrige Dosis – 25 mg/kg – drei männlichen Ratten verabreicht. Ein Tierversuch mit drei Versuchstieren entspricht demnach einem ATC-Schritt. Im Regelfall sind zwei bis vier Schritte für einen kompletten Test einer Prüfsubstanz, also durchschnittlich drei Schritte (Tierversuche) pro Stoff, für eine Einstufung notwendig (Schlede et al., 1995).

Die Übereinstimmung der Einstufung in eine TK dieses Klassifikationssystems nach der ATC-Methode mit Einstufungen

von LD_{50} -Werten, die nach dem klassischen Verfahren bestimmt wurden, beträgt 86 % (Schlede et al., 1992). Die Zahl der Versuchstiere pro Prüfsubstanz ließ sich um durchschnittlich 70 % reduzieren, nämlich von 30 Tieren bei Anwendung der klassischen LD_{50} -Bestimmung auf durchschnittlich 9,11 Tiere bei Anwendung der ATC-Methode (Tabelle 3 in Schlede et al., 1995).

4 Einstufung der RC-Substanzen in Toxizitätsklassen

4.1 Voraussetzungen für die Einstufung in Toxizitätsklassen

Für die Beurteilung der Sicherheit der Einstufung der im RC erfaßten Stoffe in festgelegte TKn wird ein Vergleich der RC-Daten mit der Einstufung nach der ATC-Methode von Schlede et al. (1992) durchgeführt.

Der Vergleich beruht auf der Beibehaltung der Parameter der linearen Regression für die 347 Wertepaare IC_{50x} - LD_{50} p.o. Ratte/Maus mit $a = 0,625$ und $b = 0,435$ und des Dosisbereiches der Vorhersage einer LD_{50} p.o., mit einer minimalen, mittleren und maximalen LD_{50} -Vorhersagedosis. Entsprechend Abbildung 1 sind in der Tabelle 2 diese Vorhersagedosen für fünf Stoffe aufgeführt.

Die mittlere Vorhersagedosis entspricht dem geschätzten LD_{50} -Wert auf der Stan-

dardregressionsgeraden. Berechnet wird die mittlere Vorhersagedosis aus der IC_{50x} eines Stoffes. Dazu wird zuerst aus der IC_{50x} der der Standardregressionsgeraden zugeordnete molare LD_{50} -Wert als \hat{y} nach $\log LD_{50} = 0,625 + 0,435 \times \log IC_{50x}$ geschätzt; anschließend erfolgt die Umrechnung der geschätzten molaren LD_{50} in mg/kg KG. Mit dieser Berechnung steht die mittlere Vorhersagedosis fest. Dann werden die sich daraus ergebenden minimalen und maximalen Vorhersagedosen einer LD_{50} p.o. entsprechend $F_G \leq \log 5$ bestimmt. Für Aminopterin umfaßt der Vorhersage-Dosisbereich die minimale, mittlere und maximale Vorhersagedosis mit 2,7, 13,5 und 67 mg/kg KG (Tabelle 2, RC-Nr. 3). Im nächsten Schritt wird die Einstufung einer Substanz in eine TK auf dieser Berechnungsgrundlage mit der Einstufung der entsprechenden LD_{50} aus dem NIOSH-Register verglichen.

4.2 Einstufung in eine Toxizitätsklasse (Abbildung 2)

Die Einstufung eines Stoffes in eine TK auf der Grundlage der drei nach Abschnitt 4.1 berechneten Vorhersagedosen beruht auf simulierten Tierversuchen, also auf der Annahme einer vereinfachten Teststrategie mit Ratten als Versuchstiere nach der ATC-Methode von Schlede et al. (1992). Die Letalität dient dabei als Marker. Wie Abbildung 2 veranschaulicht, wird in je-

RC-Nr	Substanz	LD_{50} mg/kg	NIOSH-TK	IC_{50x} mM	LD_{50} -Vorhersage-Dosisbereich mg/kg	TK
11	Doxorubicin HCl Mm 580,03	698	1	0,00033	15-75-375	1 - 2
139	Retinol Mm 286,5	2000	1	0,00054	9-46-230	1 - 2
181	Thallium-I-sulfate Mm 504,80	29	2	0,054	120-600-3000	1 - 2
22	Digoxin Mm 781,05	18	3	0,0085	83-414-2070	1 - 2
3	Aminopterin Mm 440,47	3	3	0,000012	2,7-13,5-67	3

Tabelle 2: Vergleich der Einstufung einer NIOSH- LD_{50} in eine EU-Toxizitätsklasse (TK) für akute orale Toxizität mit der Einstufung aus dem Vorhersage-Dosisbereich. Mit fünf Substanzen wird beispielhaft die Einstufung in eine TK veranschaulicht. Vier Stoffe als falsch positive (RC-Nr. 11, 139) und falsch negative Wertepaare (RC-Nr. 22, 181) liegen außerhalb des F_G -Bereiches der Abbildung 1. In Spalte 6 beziehen sich die jeweils drei Zahlenwerte für einen Stoff auf die minimale, mittlere und maximale Vorhersagedosis. Die Stoffe mit der RC-Nr. 11 und 139 sind in der Abb. 1 markiert.

dem Falle zuerst die mittlere Vorhersagedosis getestet. Das Ergebnis dieses ersten Tierversuches entscheidet über die nächsten Testschritte. Bleiben die Tiere ohne Schädigungen, wird die maximale Vorhersagedosis in einem zweiten Tierversuch appliziert.

Zeigen die Tiere des ersten Versuches jedoch toxische Reaktionen, dann wird entweder auf die Applikation der minimalen Vorhersagedosis verzichtet, oder diese Dosis wird einer zweiten Gruppe von Versuchstieren verabreicht. Die meisten Stoffe lassen sich nach dieser Teststrategie in Abbildung 2 bereits nach dem zweiten Tierversuch sicher einer TK zuordnen, und die NIOSH-LD₅₀ wird annähernd erreicht. Auf einen geringen Prozentsatz an Ausnahmen wird im jeweiligen Abschnitt eingegangen.

4.3 Beispiele

Beispielhaft für jeweils einen Teil der im RC registrierten 347 Chemikalien und Arzneimittel als Wertepaare IC_{50x} - LD₅₀ p.o. Ratte/Maus soll die Teststrategie mit drei Substanzen in der Tabelle 2 erläutert werden (RC-Nr. 3, 11 und 22):

1. Aminopterin: Der Test von Aminopterin (RC-Nr. 3) beginnt wie jeder Test mit der mittleren Vorhersagedosis 13,5 mg/kg. Verglichen mit der NIOSH-LD₅₀ 3 mg/kg tötet diese Dosis alle Tiere; die TK der mittleren Vorhersagedosis als TK 3 ist identisch mit der TK der NIOSH-LD₅₀. Zur Feststellung dieses Befundes müßte also nur die mittlere Vorhersagedosis in einem Tierversuch getestet werden.

2. Doxorubicin: Der Test von Doxorubicin (RC-Nr. 11) beginnt wieder mit der mittleren Vorhersagedosis 75 mg/kg (1. Tierversuch). Diese Dosis schädigt die Tiere nicht, und erst mit der maximalen Vorhersagedosis 375 mg/kg (2. Tierversuch) wird die TK der NIOSH-LD₅₀ erreicht. Zwischen der TK der NIOSH-LD₅₀ und der TK der mittleren Vorhersagedosis besteht nur eine Differenz von einer TK (RC-Nr. 11).

Mit 3. Digoxin wird gezeigt, daß zur Erreichung der TK der NIOSH-LD₅₀ nicht nur zwei Vorhersagedosen, sondern eine dritte Dosis – also ein dritter Tierversuch – notwendig sind. Wieder beispielhaft, allerdings nur für eine geringe Anzahl der 347 Stoffe mit oralen LD₅₀-Werten, haben wir *Digoxin* (RC-Nr. 22) ausgewählt. Bei der mittleren (414 mg/kg) und minimalen

Dosis (83 mg/kg) sterben alle Tiere. Erst mit einer dritten Dosis, die der TK 3 (≤ 25 mg/kg) entspricht, wird in einem dritten Tierversuch die TK der NIOSH-LD₅₀ erreicht. Zwischen der TK der NIOSH-LD₅₀ und der TK der mittleren Vorhersagedosis besteht eine Differenz von zwei TKn.

identisch mit der TK der NIOSH-LD₅₀. Eine Einstufung dieser 184 Stoffe wäre demnach mit nur einem Tierversuch pro Substanz möglich. Für 144 Substanzen (41,5 %) müßten zwei Vorhersagedosen mit zwei Tierversuchen pro Substanz getestet werden, um den TKn-Bereich zu

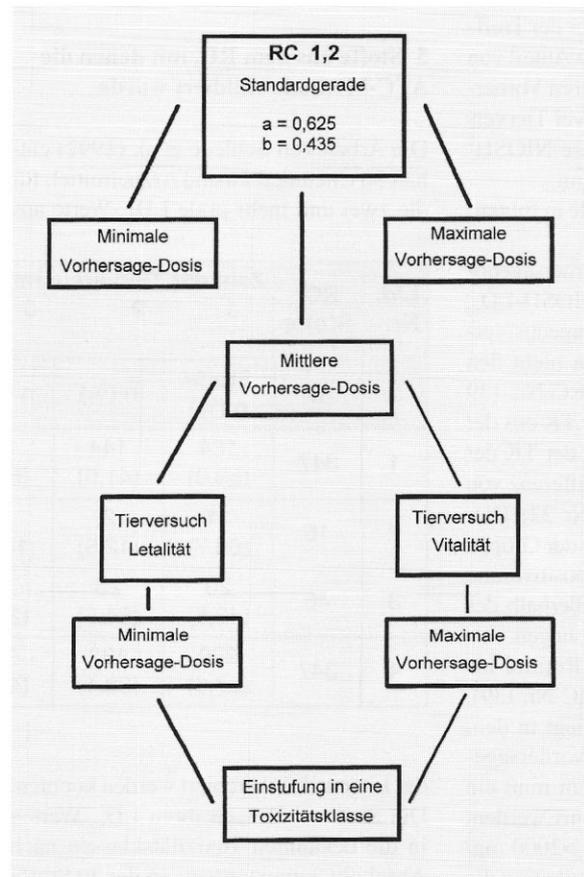


Abbildung 2: Teststrategie zur Bestimmung der EU-Toxizitätsklassen für akute orale Toxizität. Kombination von Zytotoxizitätstest und Tierversuch. Schematische Darstellung einer Möglichkeit, mit den Daten zur Zytotoxizität (IC_{50x}) aus dem RC 347 Xenobiotika in Toxizitätsklassen für die akute orale Toxizität einzuordnen. Als theoretische Grundlage des Verfahrens gilt die Annahme, daß aus Tierversuchen Informationen über die einzelnen Testschritte gewonnen werden können. (In Anlehnung an W. Halle und H. Spielmann, 1997.)

Wir können mit diesen drei Beispielen belegen, daß die Zahl der getesteten Dosen zur Erreichung der TK der NIOSH-LD₅₀ identisch ist mit der Zahl der Tierversuche, die für die richtige Einstufung in eine TK notwendig ist. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen handelt es sich um einen Vergleich eines Alternativverfahrens zum Tierversuch mit der ATC-Methode, und es geht um eine Aussage über die Möglichkeit, mit diesem Verfahren Tierversuche für die ATC-Methode einzusparen. Folglich steht nicht die Zahl der getesteten Dosen zur Erreichung der TK der NIOSH-LD₅₀, sondern die dafür notwendige Zahl von Versuchstieren im Vordergrund des Interesses.

Ergebnis: Für 184 der 347 RC-Stoffe (53 %) ist die TK, die sich allein aus der mittleren Vorhersagedosis bestimmen läßt,

erreichen, der die TK der NIOSH-LD₅₀ einschließt. In 94,5 % der Fälle ist demnach eine sichere und mit der TK der NIOSH-LD₅₀ vergleichbare Einstufung in einen TKn-Bereich aus der IC_{50x} heraus möglich. Ein solch gutes Resultat war a priori nicht zu erwarten. Nur für 19 Stoffe (5,5 %) müßte eine dritte Dosis – also ein dritter Tierversuch – zur Erreichung der TK der NIOSH-LD₅₀ angesetzt werden. Die Zahl von 19 Stoffen muß allerdings dann korrigiert werden, wenn die Treffsicherheit einer Einstufung in eine TK berücksichtigt werden soll. Die Treffsicherheit wird im folgenden Abschnitt definiert.

4.4 Treffsicherheit einer Einstufung in eine TK

Eine Unsicherheit bei der Risikoabschätzung eines Stoffes kann dann auftreten,

wenn eine nach der herkömmlichen Methode bestimmte LD_{50} (NIOSH) an der unteren Grenze einer TK liegt und die aus der Vorhersagedosis bestimmte Toxizitätsstärke der oberen Grenze der gleichen TK zugeordnet werden muß.

In diesem Falle ist die Treffsicherheit einer Einstufung in eine TK zu berücksichtigen. Wir definieren den Faktor der Treffsicherheit als den prozentualen Anteil von Stoffen, für die von der mittleren Vorhersagedosis aus mit maximal zwei Tierversuchen pro Stoff der ungefähre NIOSH- LD_{50} -Wert erreicht werden kann.

Ein dritter Tierversuch würde in folgenden Fällen erforderlich sein:

Der TK-Bereich aus der Vorhersagedosis stimmt mit der TK der NIOSH- LD_{50} überein, aber die LD_{50} -Vorhersagedosis erreicht im zweiten Tierversuch nicht den NIOSH- LD_{50} -Wert (Tab. 2, RC-Nr. 139 und RC-Nr. 181). Zwischen der TK aus der mittleren Vorhersagedosis und der TK der NIOSH- LD_{50} stellt sich eine Differenz von zwei TKn heraus (Tab. 2, RC-Nr. 22). Diese beiden Fälle kommen nur in der Gruppe der Stoffe vor, die als falsch positive und falsch negative Wertepaare außerhalb des F_G -Bereiches der Abbildung 1 liegen.

Für den ersten Fall dient Retinol als extremes Beispiel (Tabelle 2, RC-Nr. 139):

Die TK der NIOSH- LD_{50} liegt in dem TK-Bereich, der sich aus der Vorhersagedosis bestimmen läßt, trotzdem muß ein dritter Tierversuch durchgeführt werden, um mit einer Dosis der TK 0, >2000 mg/kg, mit dem Merkmal der Intoxikation die Substanz sicher einstuft zu können.

Bei dem Beispiel Thallium-I-sulfate (Tabelle 2, RC-Nr. 181) wird in einem dritten Tierversuch umgekehrt erst mit Verabreichung der Dosis der TK 3, ≤ 25 mg/kg, die TK der NIOSH- LD_{50} erreicht.

Im zweiten Fall, in dem sich eine Differenz von zwei TKn ergibt, ist sofort zu erkennen, daß bei dieser Abweichung von zwei TKn ein dritter Tierversuch notwendig ist. (Tabelle 2, RC-Nr. 22).

Ergebnis: Für 294 Substanzen (84,7%) ist die Treffsicherheit mit einem Tierversuch oder mit zwei Tierversuchen pro Substanz definiert (Tabelle 3). Nur für 53 Substanzen (15,3 %) muß ein dritter Tierversuch nicht nur für eine sichere Einstufung in eine TK, sondern auch zum Erreichen der NIOSH- LD_{50} innerhalb einer TK angesetzt werden. Es handelt sich durchweg um Substanzen, die als falsch positive und

falsch negative Wertepaare außerhalb des F_G -Bereiches liegen.

Das Ergebnis zeigt eindeutig, daß die Einstufung in eine TK, wie wir sie in Abschnitt 4.2 mit 94,5 % berechnet haben, nicht mit der Treffsicherheit der Einstufung mit 84,7 % gleichgesetzt werden kann.

5 Stoffe aus dem RC, mit denen die ATC-Methode validiert wurde

Die Arbeit von Schlede et al. (1992) enthält 30 Chemikalien und Arzneimittel, für die zwei und mehr orale LD_{50} -Werte aus

für eine sichere Zuordnung zu einem Toxizitätsbereich notwendig. Zwei Stoffe (RC-Nr. 43 und 292) unterscheiden sich jeweils um eine TK, und für diese Stoffe müßten zwei Tierversuche pro Stoff durchgeführt werden. In 81,2 % der Fälle ist demnach eine sichere Einstufung in einen TK_1 -Bereich aus der IC_{50x} heraus möglich, und für die 16 Substanzen sind nur 24 Tierversuche für eine vergleichbare Zuordnung in eine TK anzusetzen (Tabelle 3, Nr. 2). Die Treffsicherheit der Einstufung errechnet sich ebenfalls mit 81,2 % (13 Substanzen), da nur für drei Stoffe (RC-Nr. 49, 60, 234) drei Tierver-

Lfd. Nr.	RC-Stoffe n	Zahl der Tierversuche			Gesamt	Treffsicherheit (%)
		1 Stoffe n (%)	2 n (%)	3 n (%)		
1	347	184 (53,0)	144 (41,0)	19 (5,5)	529	84,7
2	16	11 (68,7)	2 (12,5)	3 (18,8)	24	81,2
3	46	20 (43,5)	25 (54,3)	1 (2,2)	73	
4	347	200 (57,6)	132 (38,1)	15 (4,3)	509	87,9

Tabelle 3: Aufschlüsselung der Wertepaare IC_{50x} - LD_{50} p.o. Ratte/Maus für Stoffe aus dem RC unter Berücksichtigung des Faktors der Treffsicherheit der Einstufung in Prozent, der mit ein bis zwei Tierversuchen pro Stoff definiert ist.

der Literatur recherchiert werden konnten. Die Stoffe sind nach ihren LD_{50} -Werten in die bekannten Toxizitätsklassen nach Abschnitt 3 eingeordnet; 16 der 30 Stoffe sind im RC erfaßt.

In der Tabelle 4 sind diese 16 Stoffe mit den TKn-Bereichen aus der Arbeit von Schlede et al. (1992), den IC_{50x} -Werten und den Einstufungen in TKn aufgrund der mittleren Vorhersagedosen verzeichnet.

Zusätzlich haben wir das geometrische Mittel der LD_{50} -Einzelwerte pro Stoff als LD_{50x} berechnet, um daraus die Treffsicherheit der Einstufung bestimmen zu können. Für Phenylthiourea, das nur mit einem LD_{50} -Wert erfaßt ist, haben wir einen zweiten LD_{50} -Wert für eine Mittelwertbildung aus der Arbeit von Scheline et al. (1961) eingesetzt.

Ergebnis: Die Tabelle 4 zeigt, daß 11 Stoffe (68,7 %) mit ihren TK_1 -Bereichen aus der Arbeit von Schlede et al. (1992) die jeweilige TK der mittleren Vorhersagedosis einschließen. Für rund 69 % der Substanzen wäre also nur ein Tierversuch

suche zur Erreichung der LD_{50x} notwendig wären (Tabelle 4).

Das Ergebnis ist unter dem Aspekt bedeutungsvoll, daß von den 16 RC-Stoffen acht als falsch positive bzw. falsch negative Wertepaare außerhalb des F_G -Bereiches in Abbildung 1 liegen, aber nach der TKn-Klassifikation sich nur drei Substanzen als falsch negativ erweisen. Diese drei Substanzen gehören übrigens auch zu den falsch negativen Wertepaaren in Abbildung 1.

6 Vergleich der RC-Daten mit zwei weiteren Klassifikationssystemen für die akute orale Toxizität

Von Purchase et al. (1987) wird für die akute orale Toxizität für Ratte/Maus eine Rangordnung des Grades der Toxizität von Stoffen vorgestellt, der sich wiederum vier TKn zuordnen lassen. Die TKn weichen in ihren Grenzbereichen von den TKn der EU ab, die bei der ATC-Methode benutzt werden (Tabelle 5). In diese TKn sind von

den Autoren 48 Chemikalien und Arzneimittel aus dem „FRAME-Cytotoxicology Research Project“ eingeordnet (Balls et al., 1984). Wir vergleichen diese Einordnung mit der Einordnung, die sich aus den RC-Daten für diese Substanzen ergibt.

Zur Einstufung der 48 Stoffe sind folgende Hinweise wichtig:

Von zwei Stoffen – Diethylstilbestrol und Fructose – ist keine akute orale Toxizität für Ratte/Maus bekannt; demzufolge ist ihre Einstufung in das orale Toxizitätsprofil nicht möglich. Von den verbleiben-

den 46 Stoffen ist ein Stoff – Potassium-Iodide – nicht im RC registriert. Für diesen Stoff läßt sich jedoch die IC_{50x} aus den Arbeiten von Clothier et al. (1988) und Mazziotti et al. (1990) und demzufolge auch die mittlere Vorhersagedosis berechnen. Purchase et al. (1987) ordnen diesen Stoff in die TK3 ein.

Von sieben Stoffen fehlen genaue Angaben zur Einstufung in eine der vier TKn für Ratte/Maus: p-Aminophenol, Bendiocarb, Dimethylsulfoxid, Ethanol, Ioxynil, 6-Methylcoumarin und p-Chlormercuri-

benzoate (PCMB). Wir ergänzten die Einstufungen in eine TK entsprechend den oralen LD_{50} -Werten für Ratte/Maus aus dem NIOSH-Register (RTECS) für sechs der sieben Stoffe und für PCMB aus einer Arbeit von Balls et al. (1984).

Ein Vergleich der Einstufungen in eine TK dieses Klassifikationssystems auf der Grundlage der RC-Daten mit der Einstufung von Purchase et al. erfolgt nach der bekannten Berechnung der minimalen, mittleren und maximalen Vorhersagedosis einer oralen LD_{50} aus den IC_{50x} -Werten nach Abschnitt 4.1.

Die Einstufung der 46 Stoffe in eine TK beruht wieder auf der Annahme, daß eine Dosis mit einem Tierversuch bzw. zwei Dosen mit zwei Tierversuchen pro Stoff durchgeführt werden, beginnend mit der Prüfung der mittleren Vorhersagedosis, und daß die Letalität der Tiere als Marker dient (Abbildung 2).

Ergebnis: Für 20 Stoffe (43 %) stimmt die TK der mittleren Vorhersagedosis mit der Klassifikation des publizierten Toxizitätsprofils überein. Für diese Stoffe wäre demnach nur ein Tierversuch für eine sichere Einstufung in einen TKn-Bereich aus der IC_{50x} erforderlich. Bei 25 Stoffen wären zwei Tierversuche notwendig, denn es besteht zur TK der mittleren Vorhersagedosis eine Differenz von einer TK. Mit diesem Ergebnis läßt sich für 45 Substanzen (97,8 %) mit den RC-Daten die Rangordnung der Toxizitätsstärke für die akute orale Toxizität für Ratte/Maus aus der Arbeit von Purchase et al. (1987) bestätigen (Tabelle 3, Nr. 3). Nur von einem Stoff – Warfarin – erreichen weder die minimale noch die maximale Vorhersagedosis die entsprechende TK. Die Treffsicherheit der Einstufung in Prozent der Substanzen, für die nur ein oder zwei Tierversuche für eine sichere Einstufung erforderlich sind, kann nicht exakt bestimmt werden, da von

RC-Nr.	Substanz	TK1	LD_{50x}		IC_{50x} mM	mittlere Vorhersagedosis	
			mg/kg	TK		mg/kg	TK
20	Cadmiumchloride	1 - 2	197	2	0,0064	86	2
43	Aldrin	2	53	2	0,067	475	1
49	Parathion	3	6	3	0,093	437	1
60	Indomethacin	3	13	3	0,16	680	1
72	Butylated hydroxyanisole	0 - 1	3022	0	0,24	409	1
76	Sod. dodecylsulfate	0 - 1	1844	1	0,27	691	1
102	Acrylamide	1 - 2	163	2	1,61	369	1
112	Caffeine	1 - 2	285	1	2,64	1249	1
118	Phenobarbital	1 - 2	225	1	3,81	1753	1
119	Sod. salicylate	1	1570	1	4,33	1277	1
234	Phenylthiourea	3	5	3	0,54	491	1
291	Aniline	1	668	1	6,90	910	1
292	Allyl alcohol	2	80	2	6,94	569	1
351	Dimethylformamide	0	5094	0	114,0	2420	0
358	Acetonitrile	0 - 1	2672	0	368,0	2262	0
360	Ethylene glycol	0	6335	0	555,0	4090	0

Tabelle 4: Vergleich der Bereiche der einzelnen EU-Toxizitätsklassen TK₁ aus der Arbeit von Schledde et al. (1992) mit den Toxizitätsklassen, die sich aus der mittleren Vorhersagedosis ergeben. Untersucht wurden 16 Stoffe, die im RC erfaßt sind. Für eine Beurteilung der Treffsicherheit einer Einstufung wurde auch die mittlere LD_{50} (LD_{50x}) berechnet. Die Stoffe mit der RC-Nr. 49 und 234 sind in der Abbildung 1 markiert. Für diese beiden Stoffe liegt in der Abbildung 1 nur je ein LD_{50} -Wert vor.

TK	Toxizitätsbereich mg/kg Körpergewicht
1	< 20
2	≥ 20 bis < 200
3	≥ 200 bis < 2000
4	≥ 2000

Tabelle 5: Rangordnung des Grades der Toxizität von Stoffen für die akute orale Toxizität für Ratte/Maus nach Purchase et al.

Purchase et al. nur in den seltenen Fällen die oralen LD_{50} -Werte für Ratte/Maus angegeben sind. Aus den Ergebnissen in Abschnitt 4.3 kann man aber davon ausgehen, daß auch wieder eine Treffsicherheit um 85 % erreicht wird.

Auch dieses Ergebnis des Vergleiches der Einstufung in vier TKn ist aus folgendem Grunde bemerkenswert: Von den 46 FRAME-Substanzen gehören 12 Substanzen (26,1 %) zu den Wertepaaren IC_{50x} - LD_{50} p.o. im RC, die als falsch positiv bzw. falsch negativ außerhalb des mit $F_G \leq \log 5$ definierten Dosisbereiches um die Standardregressionsgerade der Abbildung 1 liegen. Durch die Einstufung in Toxizitätsklassen auf der Grundlage der RC-Daten weicht jedoch nur noch Warfarin von dem vorgegebenen Toxizitätsprofil als falsch negativ ab.

In einer weiteren Arbeit zur ATC-Methode von Schlede et al. (1995) wird ein TKn-System der EU für feste Pestizide mit den Klassengrenzen 500, 50 und 5 mg/kg vorgestellt. Unter Zugrundelegung dieser TKn-Grenzen wird mit den LD_{50} -Vorhersagedosen des RC folgendes Ergebnis erzielt: Für 200 Stoffe (58 %) ist ein Tierversuch und für 132 Stoffe (38 %) sind zwei Tierversuche zur Erreichung der TK der entsprechenden NIOSH- LD_{50} erforderlich. Die 347 Stoffe des RC könnten demnach mit nur 509 Tierversuchen der TK der NIOSH- LD_{50} zugeordnet werden (Tabelle 3, Nr. 4). Die Treffsicherheit errechnet sich mit 305 Substanzen (87,9 %).

7 Praktische Nutzung des Verfahrens

7.1 Teststrategie

Die Werte in Tabelle 3, Nr. 1, zeigen, daß in 94,5 % der Fälle nur ein bis zwei Tierversuche für eine mit der TK der NIOSH- LD_{50} vergleichbare Einstufung ausreichen. Auf der Grundlage dieses Ergebnisses sind für eine Anpassung des in dieser Arbeit vorgestellten RC-Verfahrens mit den Werten der Parameter der linearen Regression (siehe Abschnitt 2) an die ATC-Methode zwei Aspekte von Bedeutung:

Die mit dem RC-Verfahren geschätzte mittlere Vorhersagedosis ist die Grundlage der neuen Teststrategie; die mit den TKn 0 bis 3 definierten und feststehenden Dosen 2000, 200 und 25 mg/kg sollen im Tierversuch getestet werden.

Folgender Vorschlag sollte bei späteren Validierungsversuchen Berücksichtigung

finden: Ausgangspunkt für eine Versuchsplanung ist die mittlere Vorhersagedosis. Im Tierversuch geprüft wird die TK-Dosis, die der mittleren Vorhersagedosis am nächsten liegt.

Dazu wird das geometrische Mittel von zwei benachbarten Toxizitätsklassen gebildet. Für die TK1 und TK2 beträgt dieser Mittelwert 632 mg/kg (TK1) bzw. 70,7 mg/kg (TK2). Bei einer Vorhersagedosis von beispielsweise 500 mg/kg sollte im ersten Tierversuch mit drei männlichen Ratten die Dosis der TK2 von 200 mg/kg eingesetzt werden.

Bei dem Tod von nicht mehr als einem Versuchstier wird die nächst höhere Dosis mit 2000 mg/kg drei weiblichen Versuchstieren appliziert. Den Ergebnissen in Tabelle 3 entsprechend dürfte dieser zweite Tierversuch eine sichere Einstufung in eine TK durch den Tod der drei Tiere ermöglichen.

7.2 Einsparung von Versuchstieren

Geht man bei der ATC-Methode mit den Klassengrenzen 2000, 200 und 25 mg/kg von durchschnittlich drei Tierversuchen für eine Einstufung eines Stoffes in eine TK aus (Schlede et al., 1995), dürfte beim Vorschalten der vorhergesagten TK auf der Grundlage der Zytotoxizitätsdaten mit einer Einsparung von wenigstens einem ATC-Schritt (Tierversuch), also mit einer ca 30 prozentigen Reduzierung der Versuchstierzahl zu rechnen sein. Genauere Prozentwerte der Einsparung ergeben sich, wenn folgende Werte zugrunde gelegt werden:

Mit der ATC-Methode sind mit den Prüfdosen 2000, 200 und 25 mg/kg zur Einstufung eines Stoffes in eine TK durchschnittlich 9,11 Versuchstiere ausreichend (Schlede et al., 1995). Für die im RC registrierten 347 Stoffe müßten demnach 3161 Versuchstiere veranschlagt werden. Nach dem Vorschalten der mittleren Vorhersagedosis lassen sich folgende Tierzahlen abschätzen: Für 328 Stoffe werden zwei Prüfdosen in zwei Tierversuchen mit je drei Versuchstieren und für 19 Stoffe (Tabelle 3, Nr. 1) drei Prüfdosen in drei Tierversuchen mit je drei Tieren als ausreichend eingeschätzt. Daraus errechnen sich insgesamt 2139 Versuchstiere. Verglichen mit den 3161 Tieren aus der ATC-Methode ist mit einer 32prozentigen Reduzierung der Zahl der Versuchstiere zu rechnen.

8 Zur Bestimmung der Zytotoxizität für das neue Verfahren

Hier sind einige maßgebliche Hinweise für laboreigene Praktiken im Zell-zuchtlaboratorium zusammengestellt. Für 10 bis 15 Stoffe aus dem RC (z.B. aus den Tabellen 2 und 4 dieser Arbeit willkürlich ausgewählt) mit bekannten oralen LD_{50} -Werten (NIOSH), wird mit einer Säuger-Zelllinie (z.B. 3T3) und einem zytotoxischen Endpunkt (z.B. NR_{50} -Test) eine Regressionsgerade erstellt. Diese muß als laboreigene Eichgerade in einem Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^3 mmol/l Nährmedium innerhalb des in Abbildung 1 markierten F_G -Bereiches liegen (Halle und Spielmann, 1994). Die Anpassung dieser Eichgeraden an diesen Bereich dürfte in keinem Falle schwierig sein, wenn man davon ausgeht, daß die *in vitro* kultivierte Zelle als ein plastisches System auf Änderung der extrazellulären Serumkonzentration mit Änderungen der Empfindlichkeit gegenüber Xenobiotika reagiert: Zellkulturen in Nährmedien mit Serumkonzentrationen um 1 % bis 5 % reagieren auf toxische Konzentrationen von Xenobiotika empfindlicher als unter Serumkonzentrationen um 10 % bis 20 %.

Die Kultivierungs- und Testbedingungen, unter denen die Eichgerade erstellt wurde, müssen sich als Standardmethoden über Jahre als reproduzierbar erweisen. Diese Methoden werden dann zur Testung noch unbekannter Substanzen eingesetzt, die in Toxizitätsklassen eingestuft werden sollen. Mit dem in der Zellkultur ermittelten IC_{50} -Wert (z.B. NR_{50}) und den Parametern der Standardregressionsgeraden aus dem RC werden die Vorhersagedosen in mg/kg KG berechnet. Das weitere Vorgehen ist in dieser Arbeit beschrieben. Ein Schema (Abbildung 3) veranschaulicht die einzelnen Testschritte.

9 Diskussion

Ein neues Verfahren zur Einstufung von Chemikalien und Arzneimitteln in festgelegte Toxizitätsklassen von bekannten Klassifikationssystemen für die Beurteilung einer akuten oralen Toxizität auf der Grundlage von Zytotoxizitätsdaten wird vorgestellt. Für das Verfahren werden Daten aus dem Register der Zytotoxizität (RC) und Elemente zur Testung von Versuchstieren mit der ATC-Methode von Schlede et al.

(1992) miteinander verknüpft; wir möchten diese neue Alternativmethode zum Tierversuch deshalb als kombiniertes RC-ATC-Verfahren bezeichnen.

Die im RC registrierten Daten mit den Werten für IC_{50x} , LD_{50} p.o. Ratte/Maus und den Parametern des linearen Regressionsmodells Intercept a und Regressionskoeffizient b mit den daraus berechneten minimalen, mittleren und maximalen Vorhersagedosen für die orale LD_{50} in mg/kg Körpergewicht werden für diese Einstufungen in Toxizitätsklassen zugrunde gelegt. Mit den Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich die aus den Zytotoxizitätsdaten ermittelten Toxizitätsklassen mit denjenigen Toxizitätsklassen vergleichen lassen, die sich aus bereits publizierten LD_{50} -Werten ergeben. Zu diesem Zweck wird eine vereinfachte Testhierarchie mit simulierten Tierversuchen entsprechend der ATC-Methode angenommen. Es schließen sich Untersuchungen über die Sicherheit und Güte der Einstufungen von Stoffen aus dem RC in Toxizitätsklassen an.

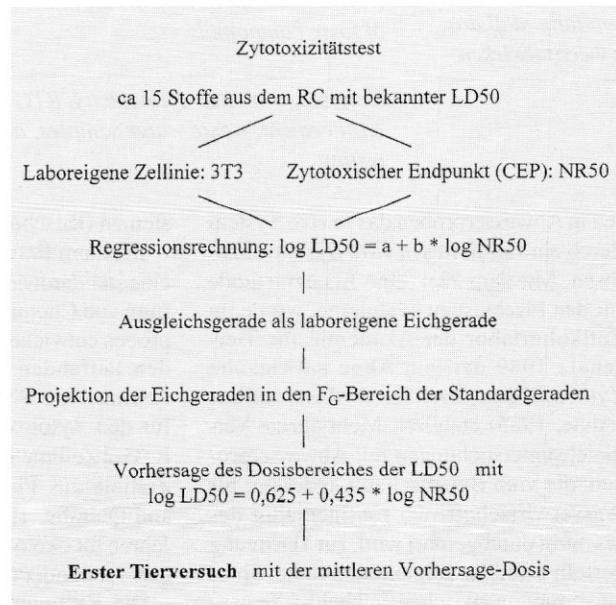
Wenn die NIOSH- LD_{50} (RTECS) als Bezugswert für eine Einstufung herangezogen wird, könnte eine sichere und vergleichbare Einstufung in die gleiche Toxizitätsklasse auf der Grundlage der Zytotoxizitätsdaten in 53 % der Fälle bereits mit einem Tierversuch und in 41 % der Fälle mit zwei Tierversuchen erreicht werden. Wenn andererseits entweder ein Toxizitätsklassen-Bereich (Schlede et al., 1992) oder zwei weitere Klassifikations-

systeme (Purchase et al., 1987; Schlede et al., 1995) als Bezugswerte für einen Vergleich verwendet werden, ist ebenfalls eine direkt vergleichbare Einstufung aus den RC-Daten heraus möglich. Dieses Ergebnis unterstreicht die bemerkenswerte Zuverlässigkeit und Stabilität des kombinierten RC-ATC-Verfahrens.

Ein gleich gutes Ergebnis wird erzielt, wenn für einen solchen Vergleich der Faktor der Treffsicherheit zugrunde gelegt wird. Im nächsten Schritt werden Möglichkeiten für eine praktische Nutzung des Verfahrens und seine Vorteile für eine Reduzierung der Zahl der Versuchstiere aufgezeigt. Erstmals für eine Alternativmethode zur Bestimmung der Toxizität von Xenobiotika mit Zellkulturen läßt sich mit dem neuen Verfahren die Einsparung an Tierversuchen mit rund 30 % quantifizieren. Ob dieser prozentuale Anteil auch in der Praxis erreicht oder übertroffen werden kann, wird sich allerdings erst nach experimenteller Validierung des neuen Verfahrens herausstellen.

Der Vorteil des neuen Verfahrens wird besonders deutlich, wenn es um Informationen für die Festlegung der Startdosis bei Testbeginn mit dem ersten Tierversuch geht. Für solche Informationen für die ATC-Methode kommen nach Schlede et al. (1992) zum Beispiel Daten über Struktur-Wirkungsbeziehungen in Frage, die aber besonders bei Neuentwicklungen von Chemikalien und Arzneimitteln nicht immer zur Verfügung stehen dürften und auch keine „sichere“ Vorhersage der Startdosis erlauben.

Abbildung 3:
Anwendung des Verfahrens der Einstufung von Stoffen in die Toxizitätsklassen der EU für akute orale Toxizität unter Berücksichtigung laborindividueller Bedingungen.



Literatur

- Balls, M. and Bridges, J. W. (1984). The FRAME Research Programme on in vitro cytotoxicology. *Alternative Methods in Toxicology* 2, 61-79.
- Clothier, R. H., Hulme, L., Ahmed, A. B., Reeves, H. L., Smith, M. and Balls, M. (1988). In vitro cytotoxicity of 150 chemicals to 3T3-L1 cells, assessed by the FRAME kenacid blue method. *ATLA* 16, 84-95.
- Halle, W. (1985). Grundlagen der Zytotoxizität in vitro. In A. Kramer, G. Berencsi, W. Weuffen (Hrsg.), *Handbuch der Antiseptik, Teilband 1/5: Toxische und allergische Nebenwirkungen von Antiseptika* (84-112). Stuttgart, New York: Fischer Verlag.
- Halle, W. (1993). On the reliability of LD_{50} predictions for antiseptics by cytotoxicity determination. *Hyg. Med.* 18, 209-212.
- Halle, W. (1995). Antwort auf den Kommentar von P. Günzel und B. Spiegel. *ALTEX* 12, 105-107.
- Halle, W., Göres, E. und Baeger, I. (1987). Besitzt die Vorhersage der LD_{50} mit Hilfe der Zellkultur Allgemeingültigkeit? *Pharmazie* 42, 848-850.
- Halle, W. und Spielmann, H. (1992a). Two procedures for the prediction of acute toxicity (LD_{50}) from cytotoxicity data. *ATLA* 20, 40-49.
- Halle, W. und Spielmann, H. (1992b). Ein erweitertes Register der Zytotoxizität zur Abschätzung der akuten Toxizität (LD_{50}). In H. Schöffl, R. Schulte-Hermann, H. A. Tritthart (Hrsg.), *Möglichkeiten und Grenzen der Reduktion von Tierversuchen (Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen)* (151-152). Wien, New York: Springer Verlag.
- Halle, W. und Spielmann, H. (1994). Zur Qualität der Vorhersage der akuten Toxizität (LD_{50}) aus der Zytotoxizität (IC_{50x}) für eine Gruppe von 26 Neurotropika aufgrund der Daten des „Erweiterten Registers der Zytotoxizität“. *ALTEX* 11, 148-153.
- Halle, W. und Spielmann, H. (1997). Prädiktion der akuten Toxizität mit Hilfe von Zytotoxizitätsdaten. In H. Schöffl, H. Spielmann, H. A. Tritthart (Hrsg.), *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen, Band IV, Forschung ohne Tierversuche 1996* (10-19). Wien, New York: Springer Verlag.
- Mazziotti, I., Stamatii, A.-L. und Zucco, F. (1990). In vitro cytotoxicity of 26 coded chemicals to HEP-2 cells: A validation study. *ATLA* 17, 401-406.
- Purchase, I. F. H., Farrar, D. G. und Whitaker, I. A. (1987). Toxicology profiles on substances used in the FRAME Cytotoxicology Research Project. *ATLA* 14, 184-242.
- Scheline, R. R., Smith, R. L. und Williams, R. T. (1961). The metabolism of arylthioureas. *J. Med. Pharmac. Chemistry* 4, 109-135.
- Schlede, E., Mischke, U., Roll, R. und Kayser, D. (1992). A national validation study of the acute-toxic-class method - an alternative to the LD_{50} test. *Arch. Toxicol.* 66, 455-470.
- Schlede, E., Mischke, U., Diener, W. und Kayser, D. (1995). The international validation study of the acute toxic class method (oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659-670.
- Tatken, R. L. und Lewis, R. J., Eds. (1984). *RTECS: Registry of toxic effects of chemical substances. 1981-82 Edition, Volume 1-3, and 1983 Supplement, Volume 1 and 2, 1984*. Cincinnati, Ohio 45226: US Dept. Health, Human Services, Nat. Inst. Occupat. Saf. Health.

Danksagung

Das „Erweiterte Register der Zytotoxizität“ wurde im Rahmen eines Forschungsvorhabens erarbeitet, das vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) über den Projekträger Forschungszentrum Jülich GmbH (BEO) im Förderschwerpunkt „Alternativen zum Tierversuch“ mit dem Förderkennzeichen 0310007A in großzügiger Weise finanziell unterstützt wurde. Ergänzende Untersuchungen konnten von W. Halle aufgrund der Förderung durch den Bundesverband der Tierversuchgegner „Menschen für Tierrechte, Baden-Württemberg e.V.“, Stuttgart, durchgeführt werden.

Korrespondenzadresse

Dr. habil. Willi Halle
ZEBET im BgVV
Diedersdorfer Weg 1
D-12277 Berlin
Tel. 49-30-8412-2270
Fax 49-30-8412-2958