

Unterschiedliche Konzepte der toxikologischen Risikobewertung bei der Anwendung von Tierversuchen und *in vitro* Methoden

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

In vitro Tests werden in der Toxikologie bisher nur bei mechanistischen Studien zur Aufklärung von Wirkungsmechanismen akzeptiert. Für die toxikologische Risikoabschätzung werden jedoch auch heute nur Tierversuche anerkannt, da *in vitro* Tests qualitativ andere Ergebnisse liefern. Hier wird ein neues Konzept zur Diskussion gestellt, das gestattet, eine Risikoabschätzung ausschließlich mit Informationen aus *in vitro* Tests durchzuführen und diese in sicherheitstoxikologische, behördliche Maßnahmen umzusetzen.

Summary: Different concepts for risk assessment have to be applied if the data are derived from testing in animals or from testing in vitro.

In vitro tests are well accepted by toxicologist for mechanistic studies but they have so far not been able to replace testing in animals for regulatory purposes, as e.g. risk assessment and risk management. This is basically due to differences in the quality of results obtained from *in vivo* and *in vitro* studies. Therefore, a new concept for risk assessment and risk management is proposed which is entirely based upon data from *in vitro* tests.

Keywords: alternative test, in vitro toxicology, risk assessment, risk management

1 Einleitung

In der Toxikologie ist der Wert, den *in vitro* Methoden beim Ersatz von Tierversuchen haben, umstritten. Anfangs wurden die *in vitro* Methoden völlig abgelehnt; inzwischen jedoch wird generell akzeptiert, daß sie bei mechanistischen Studien unentbehrlich sind, etwa bei der Aufklärung von Wirkungsmechanismen, die die Ursache für ein bestimmtes toxikologisches Phänomen darstellen, wie z.B. die Krebsauslösung durch chemische Stoffe.

Trotzdem plädieren die maßgeblichen Toxikologen im deutschen Sprachraum bei der toxikologischen Risikobewertung für Industrie und Behörden auch heute noch dafür, daß Tierversuche unerläßlich sind und ihnen die entscheidende Rolle bei der Risikobewertung zukommt (Forth et al., 1991; Dekant und Vamvakas, 1995; Marquardt und

Schäfer, 1995; Greim und Deml, 1996). *In vitro* Methoden sind nach diesem Konzept nur dann gefragt, wenn es abzuklären gilt, ob eine toxische Nebenwirkung, die beim Versuchstier beobachtet wurde, auch beim Menschen auftreten kann. Oft ermöglichen erst molekularbiologische bzw. biochemische Untersuchungen an Zellen und Geweben des Menschen und der im Tierversuch verwendeten Spezies eine Bewertung der Bedeutung der Tierversuchsdaten für den Menschen.

Häufig wird bei der Risikobewertung in der chemischen Toxikologie hervorgehoben, daß nur erfahrene Toxikologen eine Risikoabschätzung vornehmen könnten, denn nur sie seien in der Lage, eine „intelligente Toxikologie“ auszuüben. Besonders Eindruck macht auf Unerfahrene auch die Feststellung, daß die Toxikologie eine „Kunst“ sei (die nicht näher beschrieben wird) und die nur

wenige, sehr erfahrene Toxikologen praktizieren könnten.

2 Das Konzept der Risikoabschätzung in der Toxikologie

Die hier geschilderte, weit verbreitete Ansicht läßt wesentliche Elemente der Risikoabschätzung in der Toxikologie außer acht. Das mag auch daran liegen, daß selbst in den einschlägigen deutschsprachigen Lehr- und Handbüchern der Toxikologie (Forth et al., 1992; Dekant und Vamvakas, 1994; Marquardt und Schäfer, 1995; Greim 1996) der Prozeß der Risikobewertung für toxische Stoffe nicht eindeutig definiert ist. Es wird nur recht allgemein beschrieben, daß das Risiko einer Schädigung durch das toxische Potential (Gefährlichkeit) des Stoffes einerseits und die Wahrscheinlichkeit des Schadenseintritts und die

Schwere des Schadens (*Exposition*) andererseits bestimmt wird. Diese Definition ist nicht so exakt wie das von Behörden und Industrie in den USA einvernehmlich erarbeitete Konzept der Trennung der Risikobewertung (= *risk assessment*) von den sich daraus ergebenden Schutzmaß-

nahmen (= *risk management*) (Amdur et al., 1991; Hayes, 1994). Nach diesem zweistufigen Konzept sind drei entscheidende Größen für den ersten Schritt, die Risikobewertung, unerlässlich (Abbildung 1):

Die *Gefährlichkeit* des Stoffes, d.h. seine toxischen Eigenschaften,

die *Exposition*, d.h. die Bedingungen, unter denen Menschen mit dem Stoff in Kontakt kommen bzw. ihn anwenden, z.B. am Arbeitsplatz, als Nahrungsmittel oder als Medikament, und

die Bestimmung der *Dosis-Wirkungs-Beziehung* am Erfolgsorgan.

Es mag überraschen, daß aufgrund der Informationen über die drei genannten Größen eine recht eindeutige Risikobewertung möglich ist. Bisher konnte man nur zwei der drei genannten Faktoren im Tierversuch ermitteln, nämlich die Gefährlichkeit, also die toxischen Eigenschaften, und die Dosis-Wirkungs-Beziehung für das jeweilige Gebiet der Toxikologie.

3 Welche Informationen können *in vitro* Methoden für die toxikologische Risikobewertung liefern?

Es ist das erklärte Ziel der Entwicklung und Validierung von Alternativmethoden, die toxikologischen Eigenschaften chemischer Stoffe zu erfassen, d.h. ihre Gefährlichkeit zu bestimmen, aber auch Tierversuche zu ersetzen, die mit dem gleichen Ziel durchgeführt werden. So wird z.B., um den Draize Test an der Haut oder am Auge des Kaninchens zu ersetzen, geprüft, ob es mit tierversuchsfreien Methoden möglich ist, Stoffe mit starken, geringen und fehlenden haut- und augenreizenden Eigenschaften hinreichend sicher zu identifizieren. Dieser Aspekt leitet gleichzeitig zum dritten Faktor für die Risikobewertung über, nämlich zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung. Sie ist praktisch mit jedem *in vitro* System möglich, und zwar sehr viel genauer als im Tierversuch.

Die beiden zuletzt genannten Punkte, die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung und die Reproduzierbarkeit, sind charakteristisch für alle *in vitro* Tests, ohne daß sie für die Risikobewertung in der Toxikologie geeignet sein müssen. Sehr viel schwieriger ist es dagegen festzustellen, ob die *in vitro* gemessenen

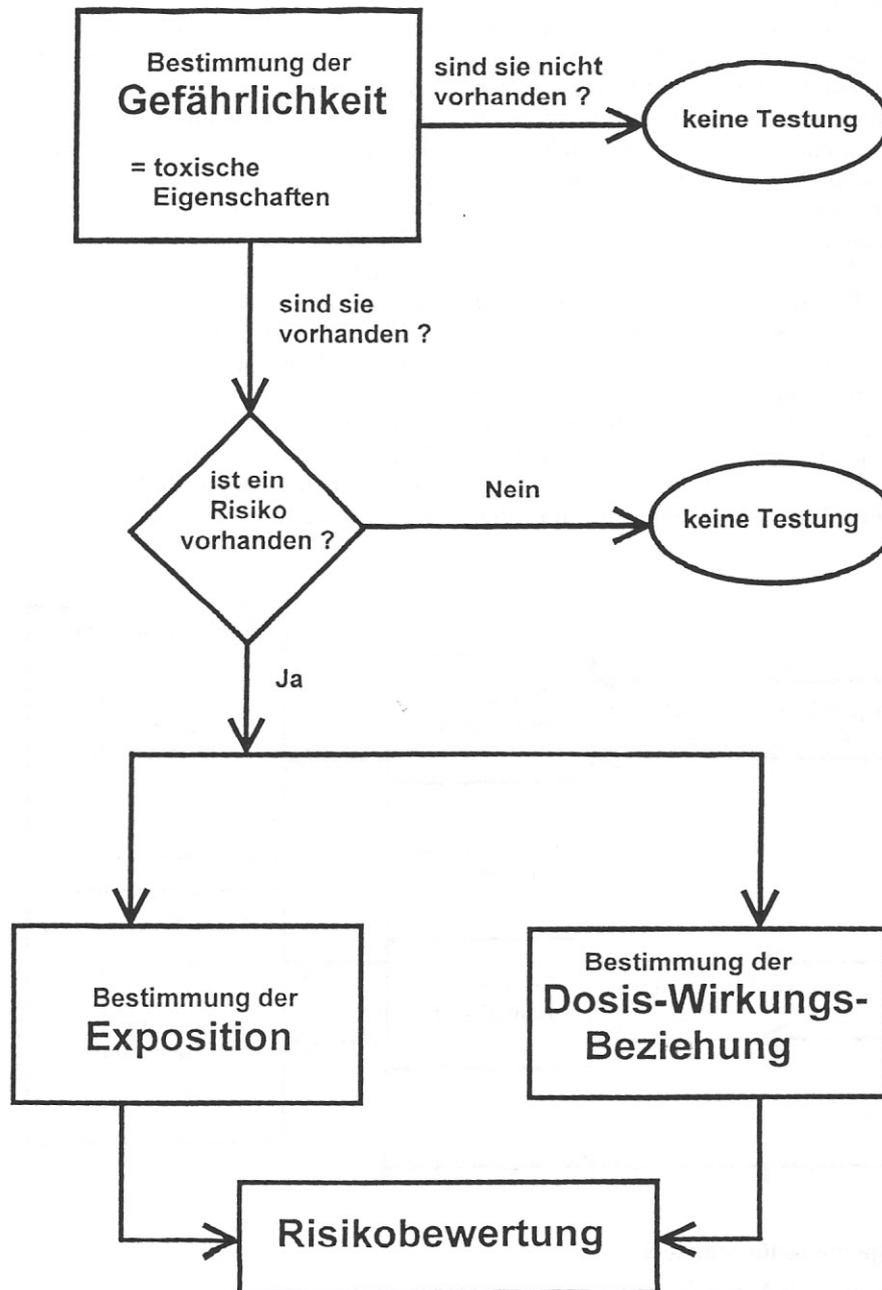


Abbildung 1: Das in den USA entwickelte Konzept der Risikobewertung (*risk assessment*) für chemische Stoffe. Es beruht auf der Bestimmung der drei Faktoren Gefährlichkeit, Exposition und Dosis-Wirkungs-Beziehung für das jeweilige Gebiet der Toxikologie (nach Amdur et al., 1991, und Hayes, 1994).



Dosis-Wirkungs-Kurven in einem signifikanten Zusammenhang mit den toxikologischen Eigenschaften stehen, die im Tierversuch bestimmt werden. Beispielsweise sind einfache Zytotoxizitätstests gut reproduzierbar, und sie liefern ideale Dosis-Wirkungs-Kurven, ohne daß sie mit den Ergebnissen korrelieren müssen, die bei Exposition des Menschen oder von Versuchstieren mit denselben Stoffen nach oraler oder dermaler Applikation beobachtet werden.

4 Qualitative Unterschiede der Ergebnisse von *in vivo* und *in vitro* Studien in der Toxikologie und ihre Einsatzmöglichkeiten bei der Risikobewertung

Ein schematischer Vergleich der Informationen, die toxikologische *in vitro* und *in vivo* Tests liefern, und ihre Bedeutung für die Risikobewertung sind in Abbildung 2 wiedergegeben. Sie geht auf einen bisher

nicht publizierten Vorschlag von Mark Chamberlain (1996) zurück, der bei der Firma Unilever in England für die toxikologische Prüfung von Kosmetika zuständig ist. Abbildung 2 zeigt, daß toxikologische *in vitro* und *in vivo* Studien bei der Risikoabschätzung in ähnlicher Weise eingesetzt werden können. In beiden Fällen wird mit standardisierten Versuchsprotokollen und chemischen Stoffen gearbeitet, aber die Versuchsobjekte sind verschieden und liefern dementsprechend auch qualitativ sehr unterschiedliche, d.h. kaum vergleichbare Ergebnisse, die in der Abbildung mit A und B gekennzeichnet sind.

Das Schema veranschaulicht weiterhin, daß aus den Ergebnissen der Tests Informationen für die Risikobewertung genutzt werden, die wiederum qualitativ sehr unterschiedlich voneinander sind. Die Risikobewertung mit Hilfe von Tierversuchen hat deswegen eine andere Qualität als die Risikobewertung, die mit den

Informationen aus *in vitro* Tests möglich ist. Die Abbildung macht außerdem deutlich, daß die Informationen aus *in vivo* und *in vitro* Studien schließlich zu Maßnahmen führen, die dem Schutz der Anwender chemischer Stoffe dienen (= *risk management*). Die Ergebnisse toxikologischer Tierversuche werden von Behörden zur Klassifizierung und Kennzeichnung der Stoffe und für die Festlegung von Sicherheitsbestimmungen in Abhängigkeit von der Exposition benutzt. Im unteren Teil der Abbildung 2 ist dargestellt, wie heute Informationen aus toxikologischen *in vitro* Studien in der chemisch-pharmazeutischen und kosmetischen Industrie genutzt werden, nämlich nur für die Prioritätensetzung bei der weiteren Verwendung der Stoffe innerhalb des Unternehmens.

Die zukünftigen Möglichkeiten der Nutzung von Informationen aus toxikologischen *in vitro* Studien für die Risikobewertung und ihre Umset-

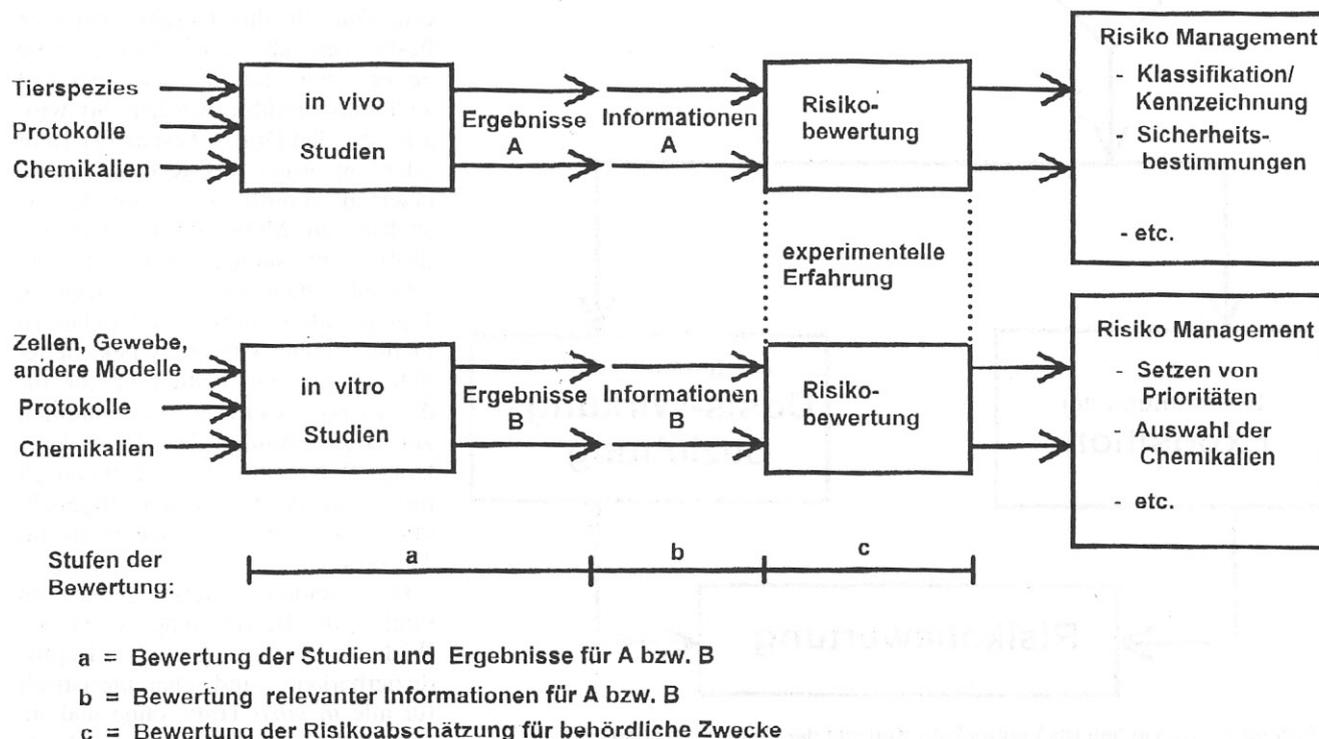


Abbildung 2: Flußdiagramm, in dem die entscheidenden Schritte für die Risikobewertung toxischer Stoffe mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Methoden dargestellt sind. (In Anlehnung an

einen bisher nicht publizierten Vorschlag von Dr. Mark Chamberlain, Unilever, England, 1996)

zung in Maßnahmen zum Schutz der Anwender werden in Abbildung 2 durch das Feld „experimentelle Erfahrung“ beschrieben, das die Felder Risikobewertung *in vitro* und Risikoabschätzung *in vivo* miteinander verbindet. Gemeint sind hier mit der „experimentellen Erfahrung“ die Validierung der *in vitro* Methode und die Bestimmung der Korrelation der *in vitro* Daten zu den *in vivo* Daten für einen definierten Bereich der Toxikologie, wie z.B. die Augenreizung.

An diesem Beispiel läßt sich die zukünftige Anwendung der Ergebnisse von *in vitro* Studien veranschaulichen. Wenn ein Unternehmen ausreichende Erfahrung sowohl mit der Prüfung von Stoffen im Draize Test am Kaninchenauge als auch mit der Prüfung in einem *in vitro* Test, wie z.B. dem HET-CAM Test, gewonnen hat, können diese Erfahrungen zur Bewertung von Stoffen allein mit den Ergebnissen im HET-CAM Test verwendet werden. Die Bewertung kann von stark und gering augenreizend bis zu nicht augenreizend führen. Daran können sich ohne weitere Tierversuche die erforderlichen Maßnahmen anschließen, nämlich die Kennzeichnung der Stoffe für behördliche Zwecke und die Vergabe von Sicherheitsempfehlungen.

5 Ausblick

Das hier geschilderte Vorgehen darf nicht als unrealistische Vision abgetan werden, sondern es kann bereits heute bei Stoffen mit stark augenreizender Wirkung angewendet werden, z.B. wenn Stoffe in wässriger Lösung stark sauer oder alkalisch reagieren. Es zeichnet sich generell für den Bereich der toxikologischen Prüfungen auf lokale Reizwirkungen an Haut und Augen ab, daß es mit *in vitro* Methoden möglich sein wird, Stoffe entsprechend ihrer Gefährlichkeitsmerkmale einzustufen und zu kennzeichnen.

Nachdrücklich muß hervorgehoben werden, daß das in Abbildung 2

dargestellte Schema zur Risikobewertung allein mit Hilfe von *in vitro* Tests von Wissenschaftlern aus der Kosmetikindustrie entwickelt wurde und daß es in Europa und den USA von Toxikologen, die in Behörden arbeiten, grundsätzlich begrüßt wird. Wie eingangs betont, stehen im Gegensatz dazu Toxikologen, die nicht direkt mit der behördlich vorgeschriebenen Toxikologie befaßt sind, den neuen Ansätzen zur Risikobewertung allein mit *in vitro* Methoden bisher noch ablehnend gegenüber. Das ist sicher auf mangelnde Erfahrung mit den *in vitro* Methoden zurückzuführen und auch darauf, daß das neue Konzept für die Risikobewertung unabhängig von Instituten entwickelt wurde, die primär der Grundlagenforschung verpflichtet sind und nicht der angewandten Toxikologie.

Literatur

- Amdur, M. M. O., Doull, J. und Klaassen, C. D. (1991). *Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*, 4. Auflage. New York: Pergamon Press.
- Chamberlain, M. (1996). Position paper presented at the OECD Workshop on „Harmonization and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods“. Personal communication.
- Dekant, W. und Vamvakas, S. (1994). *Toxikologie für Chemiker und Biologen*. Heidelberg: Spektrum Verlag.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. und Starke, K. (1992). *Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage. Mannheim: B.I. Wissenschaftsverlag.
- Greim, H. und Deml, E. (1996). *Toxikologie - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*. Weinheim: VCH Verlag.
- Hayes, A. W. (1994). *Principles and Methods of Toxicology*, 3. Auflage. New York: Raven Press.
- Marquardt, H. und Schäfer, S. G. (1995). *Lehrbuch der Toxikologie*. Mannheim: B.I. Wissenschaftsverlag.

Danksagung

Frau Dr. Barbara Grune-Wolff und Herrn Dieter Traue bin ich wegen der Unterstützung bei der Anfertigung des Manuskriptes zu Dank verpflichtet.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Horst Spielmann
 Leiter der ZEBET im BgVV
 Diedersdorfer Weg 1
 D-12277 Berlin
 Tel. 49-30-8412-2270
 Fax 49-30-8412-2958