



**RAT DER
EUROPÄISCHEN UNION**

Brüssel, den 26. Januar 2012

**5596/12
ADD 1 REV 1 (de)**

**COMPET 31
ENV 35
CHIMIE 3
MI 37
ENT 15**

ÜBERMITTLUNGSVERMERK

Absender: Europäische Kommission
Eingangsdatum: 19. Januar 2012
Empfänger: Generalsekretariat des Rates
Nr. Komm.dok.: D018298/01 Anhang
Betr.: Anhang des Entwurfs der Verordnung (EU) Nr. .../.. der Kommission vom XXX zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt

Die Delegationen erhalten in der Anlage das Kommissionsdokument D018298/01 Anhang.

Anl.: D018298/01 Anhang

ANHANG

Der Anhang der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 wird wie folgt geändert:

1. Kapitel B.42 erhält folgende Fassung:

„B.42 Hautsensibilisierung: Lokaler Lymphknotentest

EINLEITUNG

1. Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien und die auf ihnen beruhenden EU-Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Die ursprüngliche Prüfmethode zur Bestimmung der Hautsensibilisierung bei der Maus, der Lokale Lymphknotentest (Local Lymph Node Assay bzw. LLNA; OECD-Prüfrichtlinie 429; Kapitel B.42 dieses Anhangs), wurde bereits vor einiger Zeit zugelassen (1). Verschiedene Veröffentlichungen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) gehen genauer auf die Validierung des LLNA und auf die mit ihm verbundenen wissenschaftlichen Arbeiten ein. Der aktualisierte LLNA beruht auf der Auswertung von Experimenten und wissenschaftlichen Daten (12). Es handelt sich um die zweite Prüfmethode zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) bei Tieren. Die andere Prüfmethode (OECD-Prüfrichtlinie 406; Kapitel B.6 dieses Anhangs), namentlich der Meerschweinchen-Maximierungstest und der Bühler-Test, stützt sich auf Tests am Meerschweinchen. (13) Der LLNA bietet gegenüber B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (13) gewisse Vorteile im Hinblick auf den Tierschutz. Die vorliegende aktualisierte LLNA-Prüfmethode beinhaltet eine Reihe von Leistungsstandards (Anlage 1) in Übereinstimmung mit den Grundsätzen des OECD-Leitliniendokuments Nr. 34 (14). Diese können zur Bewertung des Validierungsstatus neuer und/oder modifizierter Prüfmethoden herangezogen werden, die dem LLNA in funktionaler oder mechanistischer Weise ähnlich sind
2. Bei dem LLNA wird die Induktionsphase der Hautsensibilisierung untersucht, und der Test liefert quantitative Daten für die Bewertung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Es wird darauf hingewiesen, dass die leichten/mittelgradigen Sensibilisatoren, die als geeignete Positivkontrollen bei Prüfmethoden für Meerschweinchen empfohlen werden (B. 6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13), ebenfalls für die Verwendung beim LLNA geeignet sind (6) (8) (15). Eine LLNA-Methode mit reduziertem Versuchstierbedarf (rLLNA), bei der bis zu 40 % weniger Tiere eingesetzt werden, wird ebenfalls als Option dieser Prüfmethode beschrieben (16) (17) (18). Der rLLNA kann verwendet werden, wenn aufgrund von Rechtsvorschriften lediglich die Bestätigung einer negativen Prädiktion des Hautsensibilisierungspotenzials gefordert ist, vorausgesetzt dass alle anderen Spezifikationen des LLNA-Protokolls, wie in dieser Prüfmethode beschrieben, eingehalten werden. Die Prädiktion eines negativen Ergebnisses sollte auf der Grundlage aller verfügbaren Informationen vorgenommen werden, wie in Absatz 4 beschrieben. Vor Anwendung der rLLNA-Methode sollten entsprechende Erläuterungen und eine wissenschaftliche Begründung für ihre Verwendung vorgelegt werden. Sollte der rLLNA entgegen allen Erwartungen zu

einem positiven oder nicht eindeutigen Ergebnis führen, können weitere Tests erforderlich sein, um diese Daten zu deuten oder zu präzisieren. Der rLLNA sollte nicht für die Feststellung schädlicher Wirkungen von Prüfsubstanzen mit Hautsensibilisierungspotenzial verwendet werden, wenn Informationen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung benötigt werden, wie z.B. als Unterkategorisierung für die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen und das Global Harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

3. Die verwendeten Begriffsbestimmungen sind in Anlage 2 aufgeführt.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. Mit dem LLNA steht eine alternative Methode zum Nachweis von Chemikalien mit potenziell hautsensibilisierenden Eigenschaften zur Verfügung. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass der LLNA zwingend in jedem Fall anstelle der Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13) eingesetzt werden muss. Vielmehr erweist sich der Test als gleichermaßen verdienstvoll und kann als Alternative gewählt werden, bei der im Allgemeinen keine weitere Bestätigung von positiven wie auch negativen Ergebnissen erforderlich ist. Das Prüflabor sollte vor der Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz auswerten und berücksichtigen. Zu diesen Informationen zählen die Identität und die chemische Struktur der Prüfsubstanz, ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, die Ergebnisse aller sonstigen *in vitro*- oder *in vivo*-Toxizitätsprüfungen der Prüfsubstanz sowie toxikologische Daten zu strukturell verwandten Chemikalien. Diese Informationen sind zu berücksichtigen, um die Eignung des LLNA für die jeweilige Substanz festzustellen (bestimmte chemische Stoffe sind mit dem LLNA nicht kompatibel - siehe Absatz 5) und die Festlegung der Dosis zu erleichtern.
5. Beim LLNA handelt es sich um eine *in vivo*-Methode. Das bedeutet, dass die kontaktsensibilisierenden Eigenschaften weiterhin an Tieren bewertet werden. Der Test erlaubt es jedoch, die Anzahl der für diesen Zweck benötigten Tiere zu reduzieren. Es kommt hinzu, dass der LLNA eine substanzielle Verfeinerung (weniger Schmerzen und Leiden) im Hinblick auf die Behandlung der Versuchstiere bei Tests auf allergische Kontaktsensibilisierung darstellt. Der LLNA beruht auf der Bewertung immunologischer Reaktionen, die während der Induktionsphase der Sensibilisierung durch chemische Stoffe ausgelöst werden. Anders als die Tests an Meerschweinchen (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13), erfordert der LLNA nicht, dass provozierte Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut ausgelöst werden. Außerdem wird beim LLNA, anders als beim Meerschweinchen-Maximierungstest, auf den Einsatz eines Adjuvans verzichtet (13). Daher erleiden die Tiere beim LLNA weniger Schmerzen und Qualen. Trotz der Vorteile, die der LLNA gegenüber B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 aufweist, sollte nicht verkannt werden, dass er mit gewissen Einschränkungen behaftet ist, die die Anwendung von Kapitel B.6 oder OECD-Prüfrichtlinie 406 (13) erforderlich machen können (z. B. falsch negative Ergebnisse des LLNA bei bestimmten Metallen, falsch positive Ergebnisse bei bestimmten hautreizenden Stoffen [wie etwa bei tensidähnlichen Chemikalien] (19) (20), oder Löslichkeit der Prüfsubstanz). Zudem können chemische Klassen oder Substanzen mit

Funktionsgruppen, die erwiesenermaßen als potenzielle Verwechslungsfaktoren wirken können, (21) den Einsatz von Meerschweinchen-Tests erforderlich machen (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13). Angesichts der begrenzten Validierungsdaten, die im Wesentlichen auf Pestizidformulierungen beruhen, ist die Wahrscheinlichkeit positiver Ergebnisse für diese Art von Prüfsubstanzen beim LLNA größer als beim Meerschweinchen-Test (22). Bei der Prüfung von Formulierungen könnte man jedoch in Erwägung ziehen, ähnliche Stoffe mit bekannten Ergebnissen als Vergleichssubstanzen einzuschließen, um das ordnungsgemäße Funktionieren des LLNA nachzuweisen (siehe Absatz 16). Abgesehen von diesen bekannten Beschränkungen dürfte der LLNA für die Prüfung aller Substanzen geeignet sein, sofern mit diesen Substanzen keine Eigenschaften verbunden sind, die die Genauigkeit des LLNA beeinträchtigen könnten.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

6. Der LLNA beruht auf dem Prinzip, dass sensibilisierende Stoffe eine Lymphozytenproliferation in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation des chemischen Stoffes induzieren. Diese Proliferation verläuft proportional zur Dosis und zur Wirksamkeit des applizierten Allergens und bietet sich als einfache Möglichkeit an, eine quantitative Messung der Sensibilisierung zu erhalten. Die Proliferation wird gemessen, indem man die mittlere Proliferation jeder Prüfgruppe mit der mittleren Proliferation der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe (VK) vergleicht. Das Verhältnis der mittleren Proliferation in jeder Behandlungsgruppe zu dem in der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe, auch als Stimulationsindex (SI) bezeichnet, wird festgelegt und sollte ≥ 3 betragen, ehe eine Prüfsubstanz als potenzieller Hautsensibilisator klassifiziert wird. Die hier beschriebenen Methoden beruhen auf der Nutzung der radioaktiven *in vivo*-Markierung zur Messung einer erhöhten Anzahl proliferierender Zellen in den drainierenden aurikulären Lymphknoten. Allerdings kann man sich bei der Bewertung der Anzahl proliferierender Zellen auch auf andere Endpunkte stützen, sofern die Leistungsstandards vollständig eingehalten werden (Anlage 1).

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Auswahl von Versuchstierarten

7. Für diesen Test ist die Maus die Spezies der Wahl. Es werden junge ausgewachsene weibliche Mäuse (CBA/Ca- oder CBA/J-Stamm) verwendet, die weder geworfen haben noch trächtig sind. Bei Versuchsbeginn sollten die Tiere 8-12 Wochen alt sein; die Gewichtsunterschiede sollten minimal sein und 20 % des mittleren Gewichts nicht übersteigen. Alternativ können Tests an anderen Stämmen und männlichen Tieren erfolgen, wenn genügend Daten vorliegen, die beweisen, dass keine signifikanten stamm- und/oder geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Reaktion auf den LLNA bestehen.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

8. Mäuse sollten in Gruppen gehalten werden (23), wenn nicht relevante wissenschaftliche Argumente eine Einzelhaltung nahelegen. Die Temperatur im Versuchsräum sollte 22 ± 3 °C betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und zu anderen Zeiten als während der Reinigung

vorzugsweise nicht über 70 % liegen soll, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

Vorbereitung der Tiere

9. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung gekennzeichnet (aber nicht am Ohr) und vor Beginn der Dosierung für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Vor Behandlungsbeginn werden alle Tiere auf sichtbare Hautverletzungen untersucht.

Vorbereitung der Dosierlösungen

10. Feste Chemikalien sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in Lösungsmitteln/Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Chemikalien können direkt appliziert oder zuvor verdünnt werden. Unlösliche Chemikalien, wie sie in der Regel in Medizinprodukten vorliegen, sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in einem geeigneten Lösungsmittel einer übermäßigen Extraktion unterzogen werden, um alle extrahierbaren Inhaltsstoffe vor der Prüfung sichtbar zu machen. Die Prüfsubstanzen sollten täglich zubereitet werden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

11. Anhand von positiven Kontrollchemikalien wird die ordnungsgemäße Leistung des Tests nachgewiesen. Hierzu ist eine angemessene und reproduzierbare Empfindlichkeit der Reaktion auf eine sensibilisierende Prüfsubstanz erforderlich, wobei das Reaktionsausmaß genau zu charakterisieren ist. Es wird die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrolle empfohlen, da diese die Fähigkeit des Labors belegt, jeden Test erfolgreich durchzuführen und eine Bewertung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors ermöglicht. Eine Positivkontrolle für jede Studie wird auch von einigen Regulierungsbehörden vorgeschrieben. Daher wird Benutzern empfohlen, vor Durchführung des LLNA die zuständigen Behörden zu konsultieren. Dementsprechend wird die routinemäßige Verwendung einer gleichzeitigen Positivkontrolle angeraten, um die Notwendigkeit zusätzlicher Tierversuche zur Erfüllung von Anforderungen, die aus der Verwendung einer nur periodischen Positivkontrolle resultieren könnten, zu vermeiden (siehe Absatz 12). Die Positivkontrolle sollte eine positive Reaktion auf den LLNA bei einem Expositionsniveau hervorrufen, das einen Anstieg des Stimulationsindex ($I > 3$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe) bewirkt. Die positive Kontrolldosis soll so gewählt werden, dass sie keine übermäßige Hautreizung oder systemische Toxizität verursacht und die Induktion reproduzierbar, aber nicht exzessiv ist (*d. h.* ein SI > 20 wäre exzessiv). Bevorzugte positive Kontrollstoffe sind 25 % Hexylcinnaminaldehyd (Chemical Abstracts Service [CAS]-Nr. 101-86-0) in Aceton: Olivenöl (4:1, v/v) und 5 % Mercaptobenzothiazol (CAS-Nr. 149-30-4) in *N,N*-Dimethylformamid (siehe Anhang 1, Tabelle 1). Unter bestimmten Umständen können in ausreichend begründeten Fällen andere Kontrollsubstanzen eingesetzt werden, die den genannten Kriterien entsprechen.

12. Obwohl die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrollgruppe empfohlen wird, können in gewissen Situationen periodische Prüfungen (*d. h.* in Abständen \leq 6 Monaten) der Positivkontrolle für Labors ausreichen, die den LLNA regelmäßig (*d. h.* mindestens einmal pro Monat) durchführen und über eine etablierte historische Kontrolldatenbasis verfügen, die die Fähigkeit des Labors bestätigt, reproduzierbare und genaue Ergebnisse mit Positivkontrollen zu erzielen. Eine angemessene Beherrschung des LLNA kann erfolgreich nachgewiesen werden, indem durchgehend positive Ergebnisse mit der Positivkontrolle in mindestens 10 unabhängigen Prüfungen erzielt werden, die innerhalb eines angemessenen Zeitraums (*d. h.* in weniger als einem Jahr) durchgeführt wurden.
13. Eine gleichzeitige Positivkontrollgruppe sollte immer einbezogen werden, wenn Verfahrensänderungen im LLNA auftreten (*z. B.* Wechsel des geschulten Personals, Änderung der Prüfmethoden, -materialien und/oder Reagenzien, Änderung der Prüfgeräte, Änderung der Herkunft der Versuchstiere). Solche Änderungen sollten in Laborberichten dokumentiert werden. Ferner ist der Einfluss dieser Änderungen auf die Aussagefähigkeit der zuvor eingerichteten historischen Datenbank zu bedenken. Dabei sollte die Notwendigkeit überdacht werden, eine neue historische Datenbank einzurichten, um die gleichbleibende Qualität der positiven Kontrollergebnisse zu dokumentieren.
14. Die Prüfer sollten sich der Tatsache bewusst sein, dass die Entscheidung, eine PK-Studie periodisch statt gleichzeitig durchzuführen, Auswirkungen auf die Aussagefähigkeit und Akzeptanz negativer Studienergebnisse haben kann, die ohne gleichzeitige Positivkontrolle im Zeitraum zwischen den einzelnen periodischen PK-Studien auftreten können. Wenn zum Beispiel ein falsch negatives Ergebnis in der periodischen PK-Studie auftritt, können negative Ergebnisse für die Prüfsubstanz, die in dem Zeitraum zwischen der letzten akzeptablen periodischen PK-Studie und der inakzeptablen periodischen PK-Studie aufgetreten waren, in Frage gestellt werden. Die Auswirkungen solcher Ergebnisse sollten sorgfältig bedacht werden, wenn entschieden wird, ob gleichzeitige oder nur periodische PKs durchgeführt werden sollen. Auch ist die Verwendung einer geringeren Anzahl an Versuchstieren bei der gleichzeitigen PK-Gruppe zu bedenken, wenn dies wissenschaftlich zu begründen ist und wenn das Labor auf der Grundlage laborspezifischer historischer Daten nachweist, dass eine geringere Anzahl an Mäusen ausreicht (12).
15. Obwohl die Positivkontrolle in dem Vehikel geprüft werden sollte, von dem bekannt ist, dass es eine gleichbleibende Reaktion hervorruft (*z. B.* Aceton: Olivenöl; 4:1, v/v), können in bestimmten Rechtssituationen auch Prüfungen in einem Nichtstandard-Vehikel (klinisch/chemisch relevante Formulierung) erforderlich sein (24). Wenn die gleichzeitige Positivkontrolle in einem anderen Vehikel als der Prüfsubstanz getestet wird, sollte eine gesonderte Vehikelkontrolle für die PK einbezogen werden.
16. In Fällen, in denen Prüfsubstanzen einer bestimmten chemischen Klasse oder eine Reihe von Reaktionen bewertet werden, können Vergleichssubstanzen nützlich sein, um nachzuweisen, dass die Prüfmethode zur Feststellung des Hautsensibilisierungspotenzials dieser Art von Substanzen ordnungsgemäß funktioniert. Geeignete Vergleichssubstanzen sollten die folgenden Eigenschaften haben:
 - strukturelle und funktionale Ähnlichkeit mit der Klasse der getesteten Prüfsubstanz;

- bekannte physikalische/chemische Eigenschaften;
- zugrunde liegende Daten aus dem LLNA;
- zugrunde liegende Daten aus anderen Tiermodellen und/oder von Menschen.

TESTVERFAHREN

Anzahl der Versuchstiere und Dosierungen

17. Mindestens vier Tiere pro Dosisgruppe mit jeweils mindestens drei Konzentrationen der Prüfsubstanz werden benötigt; zusätzlich braucht man eine Negativkontrollgruppe, die nur mit dem Vehikel für die Prüfsubstanz behandelt wird, sowie eine Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums, auf der Grundlage der Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15). Tests mit Mehrfachdosen der PK sollten in Erwägung gezogen werden, insbesondere wenn die Positivkontrolle intermittierend getestet wird. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.
18. Die Auswahl der Dosis und des Vehikels soll anhand der Empfehlungen in (3) (5) erfolgen. Für aufeinanderfolgende Dosierungen werden normalerweise geeignete abgestufte Konzentrationen gewählt, wie z. B. 100 %, 50%, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % usw. Die Auswahl der Konzentrationsfolge sollte angemessen wissenschaftlich begründet werden. Alle vorhandenen toxikologischen Angaben (z. B. über die akute Toxizität und Hautreizung) sowie strukturelle und physiochemische Angaben zu der jeweiligen Prüfsubstanz (und/oder strukturverwandten Substanzen) sollten bei der Festlegung von drei aufeinander folgenden Konzentrationen berücksichtigt werden, so dass bei der höchsten Konzentration einerseits die Exposition maximiert und andererseits eine systemische Toxizität und/oder eine übermäßige lokale Hautreizung ausgeschlossen werden (3) (25). Mangels solcher Informationen kann ein anfänglicher Dosisfindungstest erforderlich sein (siehe Absätze 21-24).
19. Das Vehikel sollte das Testergebnis nicht beeinflussen oder beeinträchtigen und sollte so gewählt werden, dass die Löslichkeit zur Erzielung einer möglichst hohen Konzentration maximiert und gleichzeitig eine für das Applizieren der Prüfsubstanz geeignete Lösung/Suspension hergestellt werden kann. Empfohlene Vehikel sind Aceton: Olivenöl (4:1, v/v), N,N-Dimethylformamid, Methylethylketon, Propylenglykol und Dimethylsulphoxid (19), wobei mit hinreichender wissenschaftlicher Begründung auch andere Vehikel verwendet werden können. Unter bestimmten Umständen muss ein klinisch relevantes Lösungsmittel oder die handelsübliche Zubereitung, in der die Prüfsubstanz vermarktet wird, als zusätzliche Kontrolle genutzt werden. Besondere Sorgfalt sollte darauf verwendet werden, zu gewährleisten, dass in das Vehikelsystem durch die Verwendung geeigneter Lösungsvermittler (z. B. 1 % Pluronic® L92) hydrophile Stoffe eingearbeitet werden, die die Haut befeuchten und nicht sofort ablaufen. Folglich sind vollständig wässrige Vehikel zu vermeiden.
20. Die Arbeit an Lymphknoten einzelner Mäuse ermöglicht die Bewertung der Variabilität von Tieren sowie einen statistischen Vergleich zwischen der Prüfsubstanz

und Messungen an der Vehikelkontrollgruppe (siehe Absatz 35). Zudem besteht eine realistische Möglichkeit, die Anzahl der Mäuse in der Positivkontrollgruppe zu verringern, wenn Einzeltierdaten erhoben werden (12). Außerdem verlangen einige Regulierungsbehörden die Erhebung von Daten einzelner Tiere. Dennoch werden gepoolte Tierdaten von einigen Regulierungsbehörden als akzeptabel erachtet. In dieser Situation können Benutzer wahlweise einzelne oder gepoolte Tierdaten verwenden.

Dosisfindungstest

21. Wenn über die höchst mögliche Dosierung keine Informationen vorliegen (siehe Absatz 18), sollte ein Dosisfindungstest durchgeführt werden, um die geeignete Dosierung für den LLNA festzulegen. Der Dosisfindungstest soll eine Orientierung bei der Auswahl der höchst möglichen Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA in Fällen liefern, in denen keine Informationen über Konzentrationen vorliegen, die zur systemischen Toxizität (siehe Absatz 24) und/oder zu übermäßiger Hautreizung führen (siehe Absatz 23). Die höchsten geprüften Dosisstufen sollten 100 % der Prüfsubstanz bei Flüssigkeiten bzw. die höchst möglichen Konzentrationen bei Feststoffen oder Suspensionen sein.
22. Der Dosisfindungstest wird unter Bedingungen durchgeführt, die denen der Hauptstudie des LLNA genau entsprechen. Allerdings gibt es hier keine Bewertung der Lymphknotenproliferation und es können nicht so viele Tiere pro Dosisgruppe eingesetzt werden. Es werden ein oder zwei Tiere pro Dosisgruppe empfohlen. Alle Mäuse werden täglich auf klinische Zeichen für systemische Toxizität oder lokale Reizungen an der Applikationsstelle untersucht. Das Körpergewicht wird vor dem Test und vor dem Abschluss (Tag 6) protokolliert. Beide Ohren jeder Maus werden auf Anzeichen für Erytheme untersucht und mit Hilfe von Tabelle 1 bewertet (25). Die Ohrdicke wird mit Hilfe eines Ohrdickenmessgeräts (z. B. digitaler Mikrometer oder Peacock Dickenmessuhr) an Tag 1 (Vordosis), Tag 3 (ca. 48 Stunden nach der ersten Dosis) und Tag 6 bestimmt. Zusätzlich kann an Tag 6 die Ohrdicke durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben ermittelt werden. Dies sollte nach der tierschutzgerechten Tötung der Tiere erfolgen. Eine übermäßige lokale Hautreizung wird durch eine Erythem-Punktzahl von ≥ 3 und/oder eine Zunahme der Ohrdicke von $\geq 25\%$ an jedem beliebigen Messtag angezeigt (26) (27). Als höchste Dosis für die Hauptuntersuchung des LLNA wird die nächst niedrigere Dosis in der Konzentrationsreihe des Dosisfindungstests gewählt (siehe Absatz 18), die keine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung verursacht.

Tabelle 1: Erythem-Klassifizierung

Beobachtung	Punktzahl
Kein Erythem	0
Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar)	1
Klar abgegrenztes Erythem	2
Mäßig bis ausgeprägtes Erythem	3
Schweres Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist	4

23. Zusätzlich zu einer Zunahme der Ohrdicke um 25 % (26) (27) wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Ohrdicke bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zugrunde gelegt, um Reizstoffe in dem LLNA zu identifizieren (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Obwohl ein statistisch signifikanter Anstieg der Ohrdicke von weniger als 25 % auftreten kann, konnte kein spezifischer Zusammenhang mit einer übermäßigen Hautreizung festgestellt werden (30) (32) (33) (34).
24. Die folgenden klinischen Beobachtungen können, sofern sie Bestandteil einer Gesamtbewertung sind, auf systemische Toxizität hinweisen (35) (36) und somit die höchst mögliche Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA anzeigen: Änderungen der Funktionen des Nervensystems (z. B. Piloerektion, Ataxie, Tremor und Krämpfe); Verhaltensänderungen (z. B. Aggressivität, Änderungen bei der Fellpflege, auffallende Änderung des Aktivitätsniveaus); Änderungen des Atemmusters (d. h. Änderung der Häufigkeit und Intensität des Atmens wie Dyspnoe, Keuchen, rasselnder Atem) sowie Änderungen der Futter- und Wasseraufnahme. Zusätzlich sollten Anzeichen von Lethargie und/oder Teilnahmslosigkeit sowie alle klinischen Anzeichen für mehr als leichte oder momentane Schmerzen und Qual, eine Gewichtsreduktion von >5 % zwischen Tag 1 und Tag 6 und die Sterblichkeit in der Bewertung berücksichtigt werden. Moribunde Tiere oder Tiere, die Anzeichen starker und andauernder Qualen zeigen, sollten tierschutzgerecht getötet werden (37).

Versuchsplan der Hauptuntersuchung

25. Der Versuchsplan des Tests ist wie folgt:

- Tag 1:

Jedes Tier wird einzeln gekennzeichnet und das Gewicht sowie jede klinische Beobachtung werden protokolliert. Es werden 25 µL der Prüfsubstanz in der geeigneten Verdünnung, des Vehikels allein oder der Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums gemäß den Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15) auf die Rückseite jedes Ohrs appliziert.

- Tage 2 und 3:

Die am Tag 1 durchgeführte Applikationsprozedur wird wiederholt.

- Tage 4 und 5:

Keine Behandlung.

- Tag 6:

Das Gewicht jedes Tiers wird protokolliert. Es werden 250 µL sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) von tritiertem (^3H)-Methylthymidin in die Schwanzvenen aller Mäuse in den Prüf- und Kontrollgruppen injiziert. Alternativ dazu können 250 µL sterile PBS mit 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) von ^{125}I -Ioddeoxyuridin und 10^{-5}M Fluorodeoxyuridin in die Schwanzvenen aller Mäuse injiziert werden. Fünf Stunden (5 h) später werden die Tiere tierschutzgerecht getötet. Die drainierenden aurikulären Lymphknoten jedes Mäuseohrs werden entfernt und für jedes Tier in PBS

gepoolt (Einzeltiermethode); alternativ hierzu können auch die Lymphknoten jedes Ohrs entfernt und für jede der Versuchsgruppen in PBS gepoolt werden (Methode der gepoolten Behandlungsgruppe). Einzelheiten und Diagramme der Lymphknotenidentifikation und -entfernung sind unter Referenz (12) aufgeführt. Zur weiteren Kontrolle der lokalen Hautreaktion in der Hauptuntersuchung können zusätzliche Parameter wie die Auswertung des Ohr-Erythems oder Ohrdickemessungen (mittels eines Dickenmessgeräts oder durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben bei der Nekropsie) in das Untersuchungsprotokoll aufgenommen werden.

Vorbereitung der Zellsuspensionen

26. Aus den Lymphzellenknoten (LNC), die mittels der Einzeltiermethode oder mittels der Methode der gepoolten Behandlungsgruppe paarweise entnommen wurden, wird durch vorsichtigen mechanischen Aufschluss in einem EdelstahlfILTER mit einer Maschenweite von 200 Mikron oder mittels einer anderen geeigneten Technik eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die LNC werden zweimal mit einem Überschuss an PBS gewaschen und die DNA wird bei 4°C 18 Stunden lang mit 5 %iger Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt (3). Die Pellets werden entweder in 1 mL TCA resuspendiert und in Szintillationsfläschchen eingetragen, die 10 mL einer Szintillationsflüssigkeit für die ^3H -Zählung enthalten, oder direkt in Gammazähler zur ^{125}I -Bestimmung überführt.

Bestimmung der Zellproliferation (der aufgenommenen Radioaktivität)

27. Die Aufnahme von ^3H -Methylthymidin wird mittels β -Szintillationszählung als Zerfallsereignisse pro Minute (disintegrations per minute; DPM) gemessen. Die Aufnahme von ^{125}I -Ioddeoxyuridin wird mittels ^{125}I -Zählung bestimmt und ebenfalls als DPM angegeben. In Abhängigkeit von der genutzten Methode wird die Aufnahme als DPM/Maus (Einzeltiermethode) oder als DPM/Behandlungsgruppe (Methode der gepoolten Behandlungsgruppe) angegeben.

Reduzierter LLNA

28. In gewissen Situationen, in denen aufgrund von Rechtsvorschriften lediglich die Bestätigung einer negativen Prädiktion über das Hautsensibilisierungspotenzial gefordert ist, kann ein optionales rLLNA-Protokoll (16) (17) (18) mit weniger Versuchstieren verwendet werden, vorausgesetzt dass alle anderen Protokollspezifikationen für den LLNA in dieser Prüfmethode eingehalten werden. Vor Einsatz des rLLNA sollten entsprechende Erläuterungen und eine wissenschaftliche Begründung für seine Verwendung vorgelegt werden. Sollte ein positives oder nicht eindeutiges Ergebnis erzielt werden, können weitere Tests erforderlich sein, um diese Daten zu deuten oder zu klären.
29. Die zahlenmäßige Reduktion in den Dosisgruppen ist der einzige Unterschied zwischen den Prüfmethodenprotokollen des LLNA und des rLLNA. Aus diesem Grund liefert der rLLNA keine Informationen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung. Der rLLNA sollte folglich nicht eingesetzt werden, wenn Informationen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung benötigt werden. Ebenso wie im Multidosis-LLNA sollte die im rLLNA bewertete Konzentration der Prüfsubstanz die höchst mögliche Konzentration sein, die keine offensichtliche systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus verursacht (siehe Absatz 18).

BEOBACHTUNGEN

Klinische Beobachtungen

30. Jede Maus sollte mindestens einmal täglich sorgfältig auf klinische Zeichen, d. h. lokale Reizung an der Applikationsstelle, oder auf systemische Toxizität untersucht werden. Alle Beobachtungen werden systematisch in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Die Überwachungspläne sollten Kriterien beinhalten, anhand derer Mäuse mit systemischer Toxizität, übermäßiger lokaler Hautreizung oder Hautverätzung schnell zu Zwecken der schmerzlosen Tötung identifiziert werden können (37).

Körpergewicht

31. In Abschnitt 25 wurde bereits ausgeführt, dass das Körpergewicht der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der tierschutzgerechten Tötung der Tiere laut Versuchsplan festgestellt werden soll.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

32. Die Ergebnisse für jede Behandlungsgruppe werden als Stimulationsindex (SI) angegeben. Bei Einsatz der Einzeltiermethode erhält man den SI durch Teilen der mittleren DPM pro Maus innerhalb jeder Prüfgruppe und der Positivkontrollgruppe durch die mittleren DPM pro Maus für die Lösungsmittel/Vehikelkontrollgruppe. Der durchschnittliche SI beträgt demnach für die mit Vehikel behandelten Kontrollen 1. Bei Einsatz der Methode der gepoolten Behandlungsgruppe erhält man den SI, indem die für jede Behandlungsgruppe ermittelte Gesamtaufnahme an Radioaktivität durch die Aufnahme in der gepoolten Vehikelkontrollgruppe dividiert wird; hieraus ergibt sich der mittlere SI.
33. In dem Entscheidungsprozess gilt ein Ergebnis als positiv, wenn der $SI \geq 3$ ist. Die Stärke der Dosis-Wirkung, die statistische Signifikanz und die gleichbleibende Qualität der Lösungsmittel-/Vehikel-Reaktion sowie der Reaktion der Positivkontrolle können aber auch benutzt werden, um festzulegen, ob ein Grenzergebnis als positiv bezeichnet werden soll (4) (5) (6).
34. Sofern Klärungsbedarf in Bezug auf die Ergebnisse besteht, sollten die verschiedenen Eigenschaften der Prüfsubstanz beachtet werden, wobei es unter anderem zu klären gilt, ob ein struktureller Zusammenhang mit bekannten Hautsensibilisatoren besteht, ob sie eine übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus hervorruft und wie die festgestellte Art der Reaktion bezüglich der Dosis ist. Diese und weitere Aspekte werden an anderer Stelle ausführlich erörtert (7).
35. Werden die Daten zur Radioaktivität für jede einzelne Maus erhoben, kann eine statistische Analyse zu Vorhandensein und Grad des Dosis-Wirkungs-Verhältnisses in den Daten durchgeführt werden. Jede statistische Auswertung könnte eine Bewertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie geeignete Testgruppen-Vergleiche beinhalten (z. B. Gruppe mit paarweiser Dosierung gegen gleichzeitige Vehikelkontrollgruppe). Die statistischen Analysen könnten z. B. die lineare Regression, den Williams-Test zur Bewertung von Dosis-Wirkungs-Trends oder den Dunnett-Test für paarweise Vergleiche beinhalten. Bei der Auswahl einer geeigneten Methode für die statistische

Analyse sollte sich der Prüfer möglicher ungleicher Varianzen und anderer damit zusammenhängender Probleme stets bewusst sein, denn diese erfordern unter Umständen eine Datentransformation oder ein nicht-parametrisches statistisches Verfahren. Auf jeden Fall muss der Prüfer unter Umständen SI-Berechnungen und statistische Analysen mit und ohne bestimmte Datenpunkte (manchmal als „Ausreißer“ bezeichnet) vornehmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

36. Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Bei Einsatz der Einzeltiermethode sollten sie die DPM-Einzelwerte, die mittleren DPM-Gruppenwerte pro Tier, die damit verbundene Fehlervariable (z. B. SD, SEM) und den mittleren SI für jede Dosisgruppe, verglichen mit der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe angeben. Bei Einsatz der Methode der gepoolten Behandlungsgruppe werden die mittleren/medianen DPM und der mittlere SI für jede Dosisgruppe mit der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe verglichen.

Prüfbericht

37. Der Testbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüf- und Kontrollsubstanzen:

- Angaben zur Identität (z. B. CAS-Nummer und EG-Nummer, falls vorhanden; Bezugsquelle; Reinheit; bekannte Verunreinigungen; Chargennummer);
- physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Flüchtigkeit, Stabilität, Löslichkeit);
- bei Mischungen Zusammensetzung und relative Anteile der Bestandteile in Prozent;

Lösungsmittel/Vehikel:

- Angaben zur Identität (Reinheit, Konzentration, gegebenenfalls verwendete Mengen);
- Begründung für die Wahl des Vehikels;

Versuchstiere:

- Herkunft der CBA-Mäuse;
- mikrobiologischer Status der Tiere, soweit bekannt;
- Anzahl und Alter der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

Prüfbedingungen:

- Angaben zur Vorbereitung und Applikation der Prüfsubstanz;
- Begründung der gewählten Dosierung (mit Ergebnissen des eventuell durchgeführten Dosisfindungstests);
- verwendete Konzentrationen des Vehikels und der Prüfsubstanz sowie Gesamtmenge der applizierten Prüfsubstanz;

- Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle);
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv oder negativ;
- Einzelheiten zu eventuellen Protokollabweichungen und eine Erklärung dazu, wie sich diese Abweichung auf Prüfdesign und Ergebnisse auswirkt.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

- Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der letzten Überprüfung der Zuverlässigkeit mit Angaben zu verwendeten Prüfsubstanzen, Konzentration und Vehikel;
- gleichzeitige und/oder historische PK und gleichzeitige Daten zur NK für das Prüflabor;
- wenn keine gleichzeitige PK eingeschlossen war, Datum und Laborbericht über die jüngste periodische PK sowie ein Bericht mit ausführlichen Angaben über die historischen positiven Kontrolldaten des Labors mit Angabe der Gründe, warum keine gleichzeitige PK durchgeführt wurde;

Ergebnisse:

- Gewicht der einzelnen Tiere bei Beginn der Prüfung und zum Zeitpunkt der Tötung laut Versuchsplan, sowie mittlere und zugehörige Fehlervariable (z. B. SD, SEM) für jede Behandlungsgruppe;
- Beginn und zeitlicher Verlauf der toxischen Erscheinungen für jedes Tier, einschließlich gegebenenfalls Hautreizungen an der Stelle der Verabreichung;
- Eine Tabelle für jede einzelne Maus (Einzeltiermethode) oder mittlere/medianen DPM-Werte (Methode der gepoolten Behandlungsgruppe) sowie SI-Werte für jede Behandlungsgruppe.
- mittlere verbundene Fehlervariable (z. B. SD, SEM) für DPM/Maus für jede Behandlungsgruppe sowie die Ergebnisse der Ausreißer-Analyse für jede Behandlungsgruppe bei Einsatz der Einzeltiermethode.
- berechneter SI und geeignete Messung der Variabilität, welche die Variabilität der Tiere sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe berücksichtigt, sofern die Einzeltiermethode benutzt wird;
- Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- gegebenenfalls statistische Analysen.

Diskussion der Ergebnisse:

- Kurze Auswertung der Ergebnisse, der Dosis-Wirkungs-Beziehung und gegebenenfalls statistische Analysen mit Schlussfolgerungen zur Frage, ob die Prüfsubstanz als Hautsensibilisator eingestuft werden soll.

LITERATUR

- (1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.
- (3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- (8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (9) Dean, J.H., Twardok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258-273.
- (10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274-286.
- (11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249-257.
- (12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

- (13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.
- (16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.
- (17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]
- (18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

- (22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Abrufbar unter: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/>]
- (23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1,100.html]
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>]
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Abrufbar unter: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm
- (37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Anlage 1

LEISTUNGSSTANDARDS FÜR DIE BEWERTUNG VORGESCHLAGENER ÄHNLICHER ODER MODIFIZIERTER LLNA-PRÜFMETHODEN ZUR EINSCHÄTZUNG DER HAUTSENSIBILISIERUNG

EINLEITUNG

1. Ziel der Leistungsstandards (Performance Standards; PS) ist es, die Grundlage zu vermitteln, auf der neue Prüfmethoden, seien diese geschützt (d. h. per Urheberrecht, Handelsmarken, eingetragene Marken) oder nicht geschützt, als ausreichend genau und zuverlässig für spezifische Prüfzwecke beurteilt werden können. Diese auf validierten und akzeptierten Prüfmethoden basierenden Leistungsstandards können auch verwendet werden, um die Zuverlässigkeit und Genauigkeit anderer vergleichbarer Methoden (umgangssprachlich als „Me-too“-Tests bezeichnet) zu bewerten, die auf ähnlichen wissenschaftlichen Prinzipien beruhen und denselben biologischen oder toxischen Effekt messen oder vorhersagen (14).
2. Vor der Annahme modifizierter Methoden (d. h. vorgeschlagener potenzieller Verbesserungen einer genehmigten Prüfmethode) sollte eine Bewertung erfolgen, um die Auswirkung der vorgeschlagenen Änderungen auf die Leistung des Tests und das Maß zu bewerten, in dem eine solche Änderung die verfügbare Information für andere Elemente des Validierungsprozesses beeinflusst. Je nach Anzahl und Art der vorgeschlagenen Änderungen, den generierten Daten und der Begleitdokumentation für diese Änderungen, sollten sie entweder dem für neue Tests beschriebenen Validierungsprozess, oder - gegebenenfalls - einer begrenzten Zuverlässigskeits- und Relevanzprüfung nach etablierten Leistungsstandards unterzogen werden (14).
3. Vorgeschlagene vergleichbare oder modifizierte Methoden zur Verwendung nach der vorliegenden Prüfmethode sollten anhand von Chemikalien, die die volle Bandbreite der LLNA-Punktzahlen repräsentieren, auf ihre Zuverlässigkeit und Genauigkeit untersucht werden. Um den ungerechtfertigten Einsatz von Tieren zu vermeiden, wird Modell-Entwicklern nachdrücklich empfohlen, sich vor Beginn der Validierungsstudien in Übereinstimmung mit den in dieser Prüfmethode niedergelegten Leistungsstandards und Leitlinien an die zuständigen Behörden zu wenden.
4. Diese Leistungsstandards beruhen auf den US-ICCVAM, EC-ECVAM sowie den harmonisierten japanischen Leistungsstandards JaCVAM (12) und können zur Bewertung der Validität vergleichbarer oder modifizierter Versionen des LLNA herangezogen werden. Diese Leistungsstandards umfassen die wesentlichen Elemente der Prüfmethoden, empfohlene Referenzsubstanzen und die Standards für Genauigkeit und Zuverlässigkeit, welche die vorgeschlagene Methode erfüllen oder übertreffen sollten.

I. Wesentliche Elemente der Prüfmethode

5. Um sicherzustellen, dass eine vergleichbare oder modifizierte LLNA-Methode dem LLNA funktionell und mechanistisch entspricht und dass sie dieselben biologischen Wirkungen misst, sollten die folgenden Elemente in das Protokoll der Prüfmethode aufgenommen werden:
- Die Prüfsubstanz sollte topisch an beiden Mäuseohren appliziert werden.
 - Die Lymphozytenproliferation sollte in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation der Prüfsubstanz gemessen werden.
 - Die Lymphozytenproliferation sollte während der Induktionsphase der Hautsensibilisierung gemessen werden.
 - Bei Prüfsubstanzen sollte die gewählte Höchstdosis die höchst mögliche Konzentration sein, die keine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus verursacht. Bei positiven Referenzsubstanzen sollte die höchste Dosis mindestens so hoch sein wie die LLNA EC3-Werte der entsprechenden Referenzsubstanzen (siehe Tabelle 1), ohne dass eine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus verursacht wird.
 - In jede Studie sollte eine gleichzeitige Vehikelkontrolle aufgenommen werden, sowie gegebenenfalls eine gleichzeitige Positivkontrolle.
 - Es sollten mindestens vier Tiere pro Dosisgruppe verwendet werden.
 - Es können entweder Einzeltierdaten oder gepoolte Daten verwendet werden.

Ist eines dieser Kriterien nicht erfüllt, können diese Leistungsstandards nicht zur Validierung der vergleichbaren oder modifizierten Methode verwendet werden.

II. Mindestliste der Referenzsubstanzen

6. Die US-ICCVAM, EC-ECVAM und die harmonisierten japanischen Leistungsstandards JaCVAM PS (12) geben 18 Mindest-Referenzsubstanzen an, die verwendet werden sollten, sowie vier wahlfreie in den Leistungsstandards des LLNA enthaltene Referenzsubstanzen (Substanzen, die im Vergleich zu den Ergebnissen von Tests am Menschen oder am Meerschweinchen (B.6, oder OECD-Prüfrichtlinie 406) (13) im LLNA entweder falsch positive oder falsch negative Ergebnisse hervorriefen und daher möglicherweise eine gleichwertige oder bessere Leistung als der LLNA nachweisen könnten). Die Auswahl dieser chemischen Stoffe erfolgte nach folgenden Kriterien:
- die Liste der Referenzsubstanzen enthielt die Typen von Stoffen, die üblicherweise auf ihr Hautsensibilisierungspotenzial untersucht werden sowie die ganze Bandbreite der Reaktionen, die mittels des LLNA gemessen oder vorhergesagt werden können;
 - die Substanzen hatten klar definierte chemische Strukturen;
 - für jede Substanz lagen LLNA-Daten aus Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13) und (soweit möglich) Daten aus Tests am Menschen vor und
 - die Substanzen waren problemlos im Handel erhältlich.

Die empfohlenen Referenzsubstanzen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Studien mit den vorgeschlagenen Referenzsubstanzen sollten in dem Vehikel bewertet werden, mit dem sie in Tabelle 1 aufgelistet sind. Sollte eine angegebene Substanz nicht verfügbar sein, können andere Substanzen, die die genannten Auswahlkriterien erfüllen, mit entsprechender Begründung verwendet werden.

TABELLE 1: EMPFOHLENE CHEMISCHE REFERENZSUBSTANZEN FÜR DIE LEISTUNGSSTANDARDS DES LLNA.

Nummer	Chemikalien ¹	CAS-Nr.	Form	Veh ²	EC3 % ³	N ⁴	0,5 x – 2,0 x EC3	Tatsächlicher EC3-Bereich	LLNA vs. GP	LLNA vs. Test am Menschen
1	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (CMI)/ 2-methyl-4-isothiazolin-3-on (MI) ⁵	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-Phenylenediamin	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cobalthlorid	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-Mercaptobenzothiazol	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Phenylbenzoat	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Zimtalkohol	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinylharnstoff	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Methylmethacrylat	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Chlorbenzol	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
15	Isopropanol	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+
16	Milchsäure	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	-/-	-/*
17	Methylsalicylat	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	-/-	-/-
18	Salicylsäure	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/-

Nummer	Chemikalien ¹	Wahlfreie Substanzen zum Nachweis einer verbesserten Leistung im Vergleich zum LLNA						Tatsächlicher EC3-Bereich	LLNA vs. GP	Test am Menschen
		CAS-Nr.	Form	Veh ²	EC3 % ³	N ⁴	0,5 x – 2,0 x EC3			
19	Natriumlaurylsulphat	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/-	+/-
20	Ethylenlykoldimethacrylat	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14-56	NC	+/-	+/+
21	Xylool	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/**	+/-
22	Nickelchlorid	7718-54-9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	-/+	-/+

Abkürzungen: AOO = Aceton; Olivenöl (4:1, v/v); CAS-Nr. = Chemical Abstracts Service Number; DMF = N,N-Dimethylformamid; DMSO = Dimethylsulfoxid; DNCB = 2,4-Dinitrochlorobenzol; EC3 = geschätzte Konzentration, die zur Erzeugung des Stimulationsindex von 3 benötigt wird; GP = Ergebnis des Meerschweinchentests (B. 6 oder OECD-Prüfrichtlinie 406) (13); HCA = Hexylcinnaminaldehyd; Liq = flüssig; LLNA = Ergebnis des lokalen Lymphknotentests an der Maus (B. 42 oder OECD-Prüfrichtlinie 429) (1); MEK = Methylethyleketon; NA = nicht zutreffend, da Stimulationsindex <3; NC = nicht berechnet, da Daten aus Einzelstudie stammen; Sol = fest; Veh = Testvehikel.

¹ Die Prüfsubstanzen sollten täglich zubereitet werden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

² Aufgrund der potenziellen Beeinträchtigung der Leistung des LLNA durch die Verwendung abweichender Vehikel sollte stets das empfohlene Vehikel für jede Referenzsubstanz verwendet werden (24) (32).

³ Mittelwert wenn mehr als ein EC3-Wert vorlag. Bei negativen Substanzen (*d. h.* mit einem Stimulationsindex <3) wird die höchste getestete Konzentration angegeben.

⁴ Zahl der LLNA-Studien, von denen Daten vorliegen.

⁵ Im Handel als Kathon CG (CAS-Nr. 55965-84-9) erhältlich; es handelt sich um ein 3:1-Gemisch aus CMI und MI. Die relativen Konzentrationen jedes Bestandteils liegen zwischen 1,1 % und 1,25 % (CMI) bzw. 0,3 % und 0,45 % (MI). Die nicht wirksamen Bestandteile sind Magnesiumsalze (21,5 % bis 24 %) und Kupfernitrat (0,15 % bis 0,17 %); 74 % bis 77 % sind Wasser. Kathon CG ist bei Sigma-Aldrich und Rohm und Haas (nun Dow Chemical Corporation) erhältlich.

* = Gilt als nicht sensibilisierend beim Menschen, da keine Ergebnisse klinischer Epikutantests (Patch-Tests) vorliegen, da es nicht als Allergen im Patch-Test-System aufgeführt ist und keine Fallberichte für die Sensibilisierung beim Menschen verfügbar sind.

** = GP-Daten nicht verfügbar.

III. Vorgegebene Zuverlässigkeits- und Genauigkeitsstandards

7. Die Genauigkeit einer vorgeschlagenen vergleichbaren oder modifizierten LLNA-Methode sollte bei ihrer Bewertung anhand der 18 zu verwendenden Mindest-Referenzsubstanzen die Genauigkeit der LLNA-Leistungsstandards erreichen oder übertreffen. Die neue oder modifizierte Methode sollte zu der richtigen Einstufung auf der Grundlage einer „Ja/Nein“-Entscheidung führen. Es könnte allerdings sein, dass die neue oder modifizierte Methode nicht zur richtigen Einstufung aller zu verwendenden Mindest-Referenzsubstanzen führt. Wenn zum Beispiel einer der schwach sensibilisierenden Stoffe falsch klassifiziert wird, sollten eine wissenschaftliche Begründung für die falsche Einstufung sowie die Vorlage zusätzlicher Daten (z. B. Testergebnisse, die korrekte Einstufungen für andere Stoffe mit physikalischen, chemischen und sensibilisierenden Eigenschaften zeigen, die denen der falsch eingestuften Referenzsubstanz gleichen) in Erwägung gezogen werden, um eine gleichwertige Leistung nachzuweisen. Unter diesen Umständen würde der Validierungsstatus der neuen oder modifizierten LLNA-Prüfmethode für jeden Einzelfall bewertet werden.

Intra-Labor-Reproduzierbarkeit

8. Zur Bestimmung der Intra-Labor-Reproduzierbarkeit sollte eine neue oder modifizierte LLNA-Methode unter Verwendung einer sensibilisierenden Substanz beurteilt werden, die im LLNA bereits gut bekannt ist. Daher basieren die LLNA-Leistungsstandards auf der Variabilität der Ergebnisse aus wiederholten Tests an Hexylcinnaminaldehyd (HCA). Um die Intra-Labor-Zuverlässigkeit zu bewerten, werden die Werte für die geschätzte Konzentrationsschwelle (EC_t) für HCA zu vier verschiedenen Zeitpunkten ermittelt, zwischen denen jeweils mindestens eine Woche liegen sollte. Eine akzeptable Intra-Labor-Reproduzierbarkeit zeigt sich in der Fähigkeit eines Labors, in jedem HCA-Test EC_t-Werte zwischen 5 % und 20 % zu erzielen, was einer Bandbreite von 0,5 - 2,0 mal dem mittleren spezifizierten EC₃-Wert für HCA (10 %) im LLNA entspricht (siehe Tabelle 1).

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit

9. Zur Bestimmung der Inter-Labor-Reproduzierbarkeit sollte eine neue oder modifizierte LLNA-Methode unter Verwendung von zwei sensibilisierenden Substanzen beurteilt werden, die im LLNA bereits gut bekannt sind. Die LLNA-Leistungsstandards basieren auf der Variabilität der Ergebnisse aus Tests an HCA und 2,4-Dinitrochlorobenzol (DNCB) in unterschiedlichen Laboratorien. Die EC_t-Werte sollten unabhängig aus einer einzelnen Studie abgeleitet werden, die in mindestens drei gesonderten Laboratorien durchgeführt wurde. Zum Nachweis einer akzeptablen Inner-Labor-Reproduzierbarkeit sollte jedes Labor EC_t-Werte zwischen 5 % und 20 % für HCA, und 0,025 % bis 0,1 % für DNCB erzielen, was einer Bandbreite von jeweils 0,5 - 2,0 mal den mittleren spezifizierten EC₃-Konzentrationen für HCA (10 %) und DBCB (0,05 %) im LLNA entspricht (siehe Tabelle 1).

Anlage 2

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (14).

Vergleichssubstanz: Eine sensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanz, die als Norm zu Vergleichszwecken für eine Prüfsubstanz verwendet wird. Eine Vergleichssubstanz sollte die folgenden Eigenschaften haben: (i) gleichbleibende und verlässliche Quelle(n); (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Effekten und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Geschätzte Konzentrationsschwelle (ECt): Geschätzte Konzentration einer Prüfsubstanz, die benötigt wird, um einen Stimulationsindex zu erzeugen, der eine positive Reaktion anzeigt.

Effektive Konzentration (EC3): Geschätzte Konzentration einer Prüfsubstanz, die benötigt wird, um einen Stimulationsindex von drei hervorzurufen.

Falsch negativ: Eine Prüfsubstanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als negativ oder nicht wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit positiv bzw. wirksam ist.

Falsch positiv: Eine Prüfsubstanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als positiv oder wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit negativ bzw. nicht wirksam ist.

Gefahr: Potenzial eines negativen Effekts für Gesundheit oder Umwelt. Die negative Wirkung manifestiert sich nur, wenn es zu einem ausreichenden Expositionsniveau kommt.

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfsubstanzen testen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Test erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann. Im englischen Sprachgebrauch spricht man in diesem Zusammenhang auch von „Between-laboratory reproducibility“ (14).

Intra-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. In diesem Zusammenhang spricht man auch von Laborinterner Reproduzierbarkeit (14).

Me-too-Test: Umgangssprachliche Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Eine solche Prüfmethode käme für die Catch-up-Validierung in Frage. Gleichbedeutend mit vergleichbarer Prüfmethode verwendet (14).

Ausreißer: Ein Ausreißer ist ein Messwert, der sich beträchtlich von anderen Werten in einem zufällig ausgewählten Muster in einer Population unterscheidet.

Leistungsstandards (PS): Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, funktionell und mechanistisch ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzsubstanzen, ausgewählt aus den Substanzen, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen ähnliche Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzsubstanzen demonstrieren sollte (14).

Geschützte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, deren Herstellung und Vertrieb durch Patente, Urheberrechte, Handelsmarken usw. beschränkt sind.

Qualitätssicherung: Ein Managementprozess, mittels dessen die Einhaltung von Laborprüfnormen, Anforderungen und Aufzeichnungsverfahren, sowie die Genauigkeit des Datentransfers durch Individuen bewertet wird, die von den testenden Personen unabhängig sind.

Referenzsubstanzen: Chemikalien, die zur Verwendung im Validierungsprozess ausgewählt werden und für die die Reaktionen innerhalb des *in vitro*- oder *in vivo*-Referenztestsystems oder der untersuchten Spezies bereits bekannt sind. Diese Chemikalien sollten repräsentativ für die Chemikalienklassen sein, für die die Prüfmethode voraussichtlich verwendet werden soll; ferner sollten sie die ganze Bandbreite an Reaktionen abdecken, die von den Zielchemikalien erwartet werden kann - von stark über schwach bis negativ. Für die unterschiedlichen Stadien des Validierungsprozesses, für verschiedene Prüfmethoden und Testverwendungen können unterschiedliche Reihen von Referenzchemikalien benötigt werden (14).

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Test und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Test die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz beinhaltet eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode (14).

Zuverlässigkeit: Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (14).

Hautsensibilisierung: Ein immunologischer Prozess, der auftritt, wenn ein empfindliches Individuum topisch einem induzierenden chemischen Allergen ausgesetzt ist, das eine kutane Immunreaktion auslöst, die zur Entwicklung einer Kontaktsensibilisierung führen kann.

Stimulationsindex (SI): Ein Wert, der zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials einer Prüfsubstanz berechnet wird. Der SI ist das Verhältnis der Proliferation in behandelten Gruppen zu dem der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe.

Prüfsubstanz (auch Prüfchemikalie): Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die Validierungsstudien durchgeführt wurden, um die Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Verwendungszweck zu bestimmen. Es ist zu beachten, dass die Leistungsfähigkeit einer validierten Prüfmethode im Hinblick auf Genauigkeit und Zuverlässigkeit unter Umständen nicht den Anforderungen eines vorgeschlagenen Verwendungszwecks genügt (14).“

2. Kapitel B.46 erhält folgende Fassung:

„B.46 In-Vitro-Hautreizung: Test an rekonstruierten Modellen menschlicher Epidermis

EINLEITUNG

1. Unter einer Hautreizung versteht man das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfsubstanz für die Dauer von bis zu 4 Stunden [Definition nach dem Globalen Harmonisierten System (GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN) und nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (1) (3)]. Mit der vorliegenden Prüfmethode steht ein *in vitro*-Verfahren zur Verfügung, das zur Ermittlung schädlicher Wirkungen von hautreizenden Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß UN GHS und EU CLP-Verordnung Kategorie 2 (1) (2) (3) herangezogen werden kann. In der EU und in anderen Regionen, die die wahlfreie Kategorie (leichte Reizstoffe) nach UN GHS nicht anerkannt haben, kann diese Prüfmethode auch zur Identifizierung nicht klassifizierter Chemikalien, d. h. „Keine Kategorie“ nach UN GHS und EU CLP, verwendet werden (1) (3). Die vorliegende Prüfmethode kann außerdem als eigenständiger Ersatztest für *in vivo*-Tests auf Hautreizungen innerhalb einer sequenziellen Teststrategie eingesetzt werden, um das Hautreizungspotenzial von Chemikalien zu bestimmen (4 und Kapitel B.4 in diesem Anhang).
2. Hautreizungen werden bislang in der Regel anhand von Versuchstieren bewertet [OECD-Prüfrichtlinie 404; Kapitel B.4 in diesem Anhang] (4). Um dem Tierschutzaspekt Rechnung zu tragen, wurde Methode B.4 2004 überarbeitet und sieht nun vor, dass Hautverätzungen/-reizungen auch im Wege einer sequenziellen Teststrategie bestimmt werden können, bei der validierte *in vitro*- oder *ex vivo*-Prüfmethoden angewandt werden, die den Tieren Schmerzen und Leiden ersparen. Drei validierte *in vitro*-Prüfmethoden wurden als OECD-Prüfrichtlinien 430, 431 und 435 (5) (6) (7) zugelassen, und zwei von ihnen - Kapitel B.40 und B.40b dieses Anhangs - können für den Hautverätzungen betreffenden Teil der sequenziellen Teststrategie der Methode B.4 oder der OECD-Prüfrichtlinie 404 (4) eingesetzt werden.
3. Die vorliegende Prüfmethode bezieht sich auf Hautreizungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit. Sie beruht auf Modellen rekonstruierter menschlicher Epidermis, die in ihrer allgemeinen Ausgestaltung (Verwendung von menschlichen, nicht transformierten Keratinozyten als zellulärem Ausgangsmaterial, repräsentativem Gewebe und Zytarchitektur), die biochemischen und physiologischen Eigenschaften der menschlichen Oberhaut, d. h. der Epidermis, weitgehend nachvollziehen. Diese Prüfmethode umfasst auch eine Reihe von Leistungsstandards (Anlage 2) für die Bewertung ähnlicher und modifizierter Prüfmethoden auf der Grundlage rekonstruierter Modelle der menschlichen Epidermis, die vom Europäischen Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (EC-ECVAM) (8) in Übereinstimmung mit den Grundsätzen des OECD-Leitliniendokuments Nr. 34 (9) entwickelt wurden.

4. Für diese Prüfmethode stehen drei validierte Verfahren zur Verfügung. Für eine *in vitro*-Methode (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), die ein rekonstruiertes Modell menschlicher Epidermis verwendet und im Handel als EpiSkin™ erhältlich ist (auch als Validierte Referenzmethode; VRM bezeichnet), wurden Prävalidierungs-, Optimierungs- und Validierungsstudien abgeschlossen. Zwei weitere im Handel erhältliche *in vitro*-Methoden auf der Grundlage von Hautmodellen zeigten nach der auf Leistungsstandards basierenden Validierung (21) ähnliche Ergebnisse wie die VRM. Hierbei handelt es sich um die auf rekonstruierten Modellen menschlicher Epidermis beruhenden Methoden EpiDerm™ SIT (EPI-200) und SkinEthic™ (22).
5. Bevor ein vorgeschlagener Test an Modellen von *in vitro* rekonstruierter menschlicher Epidermis - außer der VRM und außer EpiDerm™ SIT (EPI-200) oder SkinEthic™ - für regulatorische Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den in der vorliegenden Prüfmethode vorgegebenen Leistungsstandards (Anlage 2) Verlässlichkeit, Relevanz (Genauigkeit) und Grenzen des Tests für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass er mit der VRM vergleichbar ist. Zudem empfiehlt es sich, das OECD Explanatory Background Document über *in vitro*-Hautreizungstests zu konsultieren, bevor ähnliche oder modifizierte *in vitro*-Methoden mit rekonstruiertem Epidermismodell entwickelt, validiert und den Regulierungsbehörden zur Annahme vorgelegt werden (23).

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

6. Die verwendeten Begriffsbestimmungen sind in Anlage 1 aufgeführt.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

7. Eine Begrenzung der Prüfmethode, wie durch die Validierungsstudie (16) nachgewiesen, besteht insofern, als keine Einstufung von Stoffen in die wahlfreie Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) des UN GHS-Systems möglich ist (1). Sollte sie als teilweiser Ersatztest verwendet werden, könnten weitere *in vivo*-Tests erforderlich sein, um das Hautreizungspotenzial vollständig zu charakterisieren (4 und Kapitel B.4 in diesem Anhang). Die Verwendung menschlicher Haut unterliegt anerkanntermaßen ethischen Überlegungen und Bedingungen auf nationaler und internationaler Ebene.
8. Diese Prüfmethode bezieht sich auf die *in vitro*-Komponente von Hautreizungen innerhalb der sequenziellen Teststrategie nach B.4 (OECD-Prüfrichtlinie 404) über Hautkorrosion/Hautirritation (4). Obwohl diese Prüfmethode keine angemessene Information über Hautverätzungen liefert, wird darauf hingewiesen, dass B.40b (OECD-Prüfrichtlinie 431) über Hautkorrosion auf demselben Testsystem anhand eines Epidermismodells beruht, obwohl ein anderes Protokoll verwendet wird (Kapitel B.40b). Die vorliegende Methode beruht auf Hautmodellen unter Verwendung menschlicher Keratinozyten, die daher *in vitro* das Zielorgan der betrachteten Spezies repräsentieren. Daher deckt sie unmittelbar den Anfangsschritt der Entzündungskaskade/des Wirkmechanismus (Zell- und Gewebeschädigung mit resultierendem lokalisiertem Trauma) ab, die während der Reizung *in vivo* auftritt. Für die dieser Prüfmethode zugrunde liegende Validierung wurde eine große Anzahl an Chemikalien getestet. Die empirische Datenbasis der Validierungsstudie umfasste insgesamt 58 chemische Stoffe (16) (18) (23). Betroffen waren Feststoffe, Flüssigkeiten, halbfeste Stoffe und Wachse. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig sein; Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Behandlung der Probe ist nicht nötig. Gase und Aerosole wurden bislang in keiner

Validierungsstudie bewertet (24). Obwohl ihre Prüfung anhand des Epidermis-Modells vorstellbar ist, ermöglicht die vorliegende Prüfmethode nicht das Testen von Gasen und Aerosolen. Zu beachten ist auch, dass stark gefärbte Chemikalien mit den Zellviabilitätsmessungen interferieren können und daher die Verwendung angemessener Kontrollen zur Korrektur erfordern (siehe Absätze 24-26).

9. Ein einziger Prüfdurchgang mit drei Replikatgeweben sollte für eine Prüfsubstanz bei eindeutiger Einstufung genügen. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren prozentualen Viabilität von $50 \pm 5\%$, sollte ein zweiter Durchgang in Betracht gezogen werden, bzw. ein dritter bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Durchgänge.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

10. Die Prüfsubstanz wird topisch auf ein dreidimensionales Modell rekonstruierter menschlicher Epidermis aufgetragen, bestehend aus nicht veränderten menschlichen epidermalen Keratinozyten, die zu einem mehrschichtigen, stark differenzierten Modell menschlicher *Epidermis* kultiviert wurden. Letztere besteht aus angeordneten Basal-, Stachel- und Körnerzellenschichten und einer mehrlagigen Hornschicht (*stratum corneum*), die zwischen den Zellen lamellare Fettschichten enthält, deren Lipid-Hauptklassen den *in vivo* gefundenen Mustern entsprechen.
11. Durch chemische Stoffe induzierte Hautreizungen, die sich in Erythemen und Ödemen ausdrücken, sind das Ergebnis einer Kaskade von Ereignissen, an deren Beginn das Eindringen in das *stratum corneum* mit folgender Schädigung der darunter liegenden Keratinozytenschicht steht. Die absterbenden Keratinozyten setzen Mediatorsubstanzen frei, die die Entzündungskaskade in den Zellen der *Dermis*, insbesondere in den Stromalzellen und Endothelzellen, einleiten. Die Dilatation und erhöhte Durchlässigkeit der Endothelzellen erzeugen letztendlich das festgestellte Erythem bzw. Ödem (24). Die Methoden auf der Grundlage des Hautmodells erlauben die Messung der Ereignisse zu Beginn der Kaskade.
12. Die Zellviabilität an Modellen rekonstruierter menschlicher Epidermis wird durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau; CAS-Nummer 298-93-1], zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (25). Reizstoffe werden anhand ihrer Fähigkeit erkannt, die Zellviabilität unter vorgegebene Schwellenwerte zu senken (d. h. $\leq 50\%$ bei Reizstoffen der UN GHS-/ EU CLP Kategorie 2). Je nach dem regulatorischen Rahmenwerk, in dem die Ergebnisse dieser Prüfmethode verwendet werden, können Chemikalien, die eine Zellviabilität oberhalb des vorgegebenen Grenzwerts erzeugen, als nicht-reizend eingestuft werden (d. h. $> 50\%$, Keine Kategorie).

LEISTUNGSNACHWEIS

13. Bevor eines der drei validierten Verfahren, die den Anforderungen der vorliegenden Prüfmethode genügen, routinemäßig angewandt werden kann, sollten Laboratorien anhand von zehn der in Tabelle 1 aufgeführten Referenzsubstanzen die technische Leistungsfähigkeit der Methode nachweisen. Für im Rahmen dieser Prüfmethode entwickelte ähnliche Verfahren oder für Änderungen einer der drei validierten Methoden sollten die in Anlage 2 dieser Prüfmethode beschriebenen Leistungsstandards erfüllt werden, bevor die Methode für Regulierungszwecke eingesetzt wird.

14. Als Teil des Leistungsnachweises sollte der Benutzer die von dem Hersteller des Hautmodells spezifizierten Barriereeigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen. Dies ist besonders wichtig, wenn die Gewebe über große Entferungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Methode erfolgreich etabliert und ihre Leistung demonstriert wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig angewandten Methoden, die Barriereeigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

Tabelle 1: Referenzsubstanzen¹

Substanz	CAS-Nr.	In vivo-Punktzahl²	Aggregatzustand	UN GHS/EU CLP Kategorie
Naphthalen-Essigsäure	86-87-3	0	fest	Keine Kat.
Isopropanol	67-63-0	0,3	flüssig	Keine Kat.
Methylstearat	112-61-8	1	fest	Keine Kat.
Heptyl-Butyrat	5870-93-9	1,7	flüssig	Keine Kat. (wahlfrei Kat. 3) ^{3,4}
Hexyl-Salicylat	6259-76-3	2	flüssig	Keine Kat. (wahlfrei Kat. 3) ^{3,4}
Cyclamenaldehyd	103-95-7	2,3	flüssig	Kat. 2
1-Bromohexan	111-25-1	2,7	flüssig	Kat. 2
Kaliumhydroxid (5 % aq.)	1310-58-3	3	flüssig	Kat. 2
1-Methyl-3-phenyl-1-piperazin;	5271-27-2	3,3	fest	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	3,4	flüssig	Kat. 2

¹ Diese Referenzsubstanzen sind eine Untergruppe der in der Validierungsstudie verwendeten Referenzsubstanzen.

² In vivo-Punktzahl in Übereinstimmung mit B.4 und OECD-Prüfrichtlinie 404 (4).

³ Im Rahmen dieser Prüfmethode wird die wahlfreie UN GHS Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) (1) als Keine Einstufung betrachtet.

⁴ Die wahlfreie UN GHS Kategorie 3 ist auf das EU CLP nicht anwendbar.

VERFAHREN

15. Es folgt eine Beschreibung der Elemente und Verfahrensschritte eines Hautreizungstests an Modellen rekonstruierter menschlicher Epidermis. Ein Modell menschlicher Epidermis sollte rekonstruiert sein und kann präpariert oder im Handel erworben werden. Standardvorgehensweisen für EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) und SkinEthic™ RHE sind verfügbar (26) (27) (28). Die Tests sollten wie folgt durchgeführt werden:

Elemente des VERFAHRENS AUF DER GRUNDLAGE VON MODELLEN REKONSTRUIERTER MENSCHLICHER EPIDERMIS

Allgemeine Bedingungen

16. Die Epithelschicht sollte aus normalen menschlichen Keratinozyten gebildet werden. Unter der funktionsfähigen Hornschicht (*stratum corneum*) sollten mehrere Lagen lebensfähiger Epithelzellen (Basalzellschicht, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*) vorhanden sein. Die Hornschicht sollte mehrlagig sein und das zur Erzeugung einer funktionsfähigen Barriere essenzielle Lipidprofil aufweisen. Die Barriere muss robust genug sein, um das schnelle Eindringen zytotoxischer Markersubstanzen wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X-100 zu verhindern. Die Barrierefunktion kann entweder durch Bestimmung der Konzentration, in der eine Markersubstanz die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert (IC_{50}), oder durch die Bestimmung der Expositionszeit bewertet werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Markersubstanz in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren (ET_{50}). Das Modell muss rückhaltefähig genug sein, um zu verhindern, dass Material rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt, was zu einer mangelhaften Modellierung der Hautexposition führen würde. Das Hautmodell sollte nicht mit Bakterien, Viren, Mykoplasmata oder Pilzen kontaminiert sein.

Funktionale Bedingungen

Viabilität

17. Die Größenordnung der Viabilität wird vorzugsweise anhand des MTT-Tests bestimmt (25). Die Benutzer des Hautmodells sollten sicherstellen, dass jede Charge des verwendeten Modells vorgegebene Kriterien für die Negativkontrolle (NK) erfüllt. Die optische Dichte (OD) des Extraktionslösungsmittels allein sollte ausreichend gering sein, d. h. $OD < 0,1$. Von dem Entwickler/Hersteller des Hautmodells wird ein Akzeptanzbereich (obere und untere Grenze) für OD-Werte der Negativkontrolle (nach den Bedingungen der Prüfmethode für Hautreizungen) aufgestellt. Die Akzeptanzbereiche für die 3 validierten Methoden sind in Tabelle 2 aufgeführt. Es sollte dokumentiert werden, dass die mit der Negativkontrolle behandelten Gewebe über die gesamte Dauer der Exposition stabil bleiben (bzw. vergleichbare Viabilitätsmessungen ergeben).

Tabelle 2: Akzeptanzbereiche für OD-Werte der Negativkontrolle

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 1,0$	$\leq 2,5$
SkinEthic™ RHE	$\geq 1,2$	$\leq 2,5$

Barrierefunktion

18. Das *stratum corneum* und seine Fettzusammensetzung sollten in der Lage sein, das schnelle Eindringen zytotoxischer Markersubstanzen wie SDS oder Triton X-100, wie durch IC₅₀ oder ET₅₀ bestimmt, zu verhindern (Tabelle 3).

Morphologie

19. Bei der histologischen Untersuchung des Modells rekonstruierter Haut sollte nachgewiesen werden, dass das Modell eine der menschlichen *Epidermis* ähnliche Struktur (einschließlich mehrlagigem *stratum corneum*) aufweist.

Reproduzierbarkeit

20. Die Ergebnisse der Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrollen (NK) der Prüfmethode sollten die Reproduzierbarkeit im Zeitverlauf nachweisen.

Qualitätskontrolle (QK)

21. Der Entwickler/Hersteller des Modells rekonstruierter Epidermis sollte sicherstellen und nachweisen, dass jede Charge des verwendeten Hautmodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von denen die Kriterien der *Viabilität* (Absatz 17), der *Barrierefunktion* (Absatz 18) und der *Morphologie* (Absatz 19) die wichtigsten sind. Diese Daten sollten den Benutzern der Methode zur Verfügung gestellt werden, damit diese sie in ihre Prüfberichte aufnehmen können. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells (oder - bei Verwendung eines hauseigenen Modells - der Prüfer) sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für IC₅₀ oder ET₅₀ festlegen. Nur mit geeigneten Geweben erzielte Ergebnisse können für eine zuverlässige Vorhersage für die Einstufung von Reizwirkungen akzeptiert werden. Beispiele für Akzeptanzspannen für die drei validierten Methoden sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Beispiele für Chargenfreigabekriterien im Rahmen der Qualitätskontrolle

	Untere Akzeptanzgrenze	Obere Akzeptanzgrenze
EpiSkin™ (SM) (18-stündige Behandlung mit SDS) (26)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET ₅₀ = 4,8 h	ET ₅₀ = 8,7 h
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 h	ET ₅₀ = 9,0 h

Applikation der Prüf- und Kontrollsubstanzen

22. Für jede Prüfsubstanz und für die Kontrollen bei jedem Durchgang sollten mindestens drei Replikate verwendet werden. Bei flüssigen und festen Substanzen sollte eine ausreichende Menge Prüfsubstanz gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche der *Epidermis* aufgetragen werden; unendliche Dosen sind zu vermeiden, d. h. es sollten mindestens 25 µL/cm² oder 25 mg/cm² verwendet werden. Bei festen Stoffen sollte die *Epidermis*-Oberfläche vor der Applikation mit deionisiertem oder destilliertem Wasser angefeuchtet werden, um guten Hautkontakt zu gewährleisten. Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver getestet werden. Am Ende der Expositionszeit sollte die Prüfsubstanz mit wässriger Pufferlösung oder 0,9 % NaCl von der Hautoberfläche abgewaschen werden. Je nachdem, welches Modell rekonstruierter menschlicher Epidermis verwendet wird, kann die Expositionszeit 15 bis 60 Minuten betragen und die Inkubationstemperatur zwischen 20 und 37°C liegen. Diese Expositionszeiten und -temperaturen werden für jede Methode auf der Grundlage des Hautmodells optimiert und stellen die unterschiedlichen Eigenschaften der Methoden dar. Für Einzelheiten siehe Standardvorgehensweisen (Standard Operating Procedures; SOP) der Methoden (26) (27) (28).
23. Bei jeder Studie sollten gleichzeitig Negativkontrollen (NK) und Positivkontrollen (PK) verwendet werden, um nachweisen zu können, dass die Viabilität (mit der NK), die Barrierefunktion und die resultierende Empfindlichkeit der Gewebe (mit der PK) innerhalb einer vorgegebenen historischen Akzeptanzspanne liegen. Als PK-Substanz wird 5 % wässrige SDS empfohlen. Als NK-Substanzen empfehlen sich Wasser oder phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS).

Zellviabilitätsmessungen

24. Wichtigstes Element des Testverfahrens ist es, dass Viabilitätsmessungen nicht unmittelbar nach dem Kontakt mit den Prüfsubstanzen, sondern nach einer ausreichend langen Inkubationszeit der abgespülten Gewebe (nach der Behandlung) in einem frischen Medium erfolgen. Während dieser Zeit kann sich das Gewebe von milden zytotoxischen Wirkungen erholen bzw. deutliche zytotoxische Effekte können sich herausbilden. Während der Phase der Testoptimierung (11) (12) (13) (14) (15) hat sich eine Inkubationszeit von 42 Stunden nach der Behandlung als optimal erwiesen.
25. Der MTT-Test ist eine validierte quantitative Methode, die zur Messung der Zellviabilität nach dieser Prüfmethode angewandt werden sollte. Sie ist zur Anwendung in einem dreidimensionalen Gewebemodell geeignet. Die Gewebeprobe wird für 3 Stunden in eine MTT-Lösung geeigneter Konzentration (z. B. 0,3 – 1 mg/mL) gelegt. Der blaue Formazan-Niederschlag wird sodann mit Hilfe eines Lösungsmittels (z. B. Isopropanol, Säure-Isopropanol) aus dem Gewebe extrahiert, und die Formazankonzentration wird durch Bestimmung des OD-Werts bei 570 nm mittels eines Bandpasses von maximal ± 30 nm gemessen.
26. Optische Eigenschaften der Prüfsubstanz oder ihre chemische Wirkung auf den MTT können mit dem Test interferieren und (weil die Prüfsubstanz die Farbbildung sowohl verhindern oder umkehren also auch hervorrufen kann) zu einer falschen Viabilitätsschätzung führen. Dies kann der Fall sein, wenn eine bestimmte Prüfsubstanz nicht komplett von dem Gewebe abgewaschen wurde oder wenn sie in die *Epidermis* eindringt. Wirkt sich die Prüfsubstanz unmittelbar auf den MTT aus

(MTT-Reduktionsmittel), ist sie natürlich gefärbt oder verfärbt sie sich während der Gewebebehandlung, so sollten zum Nachweis und zur Behebung einer etwaigen Interferenz der Prüfsubstanz mit der Viabilitätsmesstechnik zusätzliche Kontrollen verwendet werden. Für eine genaue Beschreibung der richtigen Durchführung der MTT-Reduktion und der Interferenzen durch Färbemittel siehe die Standardvorgehensweisen für die drei validierten Methoden (26) (27) (28).

Akzeptanzkriterien

27. Bei jeder Methode an gültigen Chargen des betreffenden Hautmodells (siehe Absatz 21), sollten mit der Negativkontrolle behandelte Gewebe OD-Werte aufweisen, die für die Gewebequalität nach abgeschlossenen Beförderungs- und Annahmevergängen und sämtlichen Schritten des Protokolls aussagekräftig sind. Die OD-Werte der Kontrollen sollten nicht unter historisch etablierten niedrigeren Grenzwerten liegen. Gleichzeitig sollten mit der Positivkontrolle, d. h. 5 % wässrige SDS, behandelte Gewebe die Fähigkeit der Gewebe reflektieren, unter den Bedingungen der Prüfmethode auf hautreizende Chemikalien zu reagieren (26) (27) (28). Es sollten entsprechende und geeignete Maße der Variabilität zwischen Gewebereplikaten festgelegt werden (z. B. soweit Standardabweichungen (SD) verwendet werden, sollten sie innerhalb des aufgrund historischer Daten berechneten einseitigen Toleranzintervalls von 95 % liegen; für die VRM gilt, dass die SD < 18 % betragen sollen).

Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell

28. Die für jede Prüfsubstanz erhaltenen OD-Werte können zur Berechnung einer prozentualen Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle, die auf 100 % festgesetzt ist, herangezogen werden. Der Grenzwert der prozentualen Zellviabilität, der zwischen Reizstoff und nicht klassifizierten Prüfsubstanzen unterscheidet, und das (die) statistische(n) Verfahren zur Auswertung der Ergebnisse und zur Identifizierung von Reizstoffen sollten genau definiert und dokumentiert werden und nachweislich geeignet sein. Die Grenzwerte für die Vorhersage der Reizung sind nachstehend angegeben:

Die Prüfsubstanz gilt als hautreizend im Sinne von UN GHS/EU CLP Kategorie 2, wenn die Gewebeviabilität nach der Exposition und der Inkubation nach der Behandlung weniger als oder gleich (\leq) 50 % beträgt.

Je nach dem regulatorischen Rahmenwerk, in dem die Ergebnisse dieser Prüfmethode verwendet werden, gilt die Prüfsubstanz als nicht hautreizend im Sinne der Einstufung Keine Kategorie nach UN GHS/EU CLP, wenn die Gewebeviabilität nach der Exposition und der Inkubation nach der Behandlung mehr als ($>$) 50 % beträgt.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

29. Für jeden Durchgang sollten Daten aus einzelnen Replikatstestproben (z. B. OD-Werte und Daten über die berechnete prozentuale Zellviabilität für jede Prüfsubstanz, einschließlich Einstufung), gegebenenfalls auch Daten aus Wiederholungsversuchen, tabellarisch zusammengefasst werden. Darüber hinaus sollten für jeden Durchgang die

Mittelwerte \pm Standardabweichung übermittelt werden. Außerdem sollten für jede geprüfte Substanz festgestellte Interaktionen mit dem MTT-Reagens und Testfarbstoffen protokolliert werden.

Prüfbericht

30. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüf- und Kontrollsubstanzen:

- Chemische Bezeichnung(en) wie CAS-Bezeichnung und CAS-Nummer, EG-Name und EG-Nummer, soweit bekannt;
- Reinheit und Zusammensetzung der Substanz (in Gewichtsprozent);
- physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Aggregatzustand, Stabilität, Flüchtigkeit, pH-Wert, Wasserlöslichkeit, soweit bekannt), die für die Durchführung der Studie relevant sind;
- Behandlung der Prüf-/Kontrollsubstanzen vor dem Test, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);
- Lagerbedingungen;

Gründe für die Verwendung des betreffenden Hautmodells und Protokolle

Prüfbedingungen:

- verwendetes Zellsystem;
- umfassende Begleitdokumentation für das betreffende Hautmodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Aspekte beinhalten:
 - i) Viabilität
 - ii) Barrierefunktion
 - iii) Morphologie
 - iv) Reproduzierbarkeit und Prädiktivität
 - v) Qualitätskontrollen (QK) des Modells
- Einzelheiten der angewandten Methode;
- verwendete Testdosen, Dauer der Exposition und der Inkubationszeit nach der Behandlung;
- Beschreibung etwaiger Änderungen im Prüfverfahren;
- Verweis auf historische Modelldaten. Diese sollte unter anderem die folgenden Aspekte beinhalten:
 - i) Akzeptanz der QK-Daten mit Verweis auf historische Chargendaten
 - ii) Akzeptanz der Positiv- und Negativkontrollwerte mit Verweis auf die Mittelwerte und Spannbreiten der Positiv- und Negativkontrollen
- Beschreibung der angewandten Auswertungskriterien, einschließlich Begründung der Wahl des (der) Schwellenwerte(s) für das Vorhersagemodell;
- Verweis auf historische Kontrolldaten.

Ergebnisse:

- tabellarische Darstellung der Daten aus Einzelproben für jeden Durchgang und jede

Replikatmessung;

- Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Testfarbstoffe;
- Beschreibung sonstiger beobachteter Wirkungen.

Diskussion der Ergebnisse

Schlussfolgerung

LITERATUR

- (1) Globales Harmonisiertes System (GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN) 2009, Dritte überarbeitete Fassung, UN New York und Genf. Abrufbar unter: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]
- (2) EC-ECVAM (2009), Statement on the “Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards”, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (3) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG, und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1.
- (4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.
- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., mailto: Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto: Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.
- (17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1- α . Available at: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy - Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.
- (20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]

- (23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]
- (24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.
- (25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.
- (26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min - 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- (29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (30) Richtlinie 2001/59/EG der Kommission vom 6. August 2001 zur 28. Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt, ABl. L 225 vom 21.8.2001, S.1
- (31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.
- (32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359-365.
- (33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (9).

Zellviabilität: Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation z. B. Fähigkeit zellulärer mitochondrialer Dehydrogenasen, den Vitalfarbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau) zu reduzieren, der je nach gemessenem Endpunkt und angewandtem Testkonzept der Gesamtzahl und/oder der Vitalität lebender Zellen entspricht.

Übereinstimmung: Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und wird als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. (9).

ET₅₀: Die Expositionszeit, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Markersubstanz in vorgegebener fester Konzentration um 50 % zu reduzieren, siehe auch IC₅₀.

EU CLP (Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen): führt das UN GHS-System über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Chemikalien (Stoffe und Gemische) in der Europäischen Union ein. (3).

GHS (Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN)): Ein System zur Klassifizierung von Substanzen und Gemischen nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

IC₅₀: Die Konzentration, bei der eine Markersubstanz die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionszeit um 50 % (IC₅₀) reduziert, siehe auch ET₅₀.

Unendliche Dosis: Die Menge der auf die Haut aufgetragenen Prüfsubstanz, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht.

Me-too-Test: Umgangssprachliche Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Eine solche Prüfmethode käme für die Catch-up-Validierung in Frage. Gleichbedeutend mit vergleichbarer Prüfmethode verwendet (9).

Leistungsstandards (PS): Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzsubstanzen, ausgewählt aus den Substanzen, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzsubstanzen demonstrieren sollte (9).

Referenzsubstanzen: Chemikalien, die zur Verwendung im Validierungsprozess ausgewählt werden und für die die Reaktionen innerhalb des *in vitro*- oder *in vivo*-Referenztestsystems oder der untersuchten Spezies bereits bekannt sind. Diese Chemikalien sollten repräsentativ für die Chemikalienklassen sein, für die die Prüfmethode voraussichtlich verwendet werden soll; ferner sollten sie die ganze Bandbreite an Reaktionen abdecken, die von den Zielchemikalien erwartet werden kann - von stark über schwach bis negativ. Für die unterschiedlichen Stadien des Validierungsprozesses, für verschiedene Prüfmethoden und Testverwendungen können unterschiedliche Reihen von Referenzchemikalien benötigt werden (9).

Relevanz: Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Test und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Test die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz beinhaltet eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode (9).

Zuverlässigkeit: Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (9).

Ersatztest: Ein Test der einen routinemäßig angewandten Test zur Identifikation von Gefahren und/oder zur Risikobewertung ersetzen soll, und der im Vergleich zu dem akzeptierten Test nachweislich in allen möglichen Prüfsituationen und mit allen Stoffen einen gleichwertigen oder besseren Schutz der Gesundheit von Mensch oder Tier oder der Umwelt gewährleistet, je nachdem, was zutrifft (9).

Empfindlichkeit: Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfsubstanzen, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Empfindlichkeit ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Hautreizung: Das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfsubstanz für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Eine Hautreizung ist eine lokal auftretende, nicht immunogene Reaktion, die kurz nach der Stimulation eintritt (29). Ihr Hauptmerkmal ist ihr umkehrbarer Prozess, der mit Entzündungsreaktionen und den bei Entzündungen gängigsten klinischen Reizsymptomen (Erythema, Ödeme, Juckreiz und Schmerzen) einhergeht.

Spezifität: Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfsubstanzen, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Empfindlichkeit ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

Sequenzielle Teststrategie: Teststrategie, in der Prüfmethoden in aufeinanderfolgender Weise verwendet werden; dabei werden die in jeder folgenden Stufe gewählten Prüfmethoden auf der Grundlage der in früheren Stufen erzielten Ergebnisse ausgewählt (9).

Prüfchemikalie (auch Prüfsubstanz): Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

Anlage 2

LEISTUNGSSTANDARDS ZUR BEWERTUNG VORGESCHLAGENER VERGLEICHBARER ODER MODIFIZIERTER PRÜFMETHODEN FÜR DIE HAUTSENSIBILISIERUNG, DIE AUF *IN VITRO* REKONSTRUIERTER MENSCHLICHER EPIDERMIS BERUHEN

EINLEITUNG

1. Ziel der Leistungsstandards (Performance Standards; PS) ist es, die Grundlage zu vermitteln, auf der neue Methoden, seien diese geschützt (d. h. per Urheberrecht, Handelsmarken, eingetragene Marken) oder nicht geschützt, als ausreichend genau und zuverlässig für spezifische Prüfzwecke beurteilt werden können. Diese auf validierten und akzeptierten Methoden basierenden Leistungsstandards können auch verwendet werden, um die Zuverlässigkeit und Genauigkeit anderer analoger Methoden (umgangssprachlich als „Me-too“-Tests bezeichnet) zu bewerten, die auf ähnlichen wissenschaftlichen Prinzipien beruhen und denselben biologischen oder toxischen Effekt messen oder vorhersagen (9).
2. Vor der Annahme modifizierter Methoden (d. h. vorgeschlagener potenzieller Verbesserungen einer genehmigten Prüfmethode) sollte eine Bewertung erfolgen, um die Auswirkung der vorgeschlagenen Änderungen auf die Leistung des Tests und das Maß zu bewerten, in dem eine solche Änderung die verfügbare Information für andere Elemente des Validierungsprozesses beeinflusst. Je nach Anzahl und Art der vorgeschlagenen Änderungen, den generierten Daten und der Begleitdokumentation für diese Änderungen, sollten sie entweder dem für neue Tests beschriebenen Validierungsprozess, oder - gegebenenfalls - einer begrenzten Zuverlässigs- und Relevanzprüfung nach etablierten Leistungsstandards unterzogen werden (9).
3. Vergleichbare (Me-too-) oder modifizierte Methoden in Bezug auf die drei validierten Methoden [EpiSkin™ (Validierte Referenzmethode; VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) und SkinEthic™ RHE], deren Verwendung in der vorliegenden Prüfmethode empfohlen wird, sollten anhand von Chemikalien, die die volle Bandbreite der Draize-Reizstufen repräsentieren, auf ihre Zuverlässigkeit und Genauigkeit untersucht werden. Vorgeschlagene vergleichbare oder modifizierte Methoden, die mittels der 20 empfohlenen Referenzsubstanzen der Leistungsstandards (Tabelle 1) bewertet werden, sollten Zuverlässigs- und Genauigkeitswerte haben, die die Werte nach der VRM (Tabelle 2) erreichen oder übertreffen (2) 16). Die Zuverlässigs- und Genauigkeitswerte, die erreicht werden sollten, sind in den Absätzen 8 bis 12 dieser Anlage aufgeführt. Nicht eingestufte chemische Stoffe (UN GHS/EU CLP Keine Kategorie) und eingestufte chemische Stoffe der Kategorie 2 (UN GHS/EU CLP) (1), die unterschiedliche chemische Klassen bilden, werden ebenfalls einbezogen, so dass Zuverlässigkeit und Genauigkeit (Empfindlichkeit, Spezifität und Gesamtgenauigkeit) der vorgeschlagenen Methode mit der der validierten Referenzmethode verglichen werden können. Die Zuverlässigkeit der Methode sowie ihre Fähigkeit, Reizstoffe der UN GHS/EU CLP Kategorie 2 korrekt einzustufen, und – je nach dem regulatorischen Rahmen, für den die Daten erzeugt werden – ebenso ihre Fähigkeit, chemische Stoffe mit der Einstufung Keine Kategorie nach UN GHS/EU CLP korrekt einzustufen, sollte vor ihrer Verwendung zum Testen neuer Prüfsubstanzen nachgewiesen werden.

4. Diese Leistungsstandards basieren auf den EC-ECVAM (8), aktualisiert nach den UN GHS- und EU CLP-Systemen zur Einstufung und Kennzeichnung (1) (3). Die ursprünglichen Leistungsstandards wurden nach Abschluss der Validierungsstudie (21) festgelegt und beruhen auf dem Einstufungssystem der EU, gemäß der Richtlinie 2001/59/EG der Kommission vom 6. August 2001 zur 28. Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt¹. Infolge der Annahme des UN GHS-Systems für die Einstufung und Kennzeichnung durch die EU (EU CLP) (3), die zwischen der Finalisierung der Validierungsstudie und dem Abschluss dieser Prüfmethode erfolgte, wurden die Leistungsstandards aktualisiert (8). Diese Überarbeitung bezieht sich hauptsächlich auf Änderungen: (i) der Reihe der Referenzsubstanzen für die Leistungsstandards und (ii) der vorgegebenen Zuverlässigkeit- und Genauigkeitswerte (2) (23).

¹ ABl. L 225 vom 21.8.2001, S. 1.

LEISTUNGSSTANDARDS FÜR PRÜFMETHODEN ANHANDE VON *IN VITRO* REKONSTRUIERTEN MODELLEN MENSCHLICHER EPIDERMIS ZUR BEWERTUNG DER HAUTREIZUNG

5. Die Leistungsstandards umfassen die folgenden drei Elemente (9):

- I) Wesentliche Elemente der Prüfmethode
- II) Mindestliste der Referenzsubstanzen
- III) Vorgegebene Zuverlässigkeit- und Genauigkeitswerte

I) Wesentliche Elemente der Prüfmethode

6. Diese bestehen aus wesentlichen strukturellen, funktionellen und verfahrenstechnischen Elementen einer validierten Methode, die in das Protokoll einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell vergleichbaren oder modifizierten Methode aufgenommen werden sollten. Diese Elemente beinhalten spezifische Merkmale der Methode, kritische verfahrenstechnische Angaben sowie Maßnahmen zur Qualitätskontrolle. Die Einhaltung der wesentlichen Elemente der Prüfmethode trägt dazu bei, zu gewährleisten, dass eine vorgeschlagene vergleichbare oder modifizierte Methode auf denselben Konzepten beruht wie die entsprechende validierte Referenzmethode (9). Die wesentlichen Elemente der Prüfmethode sind ausführlich in den Absätzen 16 bis 21 der Prüfmethode beschrieben. Die Tests sollten unter Einhaltung der folgenden Bestandteile erfolgen:

Allgemeine Bedingungen (Absatz 16)

Funktionelle Bedingungen, darunter:

- Viabilität (Absatz 17);
- Barrierefunktion (Absatz 18);
- Morphologie (Absatz 19);
- Reproduzierbarkeit (Absatz 20) und
- Qualitätskontrolle (Absatz 21)

II) Mindestliste der Referenzsubstanzen

7. Anhand der Referenzsubstanzen soll festgestellt werden, ob Zuverlässigkeit und Genauigkeit einer vorgeschlagenen vergleichbaren oder modifizierten Methode, die in Struktur und Funktion nachweislich mit der VRM vergleichbar ist oder sich geringfügig von einer der drei validierten Methoden unterscheidet, mit denen der VRM vergleichbar oder besser sind (2) (8) (16) (23). Die in Tabelle 1 aufgeführten 20 empfohlenen Referenzsubstanzen umfassen Stoffe aus unterschiedlichen chemischen Klassen (d. h. chemischen Kategorien auf der Basis funktioneller Gruppen) und repräsentieren die volle Bandbreite der Draize-Reizstufen (von nicht reizend bis stark reizend). Die in dieser Liste enthaltenen Stoffe umfassen 10 Chemikalien der UN GHS/EU CLP Kategorie 2 und 10 nicht kategorisierte Chemikalien, darunter 3 Stoffe der wahlfreien UN GHS Kategorie 3. Im Rahmen dieser Prüfmethode wird die wahlfreie UN GHS Kategorie 3 als Keine Kategorie bezeichnet. Die in Tabelle 1 aufgeführten Chemikalien werden im Hinblick auf Funktionalität und Aggregatzustand unter den Stoffen ausgewählt, die in der Optimierungsphase nach der Prävalidierung, sowie in der Validierungsstudie der VRM verwendet wurden

(14) (18). Diese Referenzsubstanzen bilden die Mindestzahl an Chemikalien, die zur Bewertung der Genauigkeit und Zuverlässigkeit einer vorgeschlagenen vergleichbaren oder modifizierten Methode herangezogen werden sollten. Sie sollten jedoch nicht zur Entwicklung neuer Methoden verwendet werden. Sollte ein aufgeführter chemischer Stoff nicht verfügbar sein, können andere Substanzen verwendet werden, für die angemessene *in vivo*-Referenzdaten vorliegen. Diese sind vorzugsweise unter den Stoffen auszuwählen, die in der Optimierungsphase nach der Prävalidierung, oder in der Validierungsstudie der VRM verwendet wurden. Um die Genauigkeit der vorgeschlagenen Methode weiter zu bewerten, kann die Mindestliste der Referenzsubstanzen auf Wunsch um zusätzliche Chemikalien anderer chemischer Klassen erweitert werden, sofern für diese entsprechende *in vivo*-Referenzdaten vorliegen.

Tabelle 1: Mindestliste der Referenzsubstanzen für die Bestimmung der Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte für vergleichbare oder modifizierte Methoden zur Untersuchung von Hautreizungen auf der Grundlage rekonstruierter Modelle menschlicher Epidermis¹

Substanz	CAS-Nummer	Aggregatzustand	In vivo-Punktzahl	VRM <i>in vitro</i> Kat.	UN GHS/EU CLP <i>in vivo</i> Kat.
1-Bromo-4-chlorobutan	6940-78-9	Flüssig	0	Kat. 2	Keine Kat.
Diethylphthalat	84-66-2	Flüssig	0	Keine Kat.	Keine Kat.
Naphthalen-Essigsäure	86-87-3	Fest	0	Keine Kat.	Keine Kat.
Allylphenoxyacetat	7493-74-5	Flüssig	0,3	Keine Kat.	Keine Kat.
Isopropanol	67-63-0	Flüssig	0,3	Keine Kat.	Keine Kat.
4-Methylthiobenzaldehyd	3446-89-7	Flüssig	1	Kat. 2	Keine Kat.
Methylstearat	112-61-8	Fest	1	Keine Kat.	Keine Kat.
Heptyl-Butyrat	5870-93-9	Flüssig	1,7	Keine Kat.	Keine Kat.
Hexyl-Salicylat	6259-76-3	Flüssig	2	Keine Kat.	Keine Kat.
Cinnamaldehyd	104-55-2	Flüssig	2	Kat. 2	Keine Kat. (wahlfrei Kat. 3) ³
<i>I-Decanol</i> ²	112-30-1	Flüssig	2,3	Kat. 2	Kat. 2
Cyclamenaldehyd	103-95-7	Flüssig	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-Bromohexan	111-25-1	Flüssig	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-Chloromethyl-3, 5-dimethyl-4-methoxypyridin HCl	86604-75-3	Fest	2,7	Kat. 2	Kat. 2
<i>Di-n-Propyldisulphid</i> ²	629-19-6	Flüssig	3	Keine Kat.	Kat. 2
Kaliumhydroxid (5 % aq.)	1310-58-3	Flüssig	3	Kat. 2	Kat. 2
Benzenthiol, 5-(1,1-Dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	Flüssig	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-Methyl-3-phenyl-1-piperazin;	5271-27-2	Fest	3,3	Kat. 2	Kat. 2
Heptanal	111-71-7	Flüssig	3,4	Kat. 2	Kat. 2
Tetrachloroethylen	127-18-4	Flüssig	4	Kat. 2	Kat. 2

¹ Die Auswahl der Chemikalien basiert auf den folgenden Kriterien: (i) die Substanzen sind im Handel erhältlich; (ii) sie repräsentieren die volle Bandbreite der Draize-Reizstufen (von nicht reizend bis stark reizend); (iii) sie haben eine klar definierte chemische Struktur; (iv) sie sind repräsentativ für die im Validierungsprozess verwendete chemische Funktionalität, (v) sie weisen kein extrem toxisches Profil auf (z. B. krebsfördernd oder toxisch für das Reproduktionssystem) und sie sind nicht mit unerschwinglichen Entsorgungskosten verbunden.

² Chemische Stoffe, die beim Kaninchen reizend sind, deren nicht reizende Wirkung beim Menschen jedoch zuverlässig nachgewiesen wurde (31) (32) (33).

³ Nach dem UN GHS, nicht im EU CLP.

III) Vorgegebene Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte

8. Zur Bewertung der Zuverlässigkeit und Relevanz vorgeschlagener vergleichbarer oder modifizierter Methoden, die zwischen einzelnen Laboratorien ausgetauscht werden sollen, müssen alle 20 Referenzsubstanzen in Tabelle 1 in mindestens drei Laboratorien getestet werden. Wenn die vorgeschlagene Methode allerdings nur in einem einzigen Labor verwendet werden soll, sind Prüfungen in mehreren Laboratorien zu Validierungszwecken nicht erforderlich. Wesentlich ist jedoch, dass solche Validierungsstudien unabhängig von internationalen Validierungsstellen in Übereinstimmung mit internationalen Leitlinien bewertet werden (9). In jedem Labor sollten alle 20 Referenzsubstanzen in drei unabhängigen Durchgängen mit unterschiedlichen Gewebechargen und zu ausreichend weit auseinander liegenden Zeitpunkten getestet werden. Jeder Durchgang sollte mindestens drei gleichzeitig getestete Gewebereplikate für jede in der Prüfung enthaltene Prüfsubstanz, sowie Negativkontrolle und Positivkontrolle, umfassen.
9. Die Berechnung der Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte der vorgeschlagenen Methode sollte unter Berücksichtigung aller vier unten genannten Kriterien erfolgen, wobei sicherzustellen ist, dass die Zuverlässigkeits- und Relevanzwerte auf vorgegebene und gleichbleibende Weise berechnet werden:
 1. Nur die Daten von vollständigen Durchgangsfolgen kommen für die Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Variabilität und für die Vorhersagefähigkeit (Genauigkeit) in Frage.
 2. Die abschließende Einstufung für alle Referenzsubstanzen in jedem teilnehmenden Labor sollte ermittelt werden, indem bei sämtlichen Durchgängen einer vollständigen Durchgangsfolge der mittlere Viabilitätswert zugrunde gelegt wird.
 3. Nur die ermittelten Daten für Substanzen mit vollständigen Durchgangsfolgen in allen teilnehmenden Laboratorien kommen für die Berechnung der Inter-Labor-Variabilität in Frage.
 4. Die Berechnung der Genauigkeitswerte sollte auf der Grundlage der individuellen Laborvorhersagen für die 20 Referenzsubstanzen durch die unterschiedlichen teilnehmenden Laboratorien erfolgen.

In diesem Zusammenhang besteht eine **Durchgangsfolge** aus drei unabhängigen Durchgängen eines Labors für eine Prüfsubstanz. Eine **vollständige Durchgangsfolge** ist eine Durchgangsfolge eines Labors für eine Prüfsubstanz, in der alle drei Durchgänge gültig sind. Das bedeutet, dass jeder einzelne ungültige Durchgang eine ganze Durchgangsfolge von drei Durchgängen ungültig macht.

Laborinterne Reproduzierbarkeit

10. Bei der Bewertung der laborinternen Reproduzierbarkeit sollte die Übereinstimmung der Einstufungen (UN GHS/EU CLP Kategorie 2 und Keine Kategorie) aus unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Testdurchgängen mit den 20 Referenzsubstanzen, die innerhalb eines einzigen Labors durchgeführt wurden, gleich oder höher (\geq) 90 % sein.

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit

11. Eine Bewertung der Inter-Labor-Reproduzierbarkeit ist nicht erforderlich, wenn die vorgeschlagene Methode nur in einem einzigen Labor verwendet werden soll. Für Methoden, die zwischen Laboratorien ausgetauscht werden sollen, sollte die Übereinstimmung zwischen den Einstufungen (UN GHS/EU CLP Kategorie 2 und Keine Kategorie) aus unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Testdurchgängen mit den 20 Referenzsubstanzen, die vorzugsweise in mindestens drei Laboratorien durchgeführt wurden, zwischen diesen Laboratorien gleich oder höher (\geq) 80 % sein.

Vorhersagefähigkeit (Genauigkeit)

12. Die Genauigkeit (Empfindlichkeit, Spezifität und Gesamtgenauigkeit) der vorgeschlagenen vergleichbaren oder modifizierten Methode sollte die der validierten Referenzmethode erreichen oder übertreffen, wobei auch zusätzliche Informationen zur Relevanz für die betreffende Spezies zu berücksichtigen sind (Tabelle 2). Die Empfindlichkeit sollte gleich oder höher (\geq) 80 % sein (2) (8) (23). Eine weitere spezifische Einschränkung gilt allerdings für die Empfindlichkeit der vorgeschlagenen *in vitro*-Methode insofern, als nur zwei *in vivo*-Chemikalien der Kategorie 2, *1-Decanol* und *D-n-propyl disulphid*, von mehr als einem teilnehmenden Labor als Keine Kategorie fehleingestuft werden dürfen. Die Spezifität sollte gleich oder höher (\geq) 70 % sein (2) (8) (23). Es gibt keine weitere Einschränkung für die Spezifität der vorgeschlagenen *in vitro*-Methode, d. h. jedes teilnehmende Labor kann jede *in vivo*-Chemikalie mit der Bezeichnung Keine Kategorie fehleinstufen, solange die Endspezifität der Prüfmethode innerhalb der akzeptablen Bandbreite liegt. Die Gesamtgenauigkeit sollte gleich oder höher (\geq) 75 % sein (2) (8) (23). Obwohl die Empfindlichkeit der validierten Referenzmethode für die in Tabelle 1 aufgeführten 20 Referenzsubstanzen gleich 90 % ist, wird der vorgegebene minimale Empfindlichkeitswert, der erreicht werden muss, damit eine vergleichbare oder modifizierte Methode als gültig erklärt wird, auf 80 % festgelegt, da sowohl *1-Decanol* (eine Grenzchemikalie) als auch *D-n-propyl disulphid* (ein falsch negatives Ergebnis der VRM) als nicht reizend beim Menschen bekannt sind (31) (32) (33), obgleich sie im Kaninchentest als Reizstoffe eingestuft wurden. Da rekonstruierte Modelle menschlicher Epidermis auf Zellen menschlichen Ursprungs basieren, können sie die nicht reizenden Eigenschaften dieser Chemikalien vorhersagen (UN GHS/EU CLP Keine Kategorie).

Tabelle 2. Für die Gültigkeit einer vergleichbaren oder modifizierten Methode benötigte prädiktive Werte im Hinblick auf Empfindlichkeit, Spezifität und Gesamtgenauigkeit.

Empfindlichkeit	Spezifität	Gesamtgenauigkeit
$\geq 80\%$	$\geq 70\%$	$\geq 75\%$

Akzeptanzkriterien der Studie

13. Es ist möglich, dass einer oder mehrere Tests im Zusammenhang mit einer oder mehreren Prüfsubstanzen die Akzeptanzkriterien für die Prüf- und Kontrollsubstanzen nicht erfüllt/erfüllen oder aus anderen Gründen nicht akzeptabel ist/sind. Um fehlende Daten zu ergänzen, sind für jede Prüfsubstanz maximal zwei zusätzliche Prüfungen zulässig („Erneute Prüfung“). Genauer gesagt, da im Fall einer erneuten Prüfung auch PK und NK gleichzeitig getestet werden müssen, dürfen maximal zwei zusätzliche Durchgänge für jede Prüfsubstanz durchgeführt werden.

14. Möglicherweise wird selbst nach der erneuten Prüfung die für jede Prüfsubstanz vorgeschriebene Mindestzahl von drei gültigen Durchgängen nicht für jede Referenzsubstanz in jedem beteiligten Labor erreicht, was zu einer unvollständigen Datenmatrix führen würde. In solchen Fällen sollten alle folgenden drei Kriterien erfüllt werden, damit die Datensätze akzeptiert werden können:
1. Alle 20 Referenzsubstanzen sollten mindestens eine vollständige Durchgangsfolge haben.
 2. In jedem der mindestens drei teilnehmenden Laboratorien müssen mindestens 85 % der Durchgangsfolgen vollständig sein (für 20 Chemikalien; *d. h.* in einem einzelnen Labor sind 3 ungültige Durchgangsfolgen zulässig).
 3. Mindestens 90 % aller möglichen Durchgangsfolgen aus mindestens drei Laboratorien müssen vollständig sein (für 20 Chemikalien, die in 3 Laboratorien geprüft werden; *d. h.* insgesamt sind 6 ungültige Durchgangsfolgen zulässig).“

3. Die nachstehenden Kapitel werden angefügt

„B.49 *In Vitro*-Mikronukleustest an Säugetierzellen

EINLEITUNG

1. Der *in vitro*-Mikronukleustest (MNvit) ist ein Genotoxizitätstest zum Nachweis von Mikronuklei im Zytoplasma von Interphasezellen. Mikronuklei oder Mikrokerne entstehen aus azentrischen Chromosomenfragmenten (d. h. Chromosomen, denen ein Zentromer fehlt) oder aus ganzen Chromosomen, die während der Anaphase der Zellteilung nicht zu den Polen wandern können. Der Test weist die Aktivität klastogener und aneugener chemischer Substanzen (Stoffe und Gemische) (1) (2) in Zellen nach, die während oder nach Kontakt mit der Prüfsubstanz eine Zellteilung durchlaufen haben. Die vorliegende Prüfmethode gestattet die Verwendung von Protokollen mit und ohne den Aktin-Polymerisationsinhibitor Cytochalasin B (cytoB). Die Hinzufügung von cytoB vor der angestrebten Mitose ermöglicht die Identifizierung und selektive Analyse der Mikrokernfrequenz in Zellen, die eine Mitose durchlaufen haben, da solche Zellen zwei Kerne aufweisen (3) (4). Diese Prüfmethode gestattet auch die Verwendung von Protokollen ohne Zytokinese-Block, vorausgesetzt es gibt Beweise dafür, dass die analysierte Zellpopulation eine Mitose durchlaufen hat.
2. Zusätzlich zum MNvit-Test zur Identifizierung chemischer Substanzen (Stoffe und Gemische), die Mikrokerne enthalten, können auch ein Zytokinese-Block, die immunchemische Markierung von Kinetochoren oder die Hybridisierung mit Zentromer- bzw. Telomer-Sonden (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)) Informationen über die Mechanismen der Chromosomenschädigung und der Bildung von Mikrokernen liefern (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Die Markierungs- und Hybridisierungsverfahren können angewandt werden, wenn eine verstärkte Mikrokernbildung festgestellt wird und der Prüfer erkennen will, ob diese Zunahme das Ergebnis klastogener und/oder aneugener Ereignisse ist.
3. Mikrokerne stellen auf Tochterzellen übertragene Schäden dar, während in Metaphasezellen festgestellte Chromosomenaberrationen unter Umständen nicht übertragen werden. Da Mikrokerne in Zellen im Stadium der Interphase mit relativer Objektivität bewertet werden können, muss das Laborpersonal nur feststellen, ob die Zellen eine Teilung durchlaufen haben oder nicht, und wie viele Zellen einen Mikrokern enthalten. Infolgedessen können die Zubereitungen relativ schnell bewertet werden und die Analyse lässt sich automatisieren. Dies macht es praktisch möglich, Tausende statt Hunderte von Zellen pro Behandlung zu bewerten und so die Aussagekraft des Tests zu erhöhen. Da schließlich die Mikrokerne von verzögert transportierten Chromosomen herrühren können, besteht die Möglichkeit, Aneuploidie induzierende Agenzien nachzuweisen, deren Untersuchung in konventionellen Chromosomenaberrationstests nur schwer möglich ist, z. B. OECD-Prüfrichtlinie 473 (Kapitel B.10 dieses Anhangs) (17). Allerdings gestattet der MNvit-Test die Differenzierung zwischen Polyploidie induzierenden und Klastogenizität verursachenden Chemikalien nur, wenn besondere Techniken wie die in Absatz 2 beschriebene FISH eingesetzt werden.

4. Der MNvit-Test ist eine *in vitro*-Methode, bei der in der Regel kultivierte menschliche Zellen oder Nagetierzellen zum Einsatz kommen. Der Test bildet eine breite Basis für die *in vitro*-Erforschung potenzieller Chromosomenschädigungen, da sowohl Aneugene als auch Klastogene nachgewiesen werden können.
5. Der MNvit-Test ist zuverlässig und wirksam bei einer Vielfalt von Zelltypen und kann mit oder ohne Zusatz von cytoB durchgeführt werden. Umfassende Daten belegen die Validität des MNvit-Tests im Zusammenhang mit unterschiedlichen Nagetierzelllinien (CHO, V79, CHL/IU und L5178Y) sowie menschlichen Lymphozyten (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Hierzu zählen insbesondere die internationalen Validierungsstudien, koordiniert durch die Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22), und die Berichte des International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Die verfügbaren Daten wurden außerdem vom Europäischen Zentrum zur Validierung von Alternativmethoden (ECVAM) der Europäischen Kommission in einer retrospektiven Validierungsstudie nach dem *Weight-of-evidence*-Ansatz neu bewertet, und die Prüfmethode wurde vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVM als wissenschaftlich validiert anerkannt (32) (33) (34). Die Verwendung von menschlichen Lymphoblastoidzellen der Zelllinie TK6 (35), von HepG2-Zellen (36) (37) und von primären Embryonalzellen des Syrischen Hamsters (38) wurde beschrieben, obwohl diese Zellen nicht in Validierungsstudien verwendet wurden.

DEFINITIONEN

6. Es gelten die Definitionen gemäß Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. *In vitro* durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Stoffwechsel-Aktivierungssystems, sofern die Zellen nicht im Hinblick auf die zu prüfenden Substanzen metabolisch kompetent sind. Mit diesem exogenen Stoffwechsel-Aktivierungssystem lassen sich die *in vivo*-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind auch Bedingungen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Ergebnisse führen, die nicht die intrinsische Mutagenität widerspiegeln und möglicherweise aus Faktoren wie markanten Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität oder hochgradiger Zytotoxizität herrühren (39) (40) (41). Wenn die Prüfsubstanz zum Zeitpunkt der Hinzufügung eine Änderung im pH-Wert des Mediums auslöst, sollte der pH-Wert entsprechend angepasst werden, vorzugsweise durch Pufferung der Stammlösung, so dass alle Volumina bei allen Prüfkonzentrationen und für sämtliche Kontrollen gleich bleiben.
8. Zur Analyse der Mikrokerninduktion ist es wesentlich, dass sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Kulturen eine Mitose durchlaufen haben. Das informativste Stadium für die Auswertung von Mikrokernen liegt in Zellen vor, die eine Mitose während oder nach der Behandlung mit der Prüfsubstanz vollzogen haben.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

9. Zellkulturen menschlichen Ursprungs oder von Säugetieren werden sowohl mit als auch ohne Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems in Kontakt mit der Prüfsubstanz gebracht, außer wenn Zellen mit eigener adäquater Metabolisierungskapazität verwendet werden. Für alle Tests sind parallelaufende Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen und Positivkontrollen anzulegen.

10. Während oder nach dem Kontakt mit der Prüfsubstanz werden die Zellen so lange kultiviert, dass Chromosomen- oder Spindelschäden zur Bildung von Mikrokernen in Interphasezellen führen können. Zur Induktion einer Aneuploidie sollte die Prüfsubstanz während der Mitose vorhanden sein. Geerntete und gefärbte Interphasezellen werden auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht. Im Idealfall sollten Mikrokerne nur in Zellen ausgewertet werden, die während oder ggf. nach Kontakt mit der Prüfsubstanz eine Mitose durchlaufen haben. In Kulturen, die mit einem Zytokinese-Blocker behandelt wurden, werden deshalb nur zweikernige Zellen ausgewertet. Wenn kein Zytokinese-Blocker verwendet wurde, ist es wichtig nachzuweisen, dass die analysierten Zellen mutmaßlich während oder nach dem Kontakt mit der Prüfsubstanz eine Zellteilung durchlaufen haben. Bei allen Protokollen ist es wichtig nachzuweisen, dass sowohl in den Kontrollkulturen als auch in den behandelten Kulturen eine Zellproliferation stattgefunden hat. Das Ausmaß der von der Prüfsubstanz induzierten Zytotoxizität oder Zytostase sollte in den Kulturen (oder Parallelkulturen) bewertet werden, die auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht werden.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Vorbereitungen

11. Es können kultivierte primäre Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen (5) (19) (42) (43) sowie verschiedene Zelllinien von Nagetieren wie CHO, V79, CHL/IU und L5178Y verwendet werden (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Die Verwendung anderer Zelllinien und -typen sollte anhand ihrer nachgewiesenen Leistung im Test begründet werden, wie im Abschnitt „Akzeptanzkriterien“ beschrieben. Da die Hintergrundfrequenz von Mikrokernen die Empfindlichkeit des Tests beeinflusst, empfiehlt es sich, Zelltypen mit einer niedrigen und stabilen Hintergrundfrequenz der Mikrokernbildung zu verwenden.
12. Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen sollten jungen (ca. 18- bis 35-jährigen) gesunden, nicht rauchenden Individuen entnommen werden, die bekanntermaßen in letzter Zeit nicht mit genotoxischen Chemikalien oder Strahlung in Kontakt waren. Wenn Zellen von mehr als einem Spender zur Verwendung gepoolt werden, sollte die Zahl der Spender angegeben werden. Die Mikrokernfrequenz nimmt mit fortschreitendem Alter zu. Dieser Trend ist bei Frauen ausgeprägter als bei Männern (44), was bei der Auswahl von Spenderzellen für die gepoolte Auswertung berücksichtigt werden sollte.

Kulturmedien und Inkubationsbedingungen

13. Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, CO₂-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu verwenden. Etablierte Zelllinien und -stämme sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und Mykoplasma-verunreinigung zu überprüfen und sollten bei Verunreinigung oder bei Veränderungen der modalen Chromosomenzahl nicht herangezogen werden. Die normale Zellzyklusdauer sollte zur Festlegung der Inkubationsbedingungen im Prüflabor bekannt sein. Bei Anwendung der Zytokinese-Block-Methode sollte die Konzentration des Zytokinese-Hemmers für den betreffenden Zelltyp optimiert werden und nachweislich eine gute Ausbeute an zweikernigen Zellen zur Auswertung ergeben.

Vorbereitung der Kulturen

14. Etablierte Zelllinien und -stämme: Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass vor dem Zeitpunkt der Gewinnung Kulturen in Monolagen nicht konfluent werden und Suspensionskulturen keine übermäßige Dichte erreichen. Die Kulturen werden bei 37 °C inkubiert.
15. Lymphozyten: Mit einem Antikoagulans (z. B. Heparin) behandeltes Vollblut oder separierte Lymphozyten werden vor dem Kontakt mit der Prüfsubstanz und cytoB unter Einwirkung eines Mitogens (z. B. Phytohämagglutinin) inkubiert.

Stoffwechsel-Aktivierung

16. Bei Zellen mit ungeeigneter endogener Stoffwechselkapazität sollten exogene metabolisierende Systeme eingesetzt werden. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (45) (46) oder einem Gemisch aus Phenobarbital und β-Naphthoflavon (46) (47) (48) (49) vorbehandelt wurden. Das letztgenannte Gemisch verstößt weder gegen das Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe (50) noch gegen die Verordnung (EG) Nr. 850/2004 über persistente organische Schadstoffe (66) und hat sich bei der Induktion von Mischfunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (46) (47) (48) (49). Im Endmedium wird die S9-Fraktion in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 10 % v/v verwendet. Die Bedingungen des Metabolisierungssystems können von der geprüften chemischen Klasse abhängig sein. In manchen Fällen ist es sinnvoll, mehr als eine S9-Konzentration zu verwenden.
17. Gentechnisch veränderte Zelllinien zur Expression spezifischer Aktivierungsenzyme bei Menschen oder Nagetieren machen möglicherweise den Einsatz exogener Metabolisierungssysteme entbehrlich und könnten als Prüfzellen verwendet werden. In solchen Fällen sollte die Auswahl der verwendeten Zelllinien wissenschaftlich begründet werden, z. B. mit der Relevanz der Mischfunktionsoxidasen für den Stoffwechsel der Prüfsubstanz (51) und mit ihrer Reaktionsfähigkeit auf bekannte Klastogene und Aneugene (siehe besonderer Abschnitt über Akzeptanzkriterien). Es ist zu beachten, dass die geprüfte Substanz unter Umständen nicht von der/den zur Expression gebrachten Mischfunktionsoxidase(n) verstoffwechselt wird; in diesem Fall würden die negativen Ergebnisse nicht anzeigen, dass die Prüfsubstanz keine Mikrokerne induzieren kann.

Prüfsubstanzvorbereitung

18. Feste Chemikalien sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst und ggf. verdünnt werden. Flüssige Chemikalien können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Chemikalien sind mit Hilfe geeigneter Änderungen der Standardprotokolle, wie z. B. Behandlung in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (52) (53), zu prüfen. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Lagerungsstabilität der Substanz wird nachgewiesen.

Prüfbedingungen

Lösungsmittel/Vehikel

19. Das Lösungsmittel/Vehikel sollte mit der Prüfsubstanz keine chemische Reaktion eingehen, und es sollte mit dem Überleben der Zellen und der S9-Aktivität in der verwendeten Konzentration kompatibel sein. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet (z. B. Wasser, ein Zellkulturmedium, Dimethylsulfoxid), so sind Daten über ihre Kompatibilität mit der Prüfsubstanz und über das Nichtvorliegen einer genetischen Toxizität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

Verwendung von cytoB als Zytokinese-Blocker

20. Eine der wichtigsten Überlegungen bei der Durchführung des MNvit-Tests gilt der Vergewisserung, dass die bewerteten Zellen während der Behandlung oder ggf. während der Inkubationszeit nach der Behandlung eine Mitose durchlaufen haben. CytoB ist das am häufigsten verwendete Agens zur Zytokinese-Blockierung, da es den Aktinaufbau hemmt und somit die Trennung der Tochterzellen nach der Mitose verhindert, was wiederum zur Bildung zweikerniger Zellen führt (5) (54) (55). Die Auswertung von Mikrokernen kann daher auf Zellen beschränkt werden, die während oder nach der Behandlung eine Mitose vollzogen haben. Zugleich kann die Auswirkung der Prüfsubstanz auf die Zellproliferationskinetik gemessen werden. CytoB sollte bei der Verwendung menschlicher Lymphozyten als Zytokinese-Blocker eingesetzt werden, da die Zellzyklendauer innerhalb der Kulturen und zwischen einzelnen Spendern variiert und da nicht alle Lymphozyten auf Phytohämagglutinin reagieren. Andere Methoden wurden für Tests an Zelllinien eingesetzt, um zu bestimmen, ob die bewerteten Zellen eine Teilung durchlaufen haben; diese Methoden werden weiter unten erläutert (siehe Absatz 26).
21. Für jeden Zelltyp sollte das Labor die geeignete cytoB-Konzentration festlegen, um in den Lösungsmittel-/Vehikelkontrollkulturen eine optimale Frequenz der zweikernigen Zellen zu erreichen. Die geeignete cytoB-Konzentration liegt in der Regel zwischen 3 und 6 µg/ml.

Messung von Zellproliferation und Zytotoxizität und Auswahl der Expositionskonzentrationen

22. Bei der Festlegung der höchsten zu testenden Konzentration der Prüfsubstanz sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, wie z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität, Ausfällungen im Kulturmedium oder ausgeprägten Änderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (39) (40) (41).
23. Es werden Messungen der Zellproliferation durchgeführt, um sicherzustellen, dass die behandelten Zellen während des Tests eine Mitose durchlaufen haben und dass die Behandlungen bei geeigneten Zytotoxizitätsniveaus durchgeführt werden (siehe Absatz 29). Die Zytotoxizität sollte mit und ohne Stoffwechsel-Aktivierung in Zellen bestimmt werden, die eine Stoffwechsel-Aktivierung benötigen. Hierzu wird die relative Erhöhung der Zellzahl (RICC) oder die relative Populationsverdopplung (RPD) verwendet (entsprechende Formeln vgl. Anlage 2), wenn nicht cytoB zum Einsatz kommt. Wenn cytoB verwendet wird, kann die Zytotoxizität mittels des Replikationsindex (RI) bestimmt werden (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

24. Die Behandlung von Kulturen mit cytoB und die Messung der relativen Frequenzen von einkernigen, zweikernigen und mehrkernigen Zellen in der Kultur sind ein genaues Verfahren zur Quantifizierung des Effekts auf die Zellproliferation und die zytotoxische oder zytostatische Wirkung einer Behandlung (5) und stellen sicher, dass nur Zellen bewertet werden, die während oder nach der Behandlung eine Teilung vollzogen haben.
25. In Studien mit cytoB kann die Zytostase/Zytotoxizität mittels des Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) quantifiziert werden (5) (26) (56) oder vom RI bei mindestens 500 Zellen pro Kultur abgeleitet werden (entsprechende Formeln vgl. Anlage 2). Wenn cytoB zur Bewertung der Zellproliferation verwendet wird, sollte von mindestens 500 Zellen pro Kultur ein CBPI oder RI festgelegt werden. Diese Messungen können unter anderen verwendet werden, um die Zytotoxizität durch den Vergleich der Werte in behandelten Kulturen und Kontrollkulturen zu bewerten. Die Bewertung anderer Zytotoxizitäts-Marker (z. B. Konfluenz, Zellzahl, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung) kann ebenfalls nützliche Informationen liefern.
26. In Studien ohne cytoB muss nachgewiesen werden, dass die in der Kultur bewerteten Zellen während oder nach Behandlung mit der Prüfsubstanz eine Teilung durchlaufen haben. Andernfalls kann es zu falsch negativen Reaktionen kommen. Um die Auswertung geteilter Zellen sicherzustellen, werden folgende Methoden eingesetzt: die Hinzufügung und der spätere Nachweis von Bromodeoxyuridin (BrdU) zur Identifikation replizierter Zellen (57), die Bildung von Klonen, wenn Zellen permanenter Zelllinien behandelt und *in situ* auf einem Mikroskop-Objektträger ausgewertet werden (Proliferationsindex (PI)) (25) (26) (27) (28), oder die Messung der Relativen Populationsverdopplung (RPD) bzw. der Relativen Erhöhung der Zellzahl (RICC) sowie andere bewährte Methoden (16) (56) (58) (59) (entsprechende Formeln vgl. Anlage 2). Die Bewertung anderer Marker für Zytotoxizität oder Zytostase (z. B. Konfluenz, Zellzahl, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung) kann ebenfalls nützliche Informationen liefern.
27. Es sind mindestens drei analysierbare Prüfkonzentrationen zu bewerten. Um dies zu erreichen, kann es notwendig sein, den Versuch mit einer größeren Zahl dicht aufeinander folgender Konzentrationen durchzuführen und die Mikrokernbildung in den Konzentrationen zu analysieren, die die geeignete Bandbreite der Zytotoxizitätswerte ergeben. Eine alternative Strategie wäre ein vorläufiger Zytotoxizitätstest zur Einengung des Spektrums für den definitiven Test.
28. Die Höchstkonzentration sollte darauf abzielen, eine Zytotoxizität von $55 \pm 5\%$ hervorzurufen. Höhere Niveaus könnten Chromosomenschäden als Sekundäreffekt der Zytotoxizität induzieren (60). Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten die ausgewählten Prüfkonzentrationen die Bandbreite von der Erzeugung einer Zytotoxizität von $55 \pm 5\%$ bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen.
29. Wenn keine Zytotoxizität oder keine Ausfälle festgestellt werden, sollte die Höchstkonzentration bei Versuchen 0,01 M, 5 mg/mL oder 5 µl/ml betragen, je nachdem, welcher Wert am niedrigsten ist. Zwischen den für die Analyse gewählten Konzentrationen sollten im Allgemeinen Abstände von jeweils höchstens 10 liegen. Bei Prüfsubstanzen mit einer steilen Konzentrations-Wirkungs-Kurve kann es notwendig sein, die Konzentrationsabstände der Prüfsubstanz enger zu bemessen, damit auch Kulturen im mäßigen und niedrigen Toxizitätsbereich ausgewertet werden.

30. Falls die Löslichkeit ein begrenzender Faktor ist, sollte die Höchstkonzentration - falls keine Einschränkung durch Zytotoxizität gegeben ist - die geringste Konzentration sein, bei der eine minimale Ausfällung in den Kulturen sichtbar ist, sofern dabei keine Interferenzen mit der Auswertung auftreten. Die Bewertung von Ausfällungen sollte mit Methoden wie der Lichtmikroskopie erfolgen, wobei festzustellen ist, ob Ausfällungen während der Inkubation andauern oder (gegen Ende der Behandlung) auftreten.

Kontrollen

31. Für jeden Versuch sind parallel laufende Positiv- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen mit und ohne Zusatz eines Stoffwechsel-Aktivierungssystems anzulegen.
32. Positivkontrollen werden benötigt, um die Fähigkeit der verwendeten Zellen und des Testprotokolls zur Identifizierung von Klastogenen und Aneugenen nachzuweisen und die Stoffwechselkapazität der S9-Zubereitung zu bestätigen. Zur Positivkontrolle sollten bekannte Induktoren der Mikrokernebildung in Konzentrationen verwendet werden, die voraussichtlich eine geringe, aber reproduzierbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt. Die PK-Konzentrationen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen.
33. Zum Nachweis der Stoffwechselkapazität und der Fähigkeit des Testsystems zur Erkennung von Klastogenen sollte ein Klastogen verwendet werden, das eine Stoffwechsel-Aktivierung benötigt (z. B. Zyklophosphamid; Benzo[a]pyren). Sofern begründet, können weitere Positivkontrollen verwendet werden. Da einige Positivkontrollen, die eine Stoffwechsel-Aktivierung benötigen, unter bestimmten Behandlungsbedingungen oder in bestimmten Zelllinien auch ohne exogene Stoffwechsel-Aktivierung wirken können, sollten die Notwendigkeit der Stoffwechsel-Aktivierung und die Wirkung der S9-Zubereitung in der gewählten Zelllinie und den gewählten Konzentrationen geprüft werden.
34. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind keine Aneugene bekannt, die zu ihrer genotoxischen Wirkung eine Stoffwechsel-Aktivierung benötigen (16). Im Allgemeinen akzeptierte Positivkontrollen für eine aneogene Wirkung sind zum Beispiel Colchicin und Vinblastin. Es können auch andere Chemikalien verwendet werden, sofern sie Mikrokerne nur oder primär durch ihre aneogene Wirkung induzieren. Um zu vermeiden, dass zwei PK (für Klastogenizität und Aneugenizität) ohne Stoffwechsel-Aktivierung benötigt werden, kann die Aneugenizitätskontrolle als PK ohne S9 dienen, und die Klastogenizitätskontrolle kann verwendet werden, um die Eignung des eingesetzten Stoffwechsel-Aktivierungssystems zu prüfen. Positivkontrollen für Klastogenizität und Aneugenizität sollten in Zellen verwendet werden, die kein S9 benötigen. Die empfohlenen Positivkontrollen sind in Anlage 3 aufgeführt.
35. Die Verwendung einer Positivkontrolle derselben chemischen Klasse kann in Erwägung gezogen werden, wenn geeignete Chemikalien zur Verfügung stehen. Alle Positivkontrollen sollten für den Zelltyp und die Aktivierungsbedingungen geeignet sein.

36. Für jeden Erntezeitpunkt sind Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen anzulegen. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Negativkontrollen (ohne Lösungsmittel/Vehikel) verwendet werden, soweit nicht veröffentlichte oder laborspezifische historische Kontrolldaten belegen, dass das gewählte Lösungsmittel in den verwendeten Konzentrationen keine genotoxischen oder sonstigen schädlichen Wirkungen hervorruft.

TESTVERFAHREN

Behandlungsplan

37. Um die Wahrscheinlichkeit zu maximieren, dass ein Aneugen oder Klastogen in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus erkannt wird, muss eine ausreichende Anzahl an Zellen während aller Stadien ihrer Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt werden. Der Behandlungsplan für Zelllinien und primäre Zellkulturen kann daher in gewisser Weise von dem für Lymphozyten abweichen, die für den Beginn ihres Zellzyklus einer mitogenen Stimulation bedürfen. Hierauf wird in den Absätzen 41-43 genauer eingegangen (16).
38. Theoretische Überlegungen und veröffentlichte Daten (18) legen nahe, dass die meisten Aneogene und Klastogene entdeckt werden, wenn eine kurze Behandlung von 3 bis 6 Stunden mit oder ohne Vorhandensein von S9 erfolgt, worauf die Prüfsubstanz entfernt wird und sich eine Wachstumsperiode von 1,5-2,0 Zellzyklen anschließt (6). Die Zellen werden in einem Zeitraum beprobt, der etwa der 1,5-fachen bis 2-fachen Dauer des normalen (*d. h.* unbehandelten) Zellzyklus entweder nach Behandlungsbeginn oder nach Ende der Behandlung entspricht (siehe Tabelle 1). Die Zeiträume für die Probenahme oder Regenerierung können ausgedehnt werden, wenn bekannt ist oder der Verdacht besteht, dass die Prüfsubstanz die Dauer des Zellzyklus beeinflusst (*z. B.* bei der Prüfung von Nucleosidanalogen).
39. Aufgrund der potenziellen zytotoxischen Wirkung von S9-Zubereitungen auf kultivierte Säugetierzellen wird eine verlängerte Expositionsbehandlung der 1,5-fachen bis 2-fachen Dauer des normalen Zellzyklus nur ohne Vorhandensein von S9 vorgenommen. Bei der verlängerten Behandlung werden Optionen angeboten, um eine Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz mit oder ohne cytoB zu ermöglichen. Diese Optionen gelten für Situationen, in denen Befürchtungen hinsichtlich der möglichen Wechselwirkung zwischen der Prüfsubstanz und cytoB bestehen.
40. Die empfohlenen Zellbehandlungspläne sind in Tabelle 1 aufgeführt. Es handelt sich um allgemeine Behandlungspläne, die je nach der Stabilität oder Reaktivität der Prüfsubstanz oder den besonderen Wachstumseigenschaften der verwendeten Zellen modifiziert werden können. Alle Behandlungen sollten während des exponentiellen Wachstums der Zellen einsetzen und enden. Die genannten Pläne werden ausführlicher in den nachstehenden Absätzen 41-47 vorgestellt.

Tabelle 1. Pläne für Zellbehandlung und -gewinnung beim MNvit-Test

Lymphozyten, Primärzellen und Zelllinien, die <u>mit</u> cytoB behandelt wurden	+ S9	3-6 Stunden Behandlung in Anwesenheit von S9; Entfernung von S9 und Behandlungsmedium; Zugabe von neuem Medium und cytoB; Zellgewinnung nach 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.
	- S9 Kurze Exposition	3-6 Stunden Behandlung; Entfernung des Behandlungsmediums; Zugabe von neuem Medium und cytoB; Zellgewinnung nach 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.
	- S9 Verlängerte Exposition	<u>Option A</u> : Behandlung über 1,5-2,0 normale Zellzyklen in Anwesenheit von cytoB; Gewinnung am Ende der Expositionsduer. <u>Option B</u> : Behandlung über 1,5-2,0 normale Zellzyklen; Entfernung der Prüfsubstanz; Zugabe von neuem Medium und cytoB; Zellgewinnung nach 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.
Zelllinien, die <u>ohne</u> cytoB behandelt wurden (Ebenso wie die oben genannten Behandlungspläne mit der Ausnahme, dass kein cytoB zugegeben wird)		

Lymphozyten, Primärzellen und Zelllinien mit cytoB

41. Bei Lymphozyten ist es am wirksamsten, die Exposition gegenüber der Prüfsubstanz 44-48 Stunden nach der PHA-Stimulation zu beginnen, wenn die Zyklussynchronisierung nicht mehr feststellbar ist (5). Bei dem anfänglichen Test werden die Zellen über einen Zeitraum von 3-6 Stunden mit und ohne Zusatz von S9 mit der Prüfsubstanz behandelt. Das Behandlungsmedium wird entfernt und durch ein frisches Medium, das cytoB enthält, ersetzt. Die Zellgewinnung erfolgt nach weiteren 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.
42. Wenn beide anfänglichen Tests nach der kurzen (3- bis 6-stündigen) Behandlung zu negativen oder nicht eindeutigen Ergebnissen führen, erfolgt eine weitere verlängerte Expositionsbehandlung ohne S9. Zwei weitere Behandlungsoptionen sind verfügbar und gleichermaßen akzeptabel. Möglicherweise ist es jedoch sinnvoller, Option A mit stimulierten Lymphozyten anzuwenden, da das exponentielle Wachstum 96 Stunden nach der Stimulation abnehmen dürfte. Ebenso sollten die Zellkulturen zum Zeitpunkt der abschließenden Probenahme in Option B noch nicht konfluent geworden sein.
 - Option A: Die Zellen werden über 1,5 bis 2,0 normale Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt und die Gewinnung erfolgt am Ende der Behandlungsduer.

- Option B: Die Zellen werden über 1,5 bis 2,0 normale Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt. Das Behandlungsmedium wird entfernt und durch ein frisches Medium ersetzt. Die Zellgewinnung erfolgt nach zusätzlichen 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.
43. Primärzellen und Zelllinien sollten ähnlich wie Lymphozyten behandelt werden. Es ist allerdings nicht notwendig, sie für 44 - 48 Stunden mit PHA zu stimulieren. Andere Zellen als Lymphozyten sollten so exponiert werden, dass sich die Zellen bei Abschluss des Versuchs immer noch im Log-Phase-Wachstum befinden.

Zelllinien ohne cytoB

44. Die Zellen sollten über einen Zeitraum von 3-6 Stunden mit und ohne Zusatz von S9 behandelt werden. Das Behandlungsmedium wird entfernt und durch ein frisches Medium ersetzt. Die Zellgewinnung erfolgt nach zusätzlichen 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.
45. Wenn beide anfänglichen Tests nach der kurzen (3- bis 6-stündigen) Behandlung zu negativen oder nicht eindeutigen Ergebnissen führen, erfolgt eine weitere verlängerte Expositionsbehandlung (ohne S9). Zwei weitere Behandlungsoptionen sind verfügbar und beide gleichermaßen akzeptabel:
- Option A: Die Zellen werden über 1,5 bis 2,0 normale Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt und die Gewinnung erfolgt am Ende der Behandlungsdauer.
 - Option B: Die Zellen werden über 1,5 bis 2,0 normale Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt. Das Behandlungsmedium wird entfernt und durch ein frisches Medium ersetzt. Die Zellgewinnung erfolgt nach zusätzlichen 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.
46. In Monolagern können am Ende der 3- bis 6-stündigen Behandlung mitotische Zellen vorhanden sein (diese sind daran zu erkennen, dass sie rund sind und sich von der Oberfläche lösen). Da diese mitotischen Zellen sich leicht lösen, können sie bei Entfernung des Mediums mit der Prüfsubstanz verloren gehen. Es ist sorgfältig darauf zu achten, diese Zellen beim Spülen der Kulturen aufzufangen und sie in die Kulturen zurückzugeben, damit nicht in Mitose befindliche Zellen, die das Risiko einer Mikrokernbildung aufweisen, zum Zeitpunkt der Gewinnung unberücksichtigt bleiben.

Anzahl der Kulturen

47. Für jede Konzentration der Prüfsubstanz sowie für die Vehikel-/Lösungsmittelkulturen und Kontrollkulturen sollten zwei gleichzeitige Kulturen angelegt werden. Lässt sich anhand von historischen Labordaten nachweisen, dass zwischen den Zweifachkulturen nur eine minimale Abweichung besteht, so ist ggf. die Verwendung von Einfachkulturen vertretbar. Wenn Einfachkulturen verwendet werden, wird die Analyse einer erhöhten Anzahl von Konzentrationen empfohlen.

Zellgewinnung und Präparation des Objektträgers

48. Jede Kultur wird gesondert gewonnen und aufgearbeitet. Die Zellpräparation kann eine Behandlung mit hypotoner Lösung beinhalten, dieser Schritt ist jedoch nicht notwendig, wenn eine angemessene Ausbreitung der Zellen anderweitig sichergestellt wird. Bei der Präparation der Objektträger können verschiedene Techniken verwendet werden, vorausgesetzt, es werden Zellpräparate hoher Qualität zur Auswertung bereitgestellt. Dabei sollte Zytoplasma zurückgehalten werden, um die Erkennung von Mikrokernen sowie (bei der Zytokinese-Block-Methode) die zuverlässige Identifizierung zweikerniger Zellen zu ermöglichen.
49. Die Objektträger können mit verschiedenen Verfahren gefärbt werden, wie zum Beispiel mit Giemsa oder fluoreszierenden DNA-spezifischen Farbstoffen (59). Durch Verwendung eines DNA-spezifischen Farbstoffs (z. B. Acridin Orange (61) oder Höchst 33258 Plus Pyronin-Y (62)) lassen sich bestimmte Artefakte vermeiden, die bei Verwendung eines nicht DNA-spezifischen Farbstoffs auftreten. Zur Identifizierung des Inhalts (Chromosomen/Chromosomenfragmente) von Mikrokernen können Anti-Kinetochor-Antikörper, FISH mit panzentromerischen DNA-Sonden oder eine präparierte *in situ*-Markierung mit panzentromer-spezifischen Primern, zusammen mit der geeigneten DNA-Gegenfärbung, verwendet werden, wenn mechanistische Informationen zu ihrer Bildung benötigt werden (15) (16). Andere Methoden zur Unterscheidung zwischen Klastogenen und Aneugen können ebenfalls verwendet werden, wenn sie sich als wirksam erwiesen haben.

Analyse

50. Alle Objektträger, auch die für die Lösungsmittel-/Vehikelgruppen und die Kontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Alternativ dazu können kodierte Proben mittels eines validierten automatisierten Analysesystems (Durchflusszytometrie oder Bildanalyse) untersucht werden.
51. In Kulturen, die mit cytoB behandelt wurden, sollten die Mikrokernfrequenzen von mindestens 2000 zweikernigen Zellen pro Konzentration (mindestens 1000 zweikernige Zellen pro Kultur; zwei Kulturen pro Konzentration) analysiert werden. Wenn Einfachkulturen verwendet werden, sollten in einer solchen Kultur mindestens 2000 zweikernige Zellen pro Konzentration ausgewertet werden. Wenn wesentlich weniger als 1000 zweikernige Kellen pro Kultur, bzw. 2000 bei Einfachkulturen, in jeder Konzentration für die Auswertung zur Verfügung stehen, und wenn keine signifikante Zunahme an Mikrokernen festgestellt wird, sollte der Versuch mit einer höheren Anzahl an Zellen oder mit weniger toxischen Konzentrationen durchgeführt werden, je nachdem, was angemessen ist. Es sollte darauf geachtet werden, keine zweikernigen Zellen auszuwerten, die unregelmäßige Formen aufweisen oder deren zwei Kerne in der Größe beträchtlich voneinander abweichen; außerdem sollten zweikernige Zellen nicht mit schlecht auf dem Träger verteilten mehrkernigen Zellen verwechselt werden. Zellen mit mehr als zwei Hauptkernen sollten nicht auf Mikrokerne untersucht werden, da in diesen Zellen die zugrunde liegende Mikrokernfrequenz höher sein könnte (63) (64). Die Auswertung einkerniger Zellen ist akzeptabel, wenn die Prüfsubstanz nachweislich mit der Wirkung von cytoB interferiert.

52. In Zelllinien, die ohne cytoB-Behandlung getestet wurden, sollten die Mikrokerne in mindestens 2000 Zellen pro Konzentration (mindestens 1000 Zellen pro Kultur; zwei Kulturen pro Konzentration) ausgewertet werden. Wenn nur eine Kultur pro Konzentration verwendet wird, sollten in dieser Kultur mindestens 2000 Zellen ausgewertet werden.
53. Wenn cytoB verwendet wird, sollte von mindestens 500 Zellen pro Kultur ein CBPI oder RI zur Bewertung der Zellproliferation (siehe Anlage 2) festgelegt werden. Wenn die Behandlungen in Abwesenheit von cytoB durchgeführt werden, muss unbedingt nachgewiesen werden, dass die ausgewerteten Zellen proliferiert haben, wie in den Absätzen 24-27 erläutert.

Akzeptanzkriterien

54. Ein Labor, das die Durchführung des in dieser Prüfmethode beschriebenen MNvit-Tests anbietet, sollte nachweisen, dass es in der Lage ist, mit Hilfe der in Anlage 3 aufgeführten Referenzsubstanzen Chemikalien mit bekannter aneugener und klastogener Wirkung, mit und ohne Stoffwechsel-Aktivierung, sowie auch bekannte negative Chemikalien, zuverlässig und genau festzustellen. Als Nachweis seiner Fähigkeit, diese Prüfmethode ordnungsgemäß anzuwenden, sollte das Labor belegen, dass die auf Mikrokernbildung untersuchten Zellen eine Kernteilung durchlaufen haben, wenn der Test ohne cytoB durchgeführt wird.
55. Die Substanzen in Anlage 3 sind die zur Verwendung empfohlenen Referenzsubstanzen. Ersatzstoffe oder zusätzliche Chemikalien können einbezogen werden, wenn ihre Wirkung bekannt ist, wenn sie Mikrokerne mittels derselben Wirkmechanismen induzieren und wenn sie sich als relevant für die Chemikalien erweisen, die mit dem MNvit-Verfahren geprüft werden. Die Begründung könnte eine Validierungsstudie enthalten, die entweder auf einer breiten Auswahl an Substanzen beruht oder sich auf ein engeres Spektrum auf der Grundlage der chemischen Klasse der Prüfsubstanz oder des untersuchten Schädigungsmechanismus konzentriert.
56. Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen und unbehandelte Kulturen sollten reproduzierbar niedrige und gleichbleibende Mikrokernfrequenzen zeigen (in der Regel 5-25 Mikrokerne pro 1000 Zellen für die in Absatz 11 genannten Zelltypen). Andere Zelltypen können hiervon abweichende Reaktionsbereiche aufweisen, die bei ihrer Validierung zur Verwendung im MNvit-Test bestimmt werden sollten. Daten von Negativ-, Lösungsmittel- und Positivkontrollen sollten herangezogen werden, um historische Kontrollbereiche festzulegen. Diese Werte sollten bei Entscheidungen über die Eignung einer gleichzeitigen Negativkontrolle/Positivkontrolle für einen Versuch zugrunde gelegt werden.
57. Wenn für den Test geringfügige Änderungen des Protokolls vorgeschlagen werden (z. B. Verwendung automatisierter statt manueller Auswertungsverfahren; Verwendung eines neuen Zelltyps), sollte die Wirksamkeit der Änderung nachgewiesen werden, bevor das geänderte Protokoll als einsatztauglich befunden werden kann. Der Wirksamkeitsnachweis beinhaltet den Beweis, dass wesentliche Mechanismen wie Chromosomenbrüche oder Hinzugewinn bzw. Verlust von Chromosomenmaterial festgestellt werden können, und dass die entsprechenden positiven und negativen Ergebnisse für die Klasse der einzelnen Prüfsubstanz oder für die gesamte Bandbreite der zu testenden Substanzen erzielt werden können.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Behandlung der Ergebnisse

58. Bei Verwendung des Zytokinese-Block-Verfahrens werden nur die Frequenzen zweikerniger Zellen mit Mikrokernen (unabhängig von der Anzahl der Mikrokerne pro Zelle) zur Bewertung der Mikrokern-Induktion herangezogen. Die Auswertung der Anzahl an Zellen mit einem, zwei oder mehr Mikrokernen könnte nützliche Informationen liefern, ist jedoch nicht zwingend notwendig.
59. Festzulegen sind auch Maßnahmen, die gleichzeitig zur Bestimmung der Zytotoxizität und/oder Zytostase aller behandelten und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollkulturen durchgeführt werden (58). Der CBPI oder der RI sollte für alle behandelten Kulturen und Kontrollkulturen berechnet werden, da sich bei Verwendung des Zytokinese-Block-Verfahrens die Messungen des Zellzyklus verzögern. Kommt cytoB nicht zum Einsatz, sollten die Relative Populationsverdopplung (RPD), die Relative Erhöhung der Zellzahl (RICC) oder der Proliferationsindex (PI) herangezogen werden (siehe Anlage 2).
60. Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden.
61. Wenn Chemikalien im MNvit-Test Mikrokerne induzieren, könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass sie Chromosomenbrüche, Chromosomenverlust oder eine Kombination aus beidem verursachen. Deshalb können weitere Analysen unter Einsatz von Anti-Kinetochor-Antikörpern, zentromer-spezifischen *in situ*-Sonden oder mit Hilfe sonstiger Methoden vorgenommen werden, um festzustellen, ob der Mechanismus der Mikrokern-Induktion von einer klastogenen und/oder aneugenen Wirkung herröhrt.

Bewertung und Interpretation der Ergebnisse

62. Bei einer eindeutigen positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung durch zusätzliche Versuche nicht erforderlich. Zur Klärung nicht eindeutiger Ergebnisse empfiehlt sich die Analyse von weiteren 1000 Zellen aller Kulturen, um die erforderliche Verblindung aufrechtzuerhalten. Sollte diese Methode nicht zur Klärung des Ergebnisses führen, müssen weitere Tests durchgeführt werden. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter mit Erweiterung oder Verengung des Bedingungsumfangs in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Prüfkonzentrationen, der Zeitplan für Behandlung und Zellgewinnung und/oder die Bedingungen für die Stoffwechsel-Aktivierung.
63. Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine konzentrationsbezogene Zunahme oder eine statistisch signifikante Zunahme der Anzahl der Zellen mit Mikrokernen. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Die Betrachtung der Frage, ob die festgestellten Werte innerhalb oder außerhalb des historischen Kontrollbereichs liegen, kann Anhaltspunkte für die Bewertung der biologischen Relevanz der Reaktion liefern. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können geeignete statistische Methoden dienen (65). Allerdings sollten die Ergebnisse statistischer Untersuchungen im Hinblick auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung bewertet werden. Dabei ist auch der Reproduzierbarkeit und den historischen Daten Rechnung zu tragen.

64. Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in manchen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin nicht eindeutige oder fragwürdige Ergebnisse auftreten.
65. Positive Befunde beim MNvit-Test deuten darauf hin, dass die Prüfsubstanz in kultivierten Säugetierzellen Chromosomenbrüche oder Chromosomenverlust hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter den zugrunde gelegten Versuchsbedingungen keine Chromosomenbrüche und/oder Gewinn bzw. Verlust von Chromosomenmaterial in kultivierten Säugetierzellen hervorruft.

Prüfbericht

66. Der Prüfbericht sollte mindestens folgende Informationen enthalten, wenn diese für die Durchführung der Studie relevant sind:

Prüfchemikalie:

- Angaben zur Identifikation und CAS- (Chemical Abstract Services) Nummer sowie EG-Nummer;
- physikalische Eigenschaft und Reinheit;
- physikalisch-chemische Eigenschaften, die für die Durchführung der Studie relevant sind;
- Reaktionsfähigkeit der Substanz mit dem Lösungsmittel/Vehikel oder dem Zellkulturmedium;

Lösungsmittel/Vehikel:

- Begründung für die Wahl des Vehikels/Lösungsmittels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

Zellen:

- Typ und Herkunft der verwendeten Zellen;
- Eignung des verwendeten Zelltyps;
- ggf. Nichtvorhandensein von Mykoplasma;
- Informationen zu Zellzyklusdauer, Verdopplungszeit oder Proliferationsindex;
- bei Verwendung von Lymphozyten: Geschlecht, Alter und Anzahl der Blutspender soweit zutreffend;

- bei Verwendung von Lymphozyten: Angaben darüber, ob Vollblut oder separierte Lymphozyten in Kontakt mit der Prüfsubstanz gebracht werden;
- ggf. Passagenanzahl;
- ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- Modalwert der Chromosomen;
- Zellzyklusdauer normal und für die Negativkontrolle;

Prüfbedingungen:

- Bezeichnung der Zytokinese-Block-Substanz (z. B. cytoB), falls verwendet, deren Konzentration und Dauer der Zellexposition;
- Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze, falls vorhanden;
- Medienzusammensetzung, ggf. CO₂-Konzentration;
- Konzentrationen der Prüfsubstanz;
- Konzentration (und/oder Volumen) des Vehikels und der beigegebenen Prüfsubstanz;
- Inkubationstemperatur und -dauer;
- Behandlungsdauer;
- Zeitpunkt der Gewinnung nach der Behandlung;
- ggf. Zelldichte bei der Beimpfung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechsel-Aktivierungssystems einschließlich Akzeptanzkriterien;
- Positivkontrollsubstanz und Negativkontrollen;
- Methoden der Objektträger-Präparation und verwendetes Färbeverfahren;
- Kriterien für die Identifizierung von Mikrokernen;
- Anzahl der analysierten Zellen;
- Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;
- alle zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

- verwendete statistische Analysemethode(n);
- Methoden, z. B. die Verwendung von Kinetochor-Antikörpern, um ggf. zu beschreiben, ob Mikrokerne ganze oder fragmentierte Chromosomen enthalten;

Ergebnisse:

- Verwendete Messung der Zytotoxizität, z. B. CBPI oder RI bei der Zytokinese-Block-Methode; RICC, RPD oder PI, wenn keine Zytokinese-Block-Verfahren verwendet werden; sonstige Beobachtungen bei Bedarf, z. B. Zell-Konfluenz, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung, Frequenz zweikerniger Zellen;
- Ausfällungszeichen;
- Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;
- Definition geeigneter Zellen für die Analyse;
- Verteilung einkerniger, zweikerniger und mehrkerniger Zellen, falls ein Zytokinese-Block-Verfahren verwendet wird;
- Anzahl der Zellen mit Mikrokernen, gesondert für jede behandelte Kultur und Kontrollkultur, und Angabe, ob diese von zweikernigen oder einkernigen Zellen stammen, sofern zutreffend;
- nach Möglichkeit Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis;
- chemische Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten, Standardabweichungen sowie Konfidenzniveau (z. B. 95 %).
- ggf. statistische Analysen; p-Werte;

Diskussion der Ergebnisse

Schlussfolgerungen

LITERATUR

- (1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.
- (2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.
- (3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.
- (4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167-172.
- (5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- (6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.
- (7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.
- (8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.
- (9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.
- (10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.
- (11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.
- (12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.

- (13) Eastmond, D.A., Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.
- (14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.
- (15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.
- (16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.
- (17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [www.oecd.org/env/testguidelines]
- (18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.
- (19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.
- (20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.
- (21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senju, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.
- (22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.
- (23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

- (24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.
- (25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.
- (26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.
- (27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.
- (28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137-163.
- (29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.
- (30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.
- (31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.
- (32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006. Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Abrufbar unter: [<http://ecvam.jrc.it/index.htm>]
- (34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S., van Benthem, J., Vanparrys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.

- (35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.
- (36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmüller, S. (2002), Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.
- (37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxins; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.
- (38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.
- (39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.
- (40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.
- (43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.
- (44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarff, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.
- (45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- (46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

- (47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
- (48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, In: de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.
- (50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Abrufbar unter: [<http://www.pops.int/>]
- (51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.
- (52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.
- (54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.
- (55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.
- (56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Res.*, 564, 97-100.
- (57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.
- (58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.

- (59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.
- (60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environ. Molec. Mutagenesis* 35, 191-201.
- (61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.
- (63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.
- (64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.
- (65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In: Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.
- (66) Verordnung (EG) NR. 850/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über persistente organische Schadstoffe und zur Änderung der Richtlinie 79/117/EWG, ABl. 229 vom 30.4.2004, S. 5.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Aneugen: Substanz oder Prozess, die/der durch Wechselwirkung mit den Komponenten des mitotischen oder meiotischen Zellteilungszyklus zu Aneuploidie in Zellen oder Organismen führt.

Aneuploidie: Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

Apoptose: Programmierter Zelltod, der durch eine Reihe von Schritten charakterisiert ist, an deren Ende eine Desintegration von Zellen in membranumschlossene Partikel steht, die schließlich durch Phagozytose oder Shedding abgebaut werden.

Zellproliferation: Zunahme der Anzahl von Zellen als Ergebnis der mitotischen Zellteilung.

Zentromer: DNA-Bereich eines Chromosoms, an dem die beiden Chromatiden zusammengehalten werden, und an dem beide Kinetochoren Seite an Seite angeordnet sind.

Klastogen: Substanz oder Prozess, die/der strukturelle Chromosomenaberrationen in Zell- oder Organismenpopulationen verursacht.

Zytokinese: Prozess der Zellteilung unmittelbar nach der Mitose, in dem zwei Tochterzellen, jeweils mit einem einzigen Kern, gebildet werden.

Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI): Anteil der Zellen aus zweiter Teilung in der behandelten Population im Verhältnis zur nicht behandelten Kontrollgruppe (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

Zytostase: Hemmung des Zellwachstums (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

Zytotoxizität: schädliche Auswirkungen auf Zellstruktur und -funktion, die letztlich zum Zelltod führen.

Genotoxisch: allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich Brüchen, Addukt-Neubildungen, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

Interphasezellen: Zellen, die sich nicht im Stadium der Mitose befinden.

Kinetochor: proteinhaltige Struktur, die sich am Zentromer eines Chromosoms sammelt, an der während der Zellteilung die Spindelfasern anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.

Mikronuklei/Mikrokerne: kleine Kerne zusätzlich zu den Hauptkernen der Zellen und von diesen getrennt, die während der Telophase der Mitose oder Meiose durch zurückgebliebene Chromosomenteile oder ganze Chromosomen gebildet werden.

Mitose: Teilung des Zellkerns, die in der Regel in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert ist.

Mitoseindex: Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in Metaphase befinden; zugleich Hinweis auf den Grad der Zellproliferation in dieser Population.

Mutagen: Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

Non-Disjunktion: Unvermögen der paarweise angeordneten Chromatiden, sich zu trennen und sich auf die in Entwicklung begriffenen Tochterzellen aufzuteilen. Dabei entstehen Tochterzellen mit abweichenden Chromosomenzahlen.

Polyploidie: Zahlenmäßige Chromosomenaberrationen in Zellen oder Organismen, von denen ein oder mehrere ganze Chromosomensätze betroffen sind, im Gegensatz zur Aneuploidie, bei der nur ein oder mehrere einzelne Chromosomen betroffen sind.

Proliferationsindex (PI): Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

Relative Erhöhung der Zellzahl (RICC): Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

Relative Populationsverdopplung (RPD): Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

Replikationsindex (RI): Anteil der abgeschlossenen Zellteilungszyklen in einer behandelten Kultur im Verhältnis zur nicht behandelten Kontrollgruppe während der Expositions- und Regenerationsphase (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

Prüfchemikalie (auch Prüfsubstanz): Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

Anlage 2

FORMELN ZUR BEWERTUNG DER ZYTOTOXIZITÄT

1. **Wenn cytoB zum Einsatz kommt**, sollte die Bewertung der Zytotoxizität auf dem **Ztokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI)** oder dem **Replikationsindex (RI)** beruhen (16) (58). Der CBPI gibt die mittlere Zahl der Zellzyklen pro Zelle während der Exposition gegenüber cytoB an und kann zur Berechnung der Zellproliferation eingesetzt werden. Der RI gibt die relative Zahl der Zellkerne in behandelten Kulturen im Vergleich zu Kontrollkulturen an und kann zur Berechnung der Zytostase in % verwendet werden:

$$\% \text{ Zytostase} = 100 - 100 \left\{ \left(\frac{\text{CBPI}_T - 1}{\text{CBPI}_C - 1} \right) \right\}$$

Und:

T = mit der Prüfchemikalie behandelte Kultur

C = Vehikel-Kontrollkultur

Dabei gilt:

$$\text{((Zahl der einkernigen Zellen) + (2 \times \text{Zahl der zweikernigen Zellen}) + (3 \times \text{Zahl der mehrkernigen Zellen}))}$$

$$\text{CBPI} = \frac{\text{((Zahl der einkernigen Zellen) + (2 \times \text{Zahl der zweikernigen Zellen}) + (3 \times \text{Zahl der mehrkernigen Zellen}))}}{\text{(Gesamtzellzahl)}}$$

Damit entspricht ein CBPI von 1 (alle Zellen sind einkernig) einer Zytostase von 100 %.

$$\text{Zytostase} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{((Zahl der zweikernigen Zellen) + (2 \times \text{Zahl der mehrkernigen Zellen}))} \div \text{(Gesamtzellzahl)}_T$$

$$\text{RI} = \frac{\text{((Zahl der zweikernigen Zellen) + (2 \times \text{Zahl der mehrkernigen Zellen}))} \div \text{(Gesamtzellzahl)}_T}{\text{((Zahl der zweikernigen Zellen) + (2 \times \text{Zahl der mehrkernigen Zellen}))} \div \text{(Gesamtzellzahl)}_C} \times 100$$

T= behandelte Kulturen

C = Kontrollkulturen

2. Folglich bedeutet ein RI von 53 %: von 100 % der Zellen in der Kontrollkultur, die sich geteilt und anschließend zweikernige und mehrkernige Zellen gebildet haben, haben sich in der behandelten Kultur nur 53 % geteilt, d. h. es ergibt sich für die Zytostase ein prozentualer Wert von 47 %.

3. **Wenn kein cytoB zum Einsatz kommt**, wird eine Bewertung der Zytotoxizität auf der Basis der **Relativen Erhöhung der Zellzahl (RICC)** oder der **Relativen Populationsverdopplung (RPD)** empfohlen (58), da bei beiden der Anteil der Zellpopulation berücksichtigt wird, die eine Teilung vollzogen hat.

$$\text{RICC} = \frac{\text{(Erhöhung der Zellzahl in behandelten Kulturen (Ende - Beginn))}}{\text{(Erhöhung der Zellzahl in Kontrollkulturen (Ende - Beginn))}} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{\text{(Zahl der Populationsverdopplungen in behandelten Kulturen)}}{\text{(Zahl der Populationsverdopplungen in Kontrollkulturen)}} \times 100$$

Dabei gilt:

$$\text{Populationsverdopplung} = [\log (\text{Zellzahl nach Behandlung} \div \text{Anfängliche Zellzahl})] \div \log 2$$

4. Somit zeigt ein RICC oder eine RPD von 53 % eine Zytotoxizität/Zytostase von 47 % an.
5. Bei Verwendung eines **Proliferationsindex (PI)** kann die Zytotoxizität durch das Zählen aller Klone bewertet werden, die aus 1 Zelle (cl1), 2 Zellen (cl2), 3 bis 4 Zellen (cl4) sowie 5 bis 8 Zellen (cl8) bestehen.

$$\text{PI} = \frac{((1x \text{ cl1}) + (2x \text{ cl2}) + (3x \text{ cl4}) + (4x \text{ cl8}))}{(\text{cl1} + \text{cl2} + \text{cl4} + \text{cl8})}$$

6. Der PI wurde als aussagefähiger und zuverlässiger Parameter für Zytotoxizität auch bei Zelllinien verwendet, die *in situ* ohne cytoB kultiviert wurden (25) (26) (27) (28).

Anlage 3

ZUR LEISTUNGSBEWERTUNG EMPFOHLENE REFERENZSUBSTANZEN¹

Kategorie	Substanz	CAS-Nr.	EG-Nr.:
1. Klastogene, die ohne Stoffwechsel-Aktivierung wirken			
	Zytosin-Arabinosid	147-94-4	205-705-9
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogene, die eine Stoffwechsel-Aktivierung erfordern			
	Benzo(a)pyren	50-32-8	200-028-5
	Zyklophosphamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugene			
	Colchicin	64-86-8	200-598-5
	Vinblastin	143-67-9	205-606-0
4. Negative Substanzen			
	Di(2-ethylhexyl)phthalat	117-81-7	204-211-0
	Nalidixinsäure	389-08-2	206-864-7
	Pyren	129-00-0	204-927-3
	Natriumchlorid	7647-14-5	231-598-3

- ¹. Die Referenzsubstanzen sind die zur Verwendung empfohlenen Chemikalien. Der Ersatz oder die Hinzufügung bestimmter Stoffe zu der Liste der Referenzsubstanzen ist möglich, wenn ihre Wirkung bekannt ist, wenn sie Mikrokerne mittels derselben Wirkmechanismen induzieren und wenn sie sich als relevant für die Chemikalien erweisen, die mit dem MNvit-Verfahren geprüft werden. Je nach Verwendungszweck könnte die Begründung eine Validierungsstudie enthalten, die entweder auf einer breiten Auswahl an Substanzen beruht oder sich auf ein engeres Spektrum auf der Grundlage der chemischen Klasse der Prüfsubstanz oder des untersuchten Schädigungsmechanismus konzentriert.

B.50 Hautsensibilisierung: Lokaler Lymphknotentest: DA

EINLEITUNG

1. Die OECD-Leitlinien für die Prüfung von Chemikalien und die EU-Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Die ursprüngliche Prüfmethode (B.42) zur Bestimmung der Hautsensibilisierung bei der Maus, der Lokale Lymphknotentest (Local Lymph Node Assay bzw. LLNA; OECD-Prüfrichtlinie 429) wurde inzwischen überarbeitet (1). Verschiedene Veröffentlichungen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) gehen genauer auf die Validierung des LLNA und auf die mit ihm verbundenen wissenschaftlichen Arbeiten ein. Bei dem LLNA wird zur Messung der Lymphozytenproliferation radioisotopisches Thymidin oder Jod verwendet. Der Test hat daher Beschränkungen, wenn der Erwerb, die Verwendung oder die Entsorgung radioaktiver Materialien mit Problemen verbunden sind. Bei dem LLNA: DA (entwickelt von Daicel Chemical Industries, Ltd.) handelt es sich um eine nicht-radioaktive Modifikation des LLNA, die den Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) mittels Biolumineszenz als Indikator für die Lymphozytenproliferation bestimmt. Die Prüfmethode LLNA: DA wurde durch ein internationales Gremium für Sachverständigengutachten (peer review) validiert, geprüft und zur Identifizierung hautreizender und nicht reizender Chemikalien mit einigen Beschränkungen als geeignet befunden (10) (11) (12) (13). Diese Prüfmethode wurde zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) bei Tieren entwickelt. Kapitel B.6 dieses Anhangs und OECD-Prüfrichtlinie 406 stützen sich auf Meerschweinchen-Tests, insbesondere den Meerschweinchen-Maximierungstest und den Bühler-Test (14). Der LLNA (Kapitel B.42 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 429) und die beiden nicht-radioaktiven Modifikationen, LLNA: DA (Kapitel B.50 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 442 A) und LLNA: BrdU-ELISA (Kapitel B.51 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 442 B) haben insofern Vorteile gegenüber den Meerschweinchen-Tests in B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (14), als sie einen verringerten und gezielteren Einsatz von Versuchstieren ermöglichen.
2. Ebenso wie im LLNA wird bei dem LLNA: DA die Induktionsphase der Hautsensibilisierung untersucht. Der Test liefert quantitative Daten für die Bewertung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Durch den möglichen Nachweis von hautsensibilisierenden Stoffen ohne die Verwendung radioaktiver Markierungen für die DNA können die berufliche Exposition gegenüber Radioaktivität und Entsorgungsprobleme vermieden werden. Dies wiederum ermöglicht eine verstärkte Verwendung von Mäusen zur Bestimmung hautsensibilisierender Stoffe und somit eine geringere Verwendung von Meerschweinchen zur Bewertung des hautsensibilisierenden Potenzials (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (14).

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

3. Die verwendeten Begriffsbestimmungen sind in Anlage 1 aufgeführt.

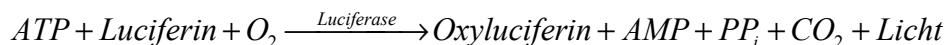
AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. Der LLNA: DA ist eine modifizierte LLNA-Methode zum Nachweis von Chemikalien mit potenziell hautsensibilisierenden Eigenschaften, mit bestimmten Beschränkungen. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass der LLNA: DA zwingend in jedem Fall anstelle des LLNA oder der Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie) (14) eingesetzt werden muss. Vielmehr erweist sich der Test als gleichermaßen wertvoll und kann als Alternative gewählt werden, bei der im Allgemeinen keine weitere Bestätigung von positiven wie auch negativen Ergebnissen erforderlich ist. (10) (11). Das Prüflabor sollte vor der Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz auswerten und berücksichtigen. Zu diesen Informationen zählen die Identität und die chemische Struktur der Prüfsubstanz, ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, die Ergebnisse aller sonstigen *in vitro*- oder *in vivo*-Toxizitätsprüfungen der Prüfsubstanz sowie toxikologische Daten zu strukturell verwandten Chemikalien. Diese Informationen sind zu berücksichtigen, um die Eignung des LLNA: DA für die jeweilige Prüfsubstanz festzustellen (bestimmte chemische Stoffe sind mit dem LLNA: DA nicht kompatibel [siehe Absatz 5]) und die Festlegung der Dosis zu erleichtern.
5. Beim LLNA: DA handelt es sich um eine *in vivo*-Methode. Das bedeutet, dass die kontaktsensibilisierenden Eigenschaften weiterhin an Tieren bewertet werden. Der Test erlaubt es jedoch, im Vergleich zu den Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) die Anzahl der für diesen Zweck benötigten Tiere zu reduzieren (14). Zudem ist der LLNA: DA eine wesentlich verfeinerte Methode im Hinblick auf die Verwendung der Tiere (weniger Schmerzen und Leiden) bei den Tests zur Kontraktsensibilisierung, da es beim LLNA: DA, anders als bei B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406, nicht erforderlich ist, provozierte Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut auszulösen. Trotz der Vorteile, die der LLNA: DA gegenüber B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (14) aufweist, ist er mit gewissen Einschränkungen behaftet, die die Anwendung von B.6 oder von OECD-Prüfrichtlinie 406 erforderlich machen können (z. B. die Prüfung bestimmter Metalle, falsch positive Ergebnisse bei bestimmten hautreizenden Stoffen [wie etwa bei tensidähnlichen Chemikalien] (6) (1 und Kapitel B.42 in diesem Anhang), oder die Löslichkeit der Prüfsubstanz). Zudem können chemische Klassen oder Substanzen mit Funktionsgruppen, die erwiesenermaßen als potenzielle Verwechslungsfaktoren wirken können (16), den Einsatz von Meerschweinchen-Tests erforderlich machen (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (14)). Beschränkungen, die für den LLNA festgestellt wurden (1, und Kapitel B.42 dieses Anhangs), empfehlen sich auch für den LLNA: DA (10). Zudem könnte die Verwendung des LLNA: DA ungeeignet sein für die Prüfung von Substanzen mit Auswirkungen auf das ATP-Niveau (z. B. Substanzen, die als ATP-Hemmer wirken) oder Substanzen, die die genaue Messung der intrazellulären ATP-Messung beeinträchtigen (z. B. Vorhandensein ATP abbauender Enzyme, Vorhandensein extrazellulären ATPs im Lymphknoten). Abgesehen von diesen bekannten Beschränkungen dürfte der LLNA: DA für die Prüfung aller Substanzen geeignet sein, sofern mit diesen Substanzen keine Eigenschaften verbunden sind, die die Genauigkeit des LLNA: DA beeinträchtigen könnten. Außerdem sollte die Möglichkeit positiver Grenzergebnisse in Betracht gezogen werden, wenn für den

Stimulationsindex (SI) Werte zwischen 1,8 und 2,5 ermittelt werden (siehe Absätze 31-32). Dies beruht auf der Validierungs-Datenbasis von 44 Substanzen mit einem SI $\geq 1,8$ (siehe Absatz 6), bei denen der LLNA: DA alle 32 LLNA-Sensibilisatoren richtig identifizierte, jedoch drei von 12 LLNA-Nichtsensibilisatoren mit SI-Werten zwischen 1,8 und 2,5 (d. h. positive Grenzwerte) (10) nicht korrekt identifizierte. Da allerdings derselbe Datensatz für die Einstellung der SI-Werte und die Berechnung der prädiktiven Eigenschaften des Tests verwendet wurde, könnten die festgestellten Ergebnisse auch eine Überbewertung der tatsächlichen prädiktiven Eigenschaften sein.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

6. Der LLNA: DA beruht auf dem Prinzip, dass sensibilisierende Stoffe eine Lymphozytenproliferation in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation des chemischen Stoffes induzieren. Diese Proliferation verläuft proportional zur Dosis und zur Wirksamkeit des applizierten Allergens und bietet sich als einfache Möglichkeit an, eine quantitative Messung der Sensibilisierung zu erhalten. Die Proliferation wird gemessen, indem man die mittlere Proliferation jeder Prüfgruppe mit der mittleren Proliferation der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe (VK) vergleicht. Das Verhältnis der mittleren Proliferation in jeder Behandlungsgruppe zu dem in der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe, auch als SI bezeichnet, wird festgelegt und sollte $\geq 1,8$ betragen, ehe eine weitere Bewertung einer Prüfsubstanz als potenzieller Hautsensibilisator erfolgt. Die hier beschriebenen Methoden beruhen auf der Messung des ATP-Gehalts durch Biolumineszenz (die bekanntermaßen mit der Anzahl lebender Zellen korreliert) (17), um einen erhöhten Anteil proliferierender Zellen in den drainierenden aurikulären Lymphknoten nachzuweisen (18) (19). Die Biolumineszenz-Methode stützt sich auf das Enzym Luciferase, um die Bildung von Licht aus ATP und Luciferin mittels der folgenden Reaktion zu katalysieren:



Die emittierte Lichtintensität steht in linearer Beziehung zur ATP-Konzentration und wird mit einem Luminometer gemessen. Bei dem Luciferin-Luciferase-Test handelt es sich um eine sensible Methode zur ATP-Quantifizierung, die in einer breiten Palette von Anwendungen zum Einsatz kommt (20).

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Auswahl von Versuchstierarten

7. Für diesen Test ist die Maus die Spezies der Wahl. Validierungsstudien für den LLNA: DA wurden ausschließlich mit dem CBA/J-Stamm durchgeführt, der daher als bevorzugter Stamm gilt (12) (13). Es werden junge erwachsene weibliche Mäuse verwendet, die weder geworfen haben noch trächtig sind. Bei Versuchsbeginn sollten die Tiere 8-12 Wochen alt sein, die Gewichtsunterschiede minimal sein und 20 % des mittleren Gewichts nicht übersteigen. Alternativ können Tests an anderen Stämmen und männlichen Tieren erfolgen, wenn anhand von hinlänglich großen Datenangaben nachgewiesen werden kann, dass keine signifikanten stamm- und/oder geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Reaktion auf den LLNA: DA bestehen.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

8. Mäuse sollten in Gruppen gehalten werden (21), wenn nicht relevante wissenschaftliche Argumente eine Einzelhaltung nahelegen. Die Temperatur im Versuchsräum sollte 22 ± 3 °C betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und zu anderen Zeiten als während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen soll, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

Vorbereitung der Tiere

9. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert (aber nicht am Ohr) und vor Beginn der Dosierung für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Vor Behandlungsbeginn werden alle Tiere auf sichtbare Hautverletzungen untersucht.

Vorbereitung der Dosierlösungen

10. Feste Chemikalien sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in Lösungsmitteln/Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Chemikalien können direkt appliziert oder zuvor verdünnt werden. Unlösliche Chemikalien, wie sie in der Regel in Medizinprodukten vorliegen, sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in einem geeigneten Lösungsmittel einer übermäßigen Extraktion unterzogen werden, um alle extrahierbaren Inhaltsstoffe vor der Prüfung sichtbar zu machen. Die Prüfsubstanzen sollten täglich zubereitet werden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

11. Anhand von positiven Kontrollchemikalien wird die ordnungsgemäße Leistung des Tests nachgewiesen. Hierzu ist eine angemessene und reproduzierbare Empfindlichkeit der Reaktion auf eine sensibilisierende Prüfsubstanz erforderlich, wobei das Reaktionsausmaß genau zu charakterisieren ist. Es wird die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrolle empfohlen, da diese die Fähigkeit des Labors belegt, jeden Test erfolgreich durchzuführen und eine Bewertung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors ermöglicht. Einige Regulierungsbehörden schreiben eine Positivkontrolle für jede Studie vor. Daher wird Benutzern empfohlen, vor Durchführung des LLNA: DA die zuständigen Behörden zu Rate zu ziehen. Dementsprechend wird die routinemäßige Verwendung einer gleichzeitigen Positivkontrolle angeregt, um die Notwendigkeit zusätzlicher Tierversuche zur Erfüllung von Anforderungen zu vermeiden, die aus der Verwendung einer nur periodischen Positivkontrolle resultieren könnten (siehe Absatz 12). Die Positivkontrolle sollte eine positive Reaktion auf den LLNA: DA bei einem Expositionsniveau hervorrufen, das einen Anstieg des Stimulationsindex ($I \geq 1,8$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe) bewirkt. Die positive Kontrolldosis soll so gewählt werden, dass sie keine übermäßige Hautreizung oder systemische Toxizität verursacht und die Induktion reproduzierbar, aber nicht exzessiv ist (z. B. ein SI > 10 würde als exzessiv gelten). Bevorzugte positive Kontrollstoffe sind 25 %

Hexylcinnaminaldehyd (Chemical Abstracts Service [CAS]-Nr. 101-86-0) und 25 % Eugenol (CAS-Nummer 97-53-0) in Aceton: Olivenöl (4:1, v/v). Unter bestimmten Umständen können in ausreichend begründeten Fällen andere Kontrollsubstanzen eingesetzt werden, die den genannten Kriterien entsprechen.

12. Obwohl die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrollgruppe empfohlen wird, können in gewissen Situationen periodische Prüfungen (d. h. in Abständen \leq 6 Monaten) der Positivkontrolle für Laboratorien ausreichen, die den LLNA: DA regelmäßig (d. h. mindestens einmal pro Monat) durchführen und über eine etablierte historische Kontrolldatenbasis verfügen, die die Fähigkeit des Labors bestätigt, reproduzierbare und genaue Ergebnisse mit Positivkontrollen zu erzielen. Eine angemessene Beherrschung des LLNA: DA kann erfolgreich nachgewiesen werden, indem durchgehend positive Ergebnisse mit der Positivkontrolle in mindestens 10 unabhängigen Prüfungen erzielt werden, die innerhalb eines angemessenen Zeitraums (d. h. in weniger als einem Jahr) durchgeführt wurden.
13. Eine gleichzeitige Positivkontrollgruppe sollte immer einbezogen werden, wenn Verfahrensänderungen im LLNA: DA auftreten (z. B. Wechsel des geschulten Personals, Änderung der Prüfmethoden, -materialien und/oder Reagenzien, Änderung der Prüfgeräte, Änderung der Herkunft der Versuchstiere). Solche Änderungen sollten in Laborberichten dokumentiert werden. Ferner ist der Einfluss dieser Änderungen auf die Aussagefähigkeit der zuvor eingerichteten historischen Datenbank zu bedenken. Dabei sollte die Notwendigkeit überdacht werden, eine neue historische Datenbank einzurichten, um die gleichbleibende Qualität der positiven Kontrollergebnisse zu dokumentieren.
14. Die Prüfer sollten sich der Tatsache bewusst sein, dass die Entscheidung, eine PK-Studie periodisch statt gleichzeitig durchzuführen, Auswirkungen auf die Aussagefähigkeit und Akzeptanz negativer Studienergebnisse haben kann, die ohne gleichzeitige Positivkontrolle im Zeitraum zwischen den einzelnen periodischen PK-Studien auftreten können. Wenn zum Beispiel ein falsch negatives Ergebnis in der periodischen PK-Studie auftritt, können negative Ergebnisse für die Prüfsubstanz, die in dem Zeitraum zwischen der letzten akzeptablen periodischen PK-Studie und der inakzeptablen periodischen PK-Studie aufgetreten waren, in Frage gestellt werden. Die Auswirkungen solcher Ergebnisse sollten sorgfältig bedacht werden, wenn entschieden wird, ob gleichzeitige oder nur periodische PKs durchgeführt werden sollen. Auch ist die Verwendung einer geringeren Anzahl an Versuchstieren bei der gleichzeitigen PK-Gruppe zu bedenken, wenn dies wissenschaftlich zu begründen ist und wenn das Labor auf der Grundlage laborspezifischer historischer Daten nachweist, dass eine geringere Anzahl an Mäusen ausreicht (22).
15. Obwohl die Positivkontrolle in einem Vehikel getestet werden sollte, das bekanntermaßen eine gleichbleibende Reaktion auslöst (z. B. Aceton: Olivenöl; 4:1, v/v), können in bestimmten Rechtssituationen außerdem Prüfungen in einem Nichtstandard-Vehikel (klinisch/chemisch relevante Formulierung) erforderlich sein (23). Wenn die gleichzeitige Positivkontrolle in einem anderen Vehikel als der Prüfsubstanz getestet wird, sollte eine gesonderte Vehikelkontrolle für die PK einbezogen werden.

16. In Fällen, in denen Prüfsubstanzen einer bestimmten chemischen Klasse oder eine Reihe von Reaktionen bewertet werden, können Vergleichssubstanzen nützlich sein, um nachzuweisen, dass die Prüfmethode zur Feststellung des Hautsensibilisierungspotenzials dieser Art von Prüfsubstanzen ordnungsgemäß funktioniert. Geeignete Vergleichssubstanzen sollten die folgenden Eigenschaften haben:

- strukturelle und funktionale Ähnlichkeit mit der Klasse der getesteten Prüfsubstanz;
- bekannte physikalische/chemische Eigenschaften;
- zugrunde liegende Daten aus dem LLNA: DA;
- zugrunde liegende Daten aus anderen Tiermodellen und/oder von Menschen.

TESTVERFAHREN

Anzahl der Versuchstiere und Dosierungen

17. Mindestens vier Tiere pro Dosisgruppe mit jeweils mindestens drei Konzentrationen der Prüfsubstanz werden benötigt; zusätzlich braucht man eine Negativkontrollgruppe, die nur mit dem Vehikel für die Prüfsubstanz behandelt wird, sowie eine Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums, auf der Grundlage der Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11 - 15). Tests mit Mehrfachdosen der PK sollten in Erwägung gezogen werden, insbesondere wenn die Positivkontrolle intermittierend getestet wird. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

18. Die Auswahl der Dosis und des Vehikels soll anhand der Empfehlungen in (2) und (24) erfolgen. Für aufeinanderfolgende Dosierungen werden normalerweise geeignete abgestufte Konzentrationen gewählt, wie z. B. 100 %, 50%, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % usw. Die Auswahl der Konzentrationsfolge sollte angemessen wissenschaftlich begründet werden. Alle vorhandenen toxikologischen Angaben (z. B. über die akute Toxizität und Hautreizung) sowie strukturelle und physiochemische Angaben zu der jeweiligen Prüfsubstanz (und/oder strukturverwandten Substanzen) sollten bei der Festlegung von drei aufeinander folgenden Konzentrationen berücksichtigt werden, so dass bei der Höchstkonzentration einerseits die Exposition maximiert und andererseits eine systemische Toxizität und/oder eine übermäßige lokale Hautreizung ausgeschlossen werden (24) (25). Mangels solcher Informationen kann ein anfänglicher Dosisfindungstest erforderlich sein (siehe Absätze 21-24).

19. Das Vehikel sollte das Testergebnis nicht beeinflussen oder beeinträchtigen und sollte so gewählt werden, dass die Löslichkeit zur Erzielung einer möglichst hohen Konzentration maximiert und gleichzeitig eine für das Applizieren der Prüfsubstanz geeignete Lösung/Suspension hergestellt werden kann. Empfohlene Vehikel sind Aceton: Olivenöl (4:1, v/v), N,N-Dimethylformamid, Methylethyleketon, Propylenglykol und Dimethylsulphoxid (6), wobei mit hinreichender wissenschaftlicher Begründung auch andere Vehikel verwendet werden können. Unter bestimmten Umständen muss ein klinisch relevantes Lösungsmittel oder die handelsübliche Zubereitung, in der die Prüfsubstanz vermarktet wird, als zusätzliche Kontrolle genutzt werden. Besondere Sorgfalt sollte darauf verwendet werden, zu

gewährleisten, dass in das Vehikelsystem durch die Verwendung geeigneter Lösungsvermittler (z. B. 1 % Pluronic® L92) hydrophile Stoffe eingearbeitet werden, die die Haut befeuchten und nicht sofort ablaufen. Folglich sind vollständig wässrige Vehikel zu vermeiden.

20. Die Arbeit an Lymphknoten einzelner Mäuse ermöglicht die Bewertung der Variabilität von Tieren sowie einen statistischen Vergleich zwischen der Prüfsubstanz und Messungen an der Vehikelkontrollgruppe (siehe Absatz 33). Die Möglichkeit, die Anzahl der Mäuse in der Positivkontrollgruppe zu verringern, ist nur realistisch, wenn Einzeltierdaten erhoben werden (22). Außerdem verlangen einige Regulierungsbehörden die Erhebung von Daten einzelner Tiere. Die regelmäßige Erhebung von Einzeltierdaten stellt im Hinblick auf den Tierschutz einen Vorteil dar, indem Doppeltests vermieden werden. Diese wären notwendig, wenn die ursprünglich gemeinsam gesammelten Ergebnisse für die Prüfsubstanz (z. B. über gepoolte Daten) später von Regulierungsbehörden mit anderen Vorschriften (z. B. Einzeltierdaten) geprüft würden.

Dosisfindungstest

21. Wenn über die höchst mögliche Dosierung keine Informationen vorliegen (siehe Absatz 18), sollte ein Dosisfindungstest durchgeführt werden, um die geeignete Dosierung für den LLNA: DA festzulegen. Der Dosisfindungstest soll eine Orientierung bei der Auswahl der höchst möglichen Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA: DA in Fällen liefern, in denen keine Informationen über Konzentrationen vorliegen, die zur systemischen Toxizität (siehe Absatz 24) und/oder zu übermäßiger Hautreizung führen (siehe Absatz 23). Die höchsten geprüften Dosisstufen sollten 100 % der Prüfsubstanz bei Flüssigkeiten bzw. die höchst möglichen Konzentrationen bei Feststoffen oder Suspensionen sein.
22. Der Dosisfindungstest wird unter Bedingungen durchgeführt, die denen der Hauptstudie des LLNA: DA genau entsprechen. Allerdings gibt es hier keine Bewertung der Lymphknotenproliferation und es können nicht so viele Tiere pro Dosisgruppe eingesetzt werden. Es werden ein oder zwei Tiere pro Dosisgruppe empfohlen. Alle Mäuse werden täglich auf klinische Zeichen für systemische Toxizität oder lokale Reizungen an der Applikationsstelle untersucht. Das Körpergewicht wird vor dem Test und vor dem Abschluss (Tag 8) protokolliert. Beide Ohren jeder Maus werden auf Anzeichen für Erytheme untersucht und mit Hilfe von Tabelle 1 bewertet (25). Die Ohrdicke wird mit Hilfe eines Ohrdickenmessgeräts (z. B. digitaler Mikrometer oder Peacock Dickenmessuhr) an Tag 1 (Vordosis), Tag 3 (ca. 48 Stunden nach der ersten Dosis), Tag 7 (24 Stunden vor Abschluss) und Tag 8 bestimmt. Zusätzlich kann an Tag 8 die Ohrdicke durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben ermittelt werden. Dies sollte nach der tierschutzgerechten Tötung der Tiere erfolgen. Eine übermäßige lokale Hautreizung wird durch eine Erythem-Punktzahl von ≥ 3 und/oder eine Zunahme der Ohrdicke $\geq 25\%$ an jedem beliebigen Messtag angezeigt (26) (27). Als höchste Dosis für die Hauptuntersuchung des LLNA: DA wird die nächst niedrigere Dosis in der Konzentrationsreihe des Dosisfindungstests gewählt (siehe Absatz 18), die keine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung verursacht.

Tabelle 1: Erythem-Klassifizierung

Beobachtung	Punktzahl
Kein Erythem	0
Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar)	1
Klar abgegrenztes Erythem	2
Mäßiges bis ausgeprägtes Erythem	3
Schweres Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist	4

23. Zusätzlich zu einer Zunahme der Ohrdicke um 25 % (26) (27) wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Ohrdicke bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zugrunde gelegt, um Reizstoffe in dem LLNA zu identifizieren (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Obwohl ein statistisch signifikanter Anstieg auch bei einer Ohrdicke von weniger als 25 % auftreten kann, konnte kein spezifischer Zusammenhang mit einer übermäßigen Hautreizung festgestellt werden (30) (31) (32) (33) (34).
24. Die folgenden klinischen Beobachtungen können, sofern sie Bestandteil einer Gesamtbewertung sind, auf systemische Toxizität hinweisen (35) und somit die höchst mögliche Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA: DA anzeigen: Änderungen der Funktionen des Nervensystems (z. B. Piloerektion, Ataxie, Tremor und Krämpfe); Verhaltensänderungen (z. B. Aggressivität, Änderungen bei der Fellpflege, auffallende Änderung des Aktivitätsniveaus); Änderungen des Atemmusters (*d. h.* Änderung der Häufigkeit und Intensität des Atmens wie Dyspnoe, Keuchen, rasselnder Atem) sowie Änderungen der Futter- und Wasseraufnahme. Zusätzlich sollten Anzeichen von Lethargie und/oder Teilnahmslosigkeit sowie alle klinischen Anzeichen für mehr als leichte oder momentane Schmerzen und Qual, eine Gewichtsreduktion >5 % zwischen Tag 1 und Tag 8 sowie die Sterblichkeit in der Bewertung berücksichtigt werden. Moribunde Tiere oder Tiere, die Anzeichen starker und andauernder Qualen zeigen, sollten tierschutzgerecht getötet werden (36).

Versuchsplan der Hauptuntersuchung

25. Der Versuchsplan des Tests ist wie folgt:

- Tag 1:

Jedes Tier wird einzeln gekennzeichnet und das Gewicht sowie jede klinische Beobachtung protokolliert. Es wird 1 % Natriumlaurysulfat (NLS) in wässriger Lösung auf die Rückseite jedes Ohrs aufgetragen. Dies erfolgt mit vier bis fünf Strichen einer in die NLS-Lösung getauchten Bürste, so dass die gesamte Rückseite jedes Ohrs bedeckt ist. Eine Stunde nach der NLS-Behandlung werden 25 µL der Prüfsubstanz in der jeweiligen Verdünnung, des Vehikels allein oder der PK (gleichzeitig oder jüngeren Datums) gemäß den Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15) auf die Rückseite jedes Ohrs appliziert.

- Tage 2, 3 und 7:

Die an Tag 1 erfolgte Vorbehandlung mit 1 % NLS wässriger Lösung und die Applikation der Prüfsubstanz werden wiederholt.

- Tage 4, 5 und 6:

Keine Behandlung.

- Tag 8:

Das Gewicht jedes Tiers sowie jede klinische Beobachtung werden protokolliert. Ca. 24 bis 30 Stunden nach Beginn der Applikation an Tag 7 werden die Tiere tierschutzgerecht getötet. Die drainierenden aurikulären Lymphknoten jedes Mäuseohrs werden entfernt und separat (für jedes Tier einzeln) in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Einzelheiten und Diagramme der Lymphknotenidentifikation und -entfernung sind unter Referenz (22) aufgeführt. Zur weiteren Kontrolle der lokalen Hautreaktion in der Hauptuntersuchung können zusätzliche Parameter wie die Auswertung des Ohr-Erythems oder Ohrdickemessungen (mittels eines Dickenmessgeräts oder durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben bei der Nekropsie) in das Untersuchungsprotokoll aufgenommen werden.

Vorbereitung der Zellsuspensionen

26. Für jede Maus wird eine Einzelzellsuspension der beidseitig entnommenen Lymphknotenzellen erstellt, indem die Lymphknoten zwischen zwei Glasträger geklemmt werden und leichter Druck ausgeübt wird, um die Knoten zu zerquetschen. Nach der Vergewisserung, dass das Gewebe sich dünnflächig verteilt hat, können die beiden Träger voneinander gelöst werden. Das Gewebe auf beiden Trägern wird in PBS gelöst, indem jeder Träger im Winkel über die Petrischale gehalten wird und mit PBS gespült wird, während gleichzeitig das Gewebe mit einem Zellschaber von dem Träger abgeschabt wird. Die Lymphknoten bei Tieren der Negativkontrollgruppe sind klein; daher ist Vorsicht geboten, um künstliche Effekte auf die SI-Werte zu vermeiden. Für das Spülen beider Träger sollte ein Gesamtvolumen von 1 mL PBS verwendet werden. Die Lymphknoten-Lösung in der Petrischale sollte mit dem Zellschaber leicht homogenisiert werden. Anschließend wird mit einer Mikropipette ein 20 µL Aliquot der Lymphknotenlösung entnommen (Achtung: nicht die für das Auge sichtbare Membran entnehmen) und mit 1,98 mL PBS gemischt, sodass sich eine Probe von 2 mL ergibt. Darauf wird eine zweite Probe von 2 mL mittels desselben Verfahrens zubereitet, sodass für jedes Tier zwei Proben vorliegen.

Bestimmung der Zellproliferation (Messung des ATP-Gehalts der Lymphozyten)

27. Erhöhungen des ATP-Gehalts in den Lymphknoten werden mittels der Luciferin-/Luciferase-Methode mit einem ATP-Mess-Kit bestimmt, das die Biolumineszenz in Relativen Lumineszenz-Einheiten (Relative Luminescence Units; RLU) misst. Die Testzeit zwischen dem Zeitpunkt der Tiertötung bis zur Messung des ATP-Gehalts für jedes einzelne Tier sollte gleich bleiben und bei ca. 30 Minuten liegen, da davon ausgegangen wird, dass der ATP-Gehalt nach der Tiertötung allmählich abnimmt (12). Folglich sollten die verschiedenen Verfahrensschritte ab der Entnahme der aurikulären Lymphknoten bis zur ATP-Messung nach einem vorher festgelegten Zeitplan, der für jedes Tier gleich ist, innerhalb von 20 Minuten abgeschlossen werden. Die ATP-Lumineszenz sollte in jeder Probe von 2 mL gemessen werden, so dass für jedes Tier

zwei ATP-Messungen vorliegen. Anschließend wird die mittlere ATP-Lumineszenz bestimmt und in den folgenden Berechnungen verwendet (siehe Absatz 30).

BEOBACHTUNGEN

Klinische Beobachtungen

28. Jede Maus sollte mindestens einmal täglich sorgfältig auf klinische Zeichen, d. h. lokale Reizung an der Applikationsstelle, oder auf systemische Toxizität untersucht werden. Alle Beobachtungen werden systematisch in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Die Überwachungspläne sollten Kriterien beinhalten, anhand derer Mäuse mit systemischer Toxizität, übermäßiger lokaler Hautreizung oder Hautverätzung schnell zu Zwecken der schmerzlosen Tötung identifiziert werden können (36).

Körpergewicht

29. In Abschnitt 25 wurde bereits ausgeführt, dass das Körpergewicht der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der tierschutzgerechten Tötung der Tiere laut Versuchsplan festgestellt werden soll.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

30. Die Ergebnisse für jede Behandlungsgruppe werden als mittlerer Stimulationsindex (SI) angegeben. Den SI erhält man durch Teilen der mittleren RLU pro Maus innerhalb jeder Prüfgruppe und der Positivkontrollgruppe durch die mittleren RLU pro Maus für die Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppe. Der durchschnittliche SI beträgt demnach für die mit Vehikel behandelten Kontrollen 1.
31. In dem Entscheidungsprozess gilt ein Ergebnis als positiv, wenn $SI \geq 1,8$ ist (10). Die Stärke der Dosis-Wirkung, die statistische Signifikanz und die gleichbleibende Qualität der Lösungsmittel-/Vehikel-Reaktion sowie der Reaktion der Positivkontrolle können aber auch benutzt werden, um festzulegen, ob ein Grenzergebnis (d. h. SI-Wert zwischen 1,8 und 2,5) als positiv bezeichnet werden soll (2) (3) (37).
32. Bei einer positiven Grenzwertreaktion mit einem SI zwischen 1,8 und 2,5 können Benutzer zusätzliche Informationen berücksichtigen, wie z. B. die Dosis-Wirkungs-Beziehung, das Vorliegen einer systemischen Toxizität oder übermäßigen Hautreizung, sowie gegebenenfalls die statistische Signifikanz zusammen mit den SI-Werten, um zu bestätigen, dass die Ergebnisse positiv sind (10). Zu beachten sind ferner die verschiedenen Eigenschaften der Prüfsubstanz, wobei es unter anderem zu klären gilt, ob ein struktureller Zusammenhang mit bekannten Hautsensibilisatoren besteht, ob sie eine übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus hervorruft und wie die festgestellte Art der Reaktion bezüglich der Dosis ist. Diese und weitere Aspekte werden an anderer Stelle ausführlich erörtert (4).
33. Werden die Daten für jede einzelne Maus erhoben, kann eine statistische Analyse zu Vorhandensein und Grad des Dosis-Wirkungs-Verhältnisses in den Daten durchgeführt werden. Jede statistische Auswertung könnte eine Bewertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie geeignete Testgruppen-Vergleiche beinhalten (z. B. Gruppe mit paarweiser Dosierung vs. gleichzeitige Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppen). Die statistischen Analysen könnten z. B. die lineare

Regression, den Williams-Test zur Bewertung von Dosis-Wirkungs-Trends oder den Dunnett-Test für paarweise Vergleiche beinhalten. Bei der Auswahl einer geeigneten Methode für die statistische Analyse sollte sich der Prüfer möglicher ungleicher Varianzen und anderer damit zusammenhängender Probleme stets bewusst sein, denn diese erfordern unter Umständen eine Datentransformation oder ein nicht-parametrisches statistisches Verfahren. Auf jeden Fall muss der Prüfer unter Umständen SI-Berechnungen und statistische Analysen mit und ohne bestimmte Datenpunkte (manchmal als „Ausreißer“ bezeichnet) vornehmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

34. Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Sie sollten die RLU-Einzelwerte, die mittleren RLU-Gruppenwerte pro Tier, die damit verbundene Fehlervariable (z. B. SD, SEM) und den mittleren SI für jede Dosisgruppe, verglichen mit der gleichzeitigen Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppe angeben.

Prüfbericht

35. Der Testbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüf- und Kontrollsubstanzen:

- Angaben zur Identität (z. B. CAS-Nummer und EG-Nummer, falls vorhanden; Bezugsquelle; Reinheit; bekannte Verunreinigungen; Chargennummer);
- physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Flüchtigkeit, Stabilität, Löslichkeit);
- bei Mischungen Zusammensetzung und relative Anteile der Bestandteile in Prozent;

Lösungsmittel/Vehikel:

- Angaben zur Identität (Reinheit, Konzentration, gegebenenfalls verwendete Mengen);
- Begründung für die Wahl des Vehikels;

Versuchstiere:

- Herkunft der CBA-Mäuse;
- mikrobiologischer Status der Tiere, soweit bekannt;
- Anzahl und Alter der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

Prüfbedingungen:

- Herkunft, Chargennummer und Daten des Herstellers zur Qualitätssicherung/Qualitätskontrolle für das ATP-Kit;
- Angaben zur Vorbereitung und Applikation der Prüfsubstanz;
- Begründung der gewählten Dosierung (mit Ergebnissen des eventuell durchgeführten Dosisfindungstests);
- verwendete Konzentrationen des Vehikels und der Prüfsubstanz sowie Gesamtmenge der applizierten Prüfsubstanz;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle);
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv oder negativ;
- Einzelheiten zu eventuellen Protokollabweichungen und eine Erklärung dazu, wie sich diese Abweichung auf Prüfdesign und Ergebnisse auswirkt.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

- Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der letzten Überprüfung der Zuverlässigkeit mit Angaben zu verwendeten Prüfsubstanzen, Konzentration und Vehikel;
- gleichzeitige und/oder historische Positivkontrolle und gleichzeitige Daten der Negativkontrolle (Lösungsmittel/Vehikel) für das Prüflabor;
- wenn keine gleichzeitige PK eingeschlossen war, Datum und Laborbericht über die jüngste periodische PK sowie ein Bericht mit ausführlichen Angaben über die historischen positiven Kontrollen des Labors mit Angabe der Gründe, warum keine gleichzeitige PK durchgeführt wurde;

Ergebnisse:

- Gewicht der einzelnen Tiere bei Beginn der Prüfung und zum Zeitpunkt der Tötung laut Versuchsplan, sowie mittlere und zugehörige Fehlervariable (z. B. SD, SEM) für jede Behandlungsgruppe;
- Beginn und zeitlicher Verlauf der toxischen Erscheinungen für jedes Tier, einschließlich gegebenenfalls Hautreizungen an der Stelle der Verabreichung;
- Zeitpunkt der Tötung und Zeitpunkt der ATP-Messungen für jedes Tier;
- Tabelle der RLU-Werte für jede Maus und der SI-Werte für jede Dosisgruppe;

- mittlere verbundene Fehlervariable (z. B. SD, SEM) für RLU/Maus für jede Behandlungsgruppe sowie die Ergebnisse der Ausreißer-Analyse für jede Behandlungsgruppe;
- berechneter SI und geeignete Messung der Variabilität, welche die Variabilität der Tiere sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe berücksichtigt;
- Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- gegebenenfalls statistische Analysen.

Diskussion der Ergebnisse:

- Kurze Auswertung der Ergebnisse, der Dosis-Wirkungs-Beziehung und gegebenenfalls statistische Analysen mit Schlussfolgerungen zur Frage, ob die Prüfsubstanz als Hautsensibilisator eingestuft werden soll.

LITERATUR

- (1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twardok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals

and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRRept2009.pdf].

- (12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.
- (13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.
- (14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.
- (16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.
- (18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.
- (19) Dexter, S.J., Câmara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.
- (20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.
- (21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

- (23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- (33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (38).

Vergleichssubstanz: Eine sensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanz, die als Norm zu Vergleichszwecken für eine Prüfsubstanz verwendet wird. Eine Vergleichssubstanz sollte die folgenden Eigenschaften haben: (i) gleichbleibende und verlässliche Quelle(n); (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Effekten und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Falsch negativ: Eine Substanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als negativ oder nicht wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit positiv bzw. wirksam ist.

Falsch positiv: Eine Substanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als positiv oder wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit negativ bzw. nicht wirksam ist.

Gefahr: Potenzial eines negativen Effekts für Gesundheit oder Umwelt. Die negative Wirkung manifestiert sich nur, wenn es zu einem ausreichenden Expositionsniveau kommt.

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfsubstanzen testen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Test erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann. Im englischen Sprachgebrauch spricht man in diesem Zusammenhang auch von „Between-laboratory reproducibility“ (38).

Intra-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. In diesem Zusammenhang spricht man auch von Laborinterner Reproduzierbarkeit (38).

Ausreißer: Ein Ausreißer ist ein Messwert, der sich beträchtlich von anderen Werten in einem zufällig ausgewählten Muster in einer Population unterscheidet.

Qualitätssicherung: Ein Managementprozess, mittels dessen die Einhaltung von Laborprüfnormen, Anforderungen und Aufzeichnungsverfahren, sowie die Genauigkeit des Datentransfers durch Individuen bewertet wird, die von den testenden Personen unabhängig sind.

Zuverlässigkeit: Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (38).

Hautsensibilisierung: Ein immunologischer Prozess, der auftritt, wenn ein empfindliches Individuum topisch einem induzierenden chemischen Allergen ausgesetzt ist, das eine kutane Immunreaktion auslöst, die zur Entwicklung einer Kontaktsensibilisierung führen kann.

Stimulationsindex (SI): Ein Wert, der zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials einer Prüfsubstanz berechnet wird. Der SI ist das Verhältnis der Proliferation in behandelten Gruppen zu dem der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe.

Prüfsubstanz (auch Prüfchemikalie): Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

B.51 Hautsensibilisierung: Lokaler Lymphknotentest: BrdU-ELISA

EINLEITUNG

1. Die OECD-Leitlinien für die Prüfung von Chemikalien und die EU-Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Die ursprüngliche Prüfmethode (B.42) zur Bestimmung der Hautsensibilisierung bei der Maus, der Lokale Lymphknotentest (Local Lymph Node Assay bzw. LLNA; OECD-Prüfrichtlinie 429) wurde inzwischen überarbeitet (1, und Kapitel B.42 in diesem Anhang). Verschiedene Veröffentlichungen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) gehen genauer auf die Validierung des LLNA und auf die mit ihm verbundenen wissenschaftlichen Arbeiten ein. Bei dem LLNA wird zur Messung der Lymphozytenproliferation radioisotopisches Thymidin oder Jod verwendet. Der Test hat daher Beschränkungen, wenn der Erwerb, die Verwendung oder die Entsorgung radioaktiver Materialien mit Problemen verbunden sind. Die Prüfmethode LLNA: BrdU-ELISA [Enzymgebundener Immunoassay] ist eine nicht-radioaktive Modifikation der LLNA-Prüfmethode, bei der nicht radioaktiv gekennzeichnetes 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS-] Nr. 59-14-3) in einem ELISA-basierten Testsystem zur Messung der Lymphozytenproliferation zum Einsatz kommt. Die Prüfmethode LLNA: BrdU-ELISA wurde durch ein internationales wissenschaftliches Gremium für Sachverständigengutachten (peer review) validiert, geprüft und zur Identifizierung hautreizender und nicht reizender Chemikalien mit einigen Beschränkungen als geeignet befunden (10) (11) (12). Diese Prüfmethode wurde zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) bei Tieren entwickelt. Kapitel B.6 dieses Anhangs und OECD-Prüfrichtlinie 406 stützen sich auf Meerschweinchen-Tests, insbesondere den Meerschweinchen-Maximierungstest und den Bühler-Test (13). Der LLNA (Kapitel B.42 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 429) und die beiden nicht-radioaktiven Modifikationen, LLNA: BrdU-ELISA (Kapitel B.51 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 442 B) und LLNA: DA (Kapitel B.50 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 442 A) haben insofern Vorteile gegenüber den Meerschweinchen-Tests in B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (13), als sie einen verringerten und gezielteren Einsatz von Versuchstieren ermöglichen.
2. Ähnlich wie der LLNA untersucht der LLNA: BrdU-ELISA die Induktionsphase der Hautsensibilisierung, und der Test liefert quantitative Daten für die Bewertung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Durch den möglichen Nachweis von hautsensibilisierenden Stoffen ohne die Verwendung radioaktiver Markierungen für die DNA können die berufliche Exposition gegenüber Radioaktivität und Entsorgungsprobleme vermieden werden. Dies wiederum ermöglicht eine verstärkte Verwendung von Mäusen zur Bestimmung hautsensibilisierender Stoffe und somit eine geringere Verwendung von Meerschweinchen zur Bewertung des hautsensibilisierenden Potenzials (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13).

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

3. Die verwendeten Begriffsbestimmungen sind in Anlage 1 aufgeführt.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. Die Prüfmethode LLNA: BrdU-ELISA ist eine modifizierte LLNA-Methode zum Nachweis von Chemikalien mit potenziell hautsensibilisierenden Eigenschaften, mit bestimmten Beschränkungen. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass der LLNA: BrdU-ELISA zwingend in jedem Fall anstelle des LLNA oder der Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13) eingesetzt werden muss. Vielmehr erweist sich der Test als gleichermaßen wertvoll und kann als Alternative gewählt werden, bei der im Allgemeinen keine weitere Bestätigung von positiven wie auch negativen Ergebnissen erforderlich ist (10) (11). Das Prüflabor sollte vor der Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz auswerten und berücksichtigen. Zu diesen Informationen zählen die Identität und die chemische Struktur der Prüfsubstanz, ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, die Ergebnisse aller sonstigen *in vitro*- oder *in vivo*-Toxizitätsprüfungen der Prüfsubstanz sowie toxikologische Daten zu strukturell verwandten Chemikalien. Dies gilt es zu berücksichtigen, um die Eignung des LLNA: BrdU-ELISA für die jeweilige Prüfsubstanz festzustellen (bestimmte chemische Stoffe sind mit dem LLNA: BrdU-ELISA nicht kompatibel [siehe Absatz 5]) und die Festlegung der Dosis zu erleichtern.
5. Die Prüfmethode LLNA: BrdU-ELISA ist eine *in vivo*-Methode. Das bedeutet, dass die kontaktsensibilisierenden Eigenschaften weiterhin an Tieren bewertet werden. Der Test erlaubt es jedoch, im Vergleich zu den Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) die Anzahl der für diesen Zweck benötigten Tiere zu reduzieren (13). Ferner stellt der LLNA: BrdU-ELISA eine substanzliche Verfeinerung in der Behandlung von Versuchstieren bei Tests auf allergische Kontaktsensibilisierung dar, da anders als B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 der LLNA: BrdU-ELISA keine Auslösung von provozierten Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut erfordert. Außerdem erfordert der LLNA: BrdU-ELISA, anders als der Meerschweinchen-Maximierungstest, keinen Einsatz von Adjuvanzien (Kapitel B.6 dieses Anhangs, 13). Damit verringert der LLNA: BrdU-ELISA das Leiden der Tiere. Trotz der Vorteile des LLNA: BrdU-ELISA gegenüber B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (13) ist er mit gewissen Einschränkungen behaftet, die die Anwendung von B.6 oder von OECD-Prüfrichtlinie 406 erforderlich machen können (z. B. die Prüfung bestimmter Metalle, falsch positive Ergebnisse bei bestimmten hautreizenden Stoffen [wie etwa bei tensidähnlichen Chemikalien] (6) (1 und Kapitel B.42 in diesem Anhang), oder die Löslichkeit der Prüfsubstanz). Zudem können chemische Klassen oder Substanzen mit Funktionsgruppen, die erwiesenermaßen als potenzielle Verwechslungsfaktoren wirken können (15), den Einsatz von Meerschweinchen-Tests erforderlich machen (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406 (13)). Beschränkungen, die für den LLNA festgestellt wurden (1 und Kapitel B.42 dieses Anhangs), empfehlen sich auch für den LLNA: BrdU-ELISA (10). Abgesehen von diesen bekannten Beschränkungen dürfte der LLNA: BrdU-ELISA für die Prüfung aller Chemikalien geeignet sein, sofern mit diesen Chemikalien keine Eigenschaften verbunden sind, die die Genauigkeit des LLNA: BrdU-ELISA beeinträchtigen könnten. Außerdem sollte die Möglichkeit positiver Grenzergebnisse in Betracht gezogen werden, wenn für den Stimulationsindex (SI) Werte zwischen 1,6 und 1,9 ermittelt werden (siehe Absätze 31-32). Dies beruht auf der Validierungs-Datenbasis von 43 Substanzen mit einem $SI \geq 1,6$ (siehe Absatz 6), bei denen der LLNA: BrdU-ELISA alle 32 LLNA-

Sensibilisatoren richtig identifizierte, jedoch zwei von 11 LLNA-Nichtsensibilisatoren mit SI-Werten zwischen 1,6 und 1,9 (*d. h.* positive Grenzwerte) nicht korrekt identifizierte (10). Da allerdings derselbe Datensatz für die Einstellung der SI-Werte und die Berechnung der prädiktiven Eigenschaften des Tests verwendet wurde, könnten die festgestellten Ergebnisse auch eine Überbewertung der tatsächlichen prädiktiven Eigenschaften sein.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

6. Der LLNA: BrdU-ELISA beruht auf dem Prinzip, dass sensibilisierende Stoffe eine Lymphozytenproliferation in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation des chemischen Stoffes induzieren. Diese Proliferation verläuft proportional zur Dosis und zur Wirksamkeit des applizierten Allergens und bietet sich als einfache Möglichkeit an, eine quantitative Messung der Sensibilisierung zu erhalten. Die Proliferation wird gemessen, indem man die mittlere Proliferation jeder Prüfgruppe mit der mittleren Proliferation der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe vergleicht. Das Verhältnis der mittleren Proliferation in jeder Behandlungsgruppe zu dem in der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe, auch als SI bezeichnet, wird festgelegt und sollte $\geq 1,6$ betragen, ehe eine weitere Bewertung einer Prüfsubstanz als potenzieller Hautsensibilisator erfolgt. Die hier beschriebenen Methoden beruhen auf der Messung des BrdU-Gehalts zur Anzeige einer erhöhten Anzahl proliferierender Zellen in den drainierenden aurikulären Lymphknoten. BrdU ist eine Nachbildung von Thymidin und wird ähnlich in die DNA proliferierender Zellen integriert. Die Integration von BrdU wird durch ELISA mittels eines für BrdU spezifischen Antikörpers gemessen, der auch mit Peroxidase markiert wird. Bei Hinzufügung des Substrats reagiert die Peroxidase mit diesem und es entsteht ein gefärbtes Produkt, das mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts auf ein bestimmtes Absorptionsmaß quantifiziert wird.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Auswahl von Versuchstierarten

7. Für diesen Test ist die Maus die Spezies der Wahl. Validierungsstudien für den LLNA: BrdU-ELISA wurden ausschließlich mit dem CBA/JN-Stamm durchgeführt, der daher als bevorzugter Stamm gilt (10) (12). Es werden junge erwachsene weibliche Mäuse verwendet, die weder geworfen haben noch trächtig sind. Bei Versuchsbeginn sollten die Tiere 8-12 Wochen alt sein, die Gewichtsunterschiede minimal sein und 20 % des mittleren Gewichts nicht übersteigen. Alternativ können Tests an anderen Stämmen und männlichen Tieren erfolgen, wenn anhand von hinlänglich großen Datenangaben nachgewiesen werden kann, dass keine signifikanten stamm- und/oder geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Reaktion auf den LLNA: BrdU-ELISA bestehen.

Haltungs- und Fütterungsbedingungen

8. Mäuse sollten in Gruppen gehalten werden (16), wenn nicht relevante wissenschaftliche Argumente eine Einzelhaltung nahelegen. Die Temperatur im Versuchsräum sollte 22 ± 3 °C betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und zu anderen Zeiten als während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen soll, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

Vorbereitung der Tiere

9. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert (aber nicht am Ohr) und vor Beginn der Dosierung für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Vor Behandlungsbeginn werden alle Tiere auf sichtbare Hautverletzungen untersucht.

Vorbereitung der Dosierlösungen

10. Feste Chemikalien sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in Lösungsmitteln/Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Chemikalien können direkt appliziert oder zuvor verdünnt werden. unlösliche Chemikalien, wie sie in der Regel in Medizinprodukten vorliegen, sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in einem geeigneten Lösungsmittel einer übermäßigen Extraktion unterzogen werden, um alle extrahierbaren Inhaltsstoffe vor der Prüfung sichtbar zu machen. Die Prüfsubstanzen sollten täglich zubereitet werden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

11. Anhand von positiven Kontrollchemikalien wird die ordnungsgemäße Leistung des Tests nachgewiesen. Hierzu ist eine angemessene und reproduzierbare Empfindlichkeit der Reaktion auf eine sensibilisierende Prüfsubstanz erforderlich, wobei das Reaktionsausmaß genau zu charakterisieren ist. Es wird die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrolle empfohlen, da diese die Fähigkeit des Labors belegt, jeden Test erfolgreich durchzuführen und eine Bewertung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors ermöglicht. Einige Regulierungsbehörden schreiben auch eine Positivkontrolle für jede Studie vor. Daher wird Benutzern empfohlen, vor Durchführung des LLNA: BrdU-ELISA die zuständigen Behörden zu Rate zu ziehen. Dementsprechend wird die routinemäßige Verwendung einer gleichzeitigen Positivkontrolle angeregt, um die Notwendigkeit zusätzlicher Tierversuche zur Erfüllung von Anforderungen zu vermeiden, die aus der Verwendung einer nur periodischen Positivkontrolle resultieren könnten (siehe Absatz 12). Die Positivkontrolle sollte eine positive Reaktion auf den LLNA: BrdU-ELISA bei einem Expositionsniveau hervorrufen, das einen Anstieg des Stimulationsindex ($I \geq 1,6$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe) bewirkt. Die positive Kontrolldosis soll so gewählt werden, dass sie keine übermäßige Hautreizung oder systemische Toxizität verursacht und die Induktion reproduzierbar, aber nicht exzessiv ist (z. B. ein SI > 14 würde als exzessiv gelten). Bevorzugte positive Kontrollstoffe sind 25 % Hexylcinnaminaldehyd (CAS-Nr. 101-86-0) und 25 % Eugenol (CAS-Nr. 97-53-0) in Aceton: Olivenöl (4:1, v/v). Unter bestimmten Umständen können in ausreichend begründeten Fällen andere Kontrollsubstanzen eingesetzt werden, die den genannten Kriterien entsprechen.
12. Obwohl die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrollgruppe empfohlen wird, können in gewissen Situationen periodische Prüfungen (d. h. in Abständen ≤ 6 Monaten) der Positivkontrolle für Laboratorien ausreichen, die denen der LLNA: BrdU-ELISA regelmäßig (d. h. mindestens einmal pro Monat) durchgeführt wird und die über eine etablierte historische Kontrolldatenbasis verfügen, die die Fähigkeit des Labors bestätigt, reproduzierbare und genaue Ergebnisse mit Positivkontrollen zu erzielen. Eine angemessene Beherrschung des LLNA: BrdU-ELISA kann erfolgreich nachgewiesen werden, indem durchgehend positive Ergebnisse mit der

Positivkontrolle in mindestens 10 unabhängigen Prüfungen erzielt werden, die innerhalb eines angemessenen Zeitraums (*d. h.* in weniger als einem Jahr) durchgeführt wurden.

13. Eine gleichzeitige Positivkontrollgruppe sollte immer einbezogen werden, wenn Verfahrensänderungen im LLNA: BrdU-ELISA auftreten (*z. B.* Wechsel des geschulten Personals, Änderung der Prüfmethoden, -materialien und/oder Reagenzien, Änderung der Prüfgeräte, Änderung der Herkunft der Versuchstiere). Solche Änderungen sollten in Laborberichten dokumentiert werden. Ferner ist der Einfluss dieser Änderungen auf die Aussagefähigkeit der zuvor eingerichteten historischen Datenbank zu bedenken. Dabei sollte die Notwendigkeit überdacht werden, eine neue historische Datenbank einzurichten, um die gleichbleibende Qualität der positiven Kontrollergebnisse zu dokumentieren.
14. Die Prüfer sollten sich der Tatsache bewusst sein, dass die Entscheidung, eine PK-Studie periodisch statt gleichzeitig durchzuführen, Auswirkungen auf die Aussagefähigkeit und Akzeptanz negativer Studienergebnisse haben kann, die ohne gleichzeitige Positivkontrolle im Zeitraum zwischen den einzelnen periodischen PK-Studien auftreten können. Wenn zum Beispiel ein falsch negatives Ergebnis in der periodischen PK-Studie auftritt, können negative Ergebnisse für die Prüfsubstanz, die in dem Zeitraum zwischen der letzten akzeptablen periodischen PK-Studie und der inakzeptablen periodischen PK-Studie aufgetreten waren, in Frage gestellt werden. Die Auswirkungen solcher Ergebnisse sollten sorgfältig bedacht werden, wenn entschieden wird, ob gleichzeitige oder nur periodische PKs durchgeführt werden sollen. Auch ist die Verwendung einer geringeren Anzahl an Versuchstieren bei der gleichzeitigen Positivkontrollgruppe zu bedenken, wenn dies wissenschaftlich zu begründen ist und wenn das Labor auf der Grundlage laborspezifischer historischer Daten demonstriert, dass eine geringere Anzahl an Mäusen ausreicht (17).
15. Obwohl die Positivkontrolle in dem Vehikel geprüft werden sollte, von dem bekannt ist, dass es eine gleichbleibende Reaktion hervorruft (*z. B.* Aceton: Olivenöl; 4:1, v/v), können in bestimmten Rechtssituationen auch Prüfungen in einem Nichtstandard-Vehikel (klinisch/chemisch relevante Formulierung) erforderlich sein (18). Wenn die gleichzeitige Positivkontrolle in einem anderen Vehikel als der Prüfsubstanz getestet wird, sollte eine gesonderte Vehikelkontrolle für die PK einbezogen werden.
16. In Fällen, in denen Prüfsubstanzen einer bestimmten chemischen Klasse oder eine Reihe von Reaktionen bewertet werden, können Vergleichssubstanzen nützlich sein, um nachzuweisen, dass die Prüfmethode zur Feststellung des Hautsensibilisierungspotenzials dieser Art von Substanzen ordnungsgemäß funktioniert. Geeignete Vergleichssubstanzen sollten die folgenden Eigenschaften haben:
 - strukturelle und funktionale Ähnlichkeit mit der Klasse der getesteten Prüfsubstanz;
 - bekannte physikalische/chemische Eigenschaften;
 - zugrunde liegende Daten aus dem BrdU-ELISA;
 - zugrunde liegende Daten aus anderen Tiermodellen und/oder von Menschen.

TESTVERFAHREN

Anzahl der Versuchstiere und Dosierungen

17. Mindestens vier Tiere pro Dosisgruppe mit jeweils mindestens drei Konzentrationen der Prüfsubstanz werden benötigt; zusätzlich braucht man eine Negativkontrollgruppe, die nur mit dem Vehikel für die Prüfsubstanz behandelt wird, sowie eine Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums, auf der Grundlage der Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15). Tests mit Mehrfachdosen der PK sollten in Erwägung gezogen werden, insbesondere wenn die Positivkontrolle intermittierend getestet wird. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.
18. Die Auswahl von Dosierung und Vehikel sollte auf den Empfehlungen in den Referenzen 2 und 19 beruhen. Für aufeinanderfolgende Dosierungen werden normalerweise geeignete abgestufte Konzentrationen gewählt, wie z. B. 100 %, 50%, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % usw. Die Auswahl der Konzentrationsfolge sollte angemessen wissenschaftlich begründet werden. Alle vorhandenen toxikologischen Angaben (z. B. über die akute Toxizität und Hautreizung) sowie strukturelle und physiochemische Angaben zu der jeweiligen Prüfsubstanz (und/oder strukturverwandten Substanzen) sollten bei der Festlegung von drei aufeinander folgenden Konzentrationen berücksichtigt werden, so dass bei der Höchstkonzentration einerseits die Exposition maximiert und andererseits eine systemische Toxizität und/oder eine übermäßige lokale Hautreizung ausgeschlossen werden (19) (20 und Kapitel B.4 dieses Anhangs). Mangels solcher Informationen kann ein anfänglicher Dosisfindungstest erforderlich sein (siehe Absätze 21-24).
19. Das Vehikel sollte das Testergebnis nicht beeinflussen oder beeinträchtigen und sollte so gewählt werden, dass die Löslichkeit zur Erzielung einer möglichst hohen Konzentration maximiert und gleichzeitig eine für das Applizieren der Prüfsubstanz geeignete Lösung/Suspension hergestellt werden kann. Empfohlene Vehikel sind Aceton: Olivenöl (4:1, v/v), N,N-Dimethylformamid, Methylethyleketon, Propylenglykol und Dimethylsulphoxid (6), wobei mit hinreichender wissenschaftlicher Begründung auch andere Vehikel verwendet werden können. Unter bestimmten Umständen muss ein klinisch relevantes Lösungsmittel oder die handelsübliche Zubereitung, in der die Prüfsubstanz vermarktet wird, als zusätzliche Kontrolle genutzt werden. Besondere Sorgfalt sollte darauf verwendet werden, zu gewährleisten, dass in das Vehikelsystem durch die Verwendung geeigneter Lösungsvermittler (z. B. 1 % Pluronic® L92) hydrophile Stoffe eingearbeitet werden, die die Haut befeuchten und nicht sofort ablaufen. Folglich sind vollständig wässrige Vehikel zu vermeiden.
20. Die Arbeit an Lymphknoten einzelner Mäuse ermöglicht die Bewertung der Variabilität von Tieren sowie einen statistischen Vergleich zwischen der Prüfsubstanz und Messungen an der Vehikelkontrollgruppe (siehe Absatz 33). Die Möglichkeit, die Anzahl der Mäuse in der Positivkontrollgruppe zu verringern, ist nur realistisch, wenn Einzeltierdaten erhoben werden (17). Außerdem verlangen einige Regulierungsbehörden die Erhebung von Daten einzelner Tiere. Die regelmäßige Erhebung von Einzeltierdaten stellt im Hinblick auf den Tierschutz einen Vorteil dar, indem Doppeltests vermieden werden. Diese wären notwendig, wenn die ursprünglich gemeinsam gesammelten Ergebnisse für die Prüfsubstanz (z. B. über gepoolte Daten) später von Regulierungsbehörden mit anderen Vorschriften (z. B. Einzeltierdaten) geprüft würden.

Dosisfindungstest

21. Wenn über die höchst mögliche Dosierung keine Informationen vorliegen (siehe Absatz 18), sollte ein Dosisfindungstest durchgeführt werden, um die geeignete

Dosierung für den LLNA: BrdU-ELISA festzulegen. Der Dosisfindungstest soll eine Orientierung bei der Auswahl der höchst möglichen Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA: BrdU-ELISA geben, wenn keine Informationen darüber vorliegen, welche Konzentration systemische Toxizität (siehe Absatz 24) und/oder übermäßige lokale Hautreizung (siehe Absatz 23) verursacht. Die höchste geprüfte Dosisstufe sollte eine Konzentration von 100 % der Prüfsubstanz bei Flüssigkeiten bzw. die höchst mögliche Konzentration bei Feststoffen oder Suspensionen sein.

22. Der Dosisfindungstest wird unter Bedingungen durchgeführt, die denen der Hauptstudie des LLNA: BrdU-ELISA genau entsprechen. Allerdings gibt es hier keine Bewertung der Lymphknotenproliferation und es können nicht so viele Tiere pro Dosisgruppe eingesetzt werden. Es werden ein oder zwei Tiere pro Dosisgruppe empfohlen. Alle Mäuse werden täglich auf klinische Zeichen für systemische Toxizität oder lokale Reizungen an der Applikationsstelle untersucht. Das Körpergewicht wird vor dem Test und vor dem Abschluss (Tag 6) protokolliert. Beide Ohren jeder Maus werden auf Anzeichen für Erytheme untersucht und mit Hilfe von Tabelle 1 (20 und Kapitel B.4 dieses Anhangs) bewertet. Die Ohrdicke wird mit Hilfe eines Ohrdickenmessgeräts (z. B. digitaler Mikrometer oder Peacock Dickenmessuhr) an Tag 1 (Vordosis), Tag 3 (ca. 48 Stunden nach der ersten Dosis) und Tag 6 bestimmt. Zusätzlich kann an Tag 6 die Ohrdicke durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben ermittelt werden. Dies sollte nach der tierschutzgerechten Tötung der Tiere erfolgen. Eine übermäßige lokale Hautreizung wird durch eine Erythem-Punktzahl von ≥ 3 und/oder eine Zunahme der Ohrdicke $\geq 25\%$ an jedem beliebigen Messtag angezeigt (21) (22). Als höchste Dosis für die Hauptuntersuchung des LLNA: BrdU-ELISA wird die nächst niedrigere Dosis in der Konzentrationsreihe des Dosisfindungstests gewählt (siehe Absatz 18), die keine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung verursacht.

Tabelle 1: Erythem-Klassifizierung

Beobachtung	Punktzahl
Kein Erythem	0
Sehr leiches Erythem (kaum wahrnehmbar)	1
Klar abgegrenztes Erythem	2
Mäßig bis ausgeprägtes Erythem	3
Schweres Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist	4

23. Zusätzlich zu einer Zunahme der Ohrdicke um 25 % (21) (22) wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Ohrdicke bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zugrundelegt, um Reizstoffe in dem LLNA zu identifizieren (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Obwohl ein statistisch signifikanter Anstieg auch bei einer Ohrdicke von weniger als 25 % auftreten kann, konnte kein spezifischer Zusammenhang mit einer übermäßigen Hautreizung festgestellt werden (25) (26) (27) (28) (29).
24. Die folgenden klinischen Beobachtungen können, sofern sie Bestandteil einer Gesamtbewertung sind, auf systemische Toxizität hinweisen (30) und somit die höchst mögliche Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA: BrdU-ELISA anzeigen:

Änderungen der Funktionen des Nervensystems (z. B. Piloerektion, Ataxie, Tremor und Krämpfe); Verhaltensänderungen (z. B. Aggressivität, Änderungen bei der Fellpflege, auffallende Änderung des Aktivitätsniveaus); Änderungen des Atemmusters (d. h. Änderung der Häufigkeit und Intensität des Atmens wie Dyspnoe, Keuchen, rasselnder Atem) sowie Änderungen der Futter- und Wasseraufnahme. Zusätzlich sollten Anzeichen von Lethargie und/oder Teilnahmslosigkeit sowie alle klinischen Anzeichen für mehr als leichte oder momentane Schmerzen und Qual, eine Gewichtsreduktion von > 5 % zwischen Tag 1 und Tag 6 und die Sterblichkeit in der Bewertung berücksichtigt werden. Moribunde Tiere oder Tiere, die Anzeichen starker und andauernder Qualen zeigen, sollten tierschutzgerecht getötet werden (31).

Versuchsplan der Hauptuntersuchung

25. Der Versuchsplan des Tests ist wie folgt:

- Tag 1:

Jedes Tier wird einzeln gekennzeichnet und das Gewicht sowie jede klinische Beobachtung protokolliert. Es werden 25 µL der Prüfsubstanz in der jeweiligen Verdünnung, des Vehikels allein oder der Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums) gemäß den Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15) auf die Rückseite jedes Ohrs appliziert.

- Tag 2 und 3:

Die am Tag 1 durchgeführte Applikationsprozedur wird wiederholt.

- Tag 4:

Keine Behandlung.

- Tag 5:

Es werden 0,5 mL (5 mg/Maus) BrdU-Lösung (10 mg/mL) in die Bauchhöhle gespritzt.

- Tag 6:

Das Gewicht jedes Tiers sowie jede klinische Beobachtung werden protokolliert. Ca. 24 Stunden (24 h) nach der BrdU-Injektion werden die Tiere tierschutzgerecht getötet. Die drainierenden aurikulären Lymphknoten jedes Mäuseohrs werden entfernt und separat (für jedes Tier einzeln) in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Einzelheiten und Diagramme der Lymphknotenidentifikation und -entfernung sind unter Referenz (17) aufgeführt. Zur weiteren Kontrolle der lokalen Hautreaktion in der Hauptuntersuchung können zusätzliche Parameter wie die Auswertung des Ohr-Erythems oder Ohrdickemessungen (mittels eines Dickenmessgeräts oder durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben bei der Nekropsie) in das Untersuchungsprotokoll aufgenommen werden.

Vorbereitung der Zellsuspensionen

26. Für jede Maus wird aus den paarweise entnommenen Lymphzellenknoten (LNC) durch vorsichtigen mechanischen Aufschluss in einem Edelstahlfilter mit einer Maschenweite von 200 Mikron oder mittels einer anderen geeigneten Technik (z. B. Verwendung eines wegwerfbaren Kunststoff-Stößels zum Zerkleinern der Lymphknoten, die anschließend durch ein #70 Nylon-Gewebe passiert werden) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Das Verfahren zur Zubereitung der Lymphknotensuspension ist für diesen Test von entscheidender Bedeutung. Deshalb sollte jeder Prüfer diese Technik im Voraus gut beherrschen. Die Lymphknoten bei Tieren der Negativkontrollgruppe sind klein; daher ist Vorsicht geboten, um künstliche Effekte auf die SI-Werte zu vermeiden. In jedem Fall sollte das Zielvolumen der LNC-Lösung an ein vorgegebenes Optimalvolumen (ca. 15 mL) angepasst werden. Das Optimalvolumen beruht auf der Erzielung eines mittleren Absorptionsmaßes der Negativkontrollgruppe zwischen 0,1 und 0,2.

Bestimmung der Zellproliferation (Messung des BrdU-Gehalts in der DNA der Lymphozyten)

27. Die Messung des BrdU erfolgt im ELISA mit einem im Handel erhältlichen Mess-Kit (z. B. Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland, Katalog-Nr. 11 647 229 001). Darauf werden kurz 100 µL der Lymphknoten-Suspension in die Vertiefungen einer flachgrundigen Mikroplatte in dreifacher Ausfertigung gegeben. Nach der Fixierung und Denaturierung der Lymphknoten-Suspension werden in jede Vertiefung Anti-BrdU-Antikörper gegeben und zur Reaktion gebracht. Die Anti-BrdU-Antikörper werden anschließend durch Spülen entfernt. Die Substratlösung wird hinzugefügt und kann Chromogen erzeugen. Anschließend wird das Absorptionsmaß bei 370 nm mit einer Referenzwellenlänge von 492 gemessen. In allen Fällen sollten die Prüfbedingungen des Tests optimiert werden (siehe Absatz 26).

BEOBACHTUNGEN

Klinische Beobachtungen

28. Jede Maus sollte mindestens einmal täglich sorgfältig auf klinische Zeichen, d. h. lokale Reizung an der Applikationsstelle, oder auf systemische Toxizität untersucht werden. Alle Beobachtungen werden systematisch in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Die Überwachungspläne sollten Kriterien beinhalten, anhand derer Mäuse mit systemischer Toxizität, übermäßiger lokaler Hautreizung oder Hautverätzung schnell zu Zwecken der schmerzlosen Tötung identifiziert werden können (31).

Körpergewicht

29. In Abschnitt 25 wurde bereits ausgeführt, dass das Körpergewicht der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der tierschutzgerechten Tötung der Tiere laut Versuchsplan festgestellt werden soll.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

30. Die Ergebnisse für jede Behandlungsgruppe werden als mittlerer Stimulationsindex (SI) angegeben. Den SI erhält man durch Teilen des mittleren BrdU-Markierungsindex pro Maus innerhalb jeder Prüfgruppe und der Positivkontrollgruppe durch den mittleren BrdU-Markierungsindex pro Maus für die Lösungsmittel/Vehikelkontrollgruppe. Der durchschnittliche SI beträgt demnach für die mit Vehikel behandelten Kontrollen 1.

Der BrdU-Markierungsindex ist definiert als:

$$\text{BrdU-Markierungsindex} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

Dabei gilt: em = Emissionswellenlänge und ref = Referenzwellenlänge.

31. In dem Entscheidungsprozess gilt ein Ergebnis als positiv, wenn $\text{SI} \geq 1,6$ ist (10). Die Stärke der Dosis-Wirkung, die statistische Signifikanz und die gleichbleibende Qualität der Lösungsmittel-/Vehikel-Reaktion sowie der Reaktion der Positivkontrolle können aber auch benutzt werden, um festzulegen, ob ein Grenzergebnis (*d. h.* SI-Wert zwischen 1,6 und 1,9) als positiv bezeichnet werden soll (3) (6) (32).
32. Bei einer positiven Grenzwertreaktion mit einem SI zwischen 1,6 und 1,9 können Benutzer zusätzliche Informationen berücksichtigen, wie z. B. die Dosis-Wirkungs-Beziehung, das Vorliegen einer systemischen Toxizität oder übermäßigen Hautreizung, sowie gegebenenfalls die statistische Signifikanz zusammen mit den SI-Werten, um zu bestätigen, dass die Ergebnisse positiv sind (10). Zu beachten sind ferner die verschiedenen Eigenschaften der Prüfsubstanz, wobei es unter anderem zu klären gilt, ob ein struktureller Zusammenhang mit bekannten Hautsensibilisatoren besteht, ob sie eine übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus hervorruft und wie die festgestellte Art der Dosis-Wirkungs-Beziehung ist. Diese und weitere Aspekte werden an anderer Stelle ausführlich erörtert (4).
33. Werden die Daten für jede einzelne Maus erhoben, kann eine statistische Analyse zu Vorhandensein und Grad des Dosis-Wirkungs-Verhältnisses in den Daten durchgeführt werden. Jede statistische Auswertung könnte eine Bewertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie geeignete Testgruppen-Vergleiche beinhalten (*z. B.* Gruppe mit paarweiser Dosierung vs. gleichzeitige Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppen). Die statistischen Analysen könnten *z. B.* die lineare Regression, den Williams-Test zur Bewertung von Dosis-Wirkungs-Trends oder den Dunnett-Test für paarweise Vergleiche beinhalten. Bei der Auswahl einer geeigneten Methode für die statistische Analyse sollte sich der Prüfer möglicher ungleicher Varianzen und anderer damit zusammenhängender Probleme stets bewusst sein, denn diese erfordern unter Umständen eine Datentransformation oder ein nicht-parametrisches statistisches Verfahren. Auf jeden Fall muss der Prüfer unter Umständen SI-Berechnungen und statistische Analysen mit und ohne bestimmte Datenpunkte (manchmal als „Ausreißer“ bezeichnet) vornehmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Daten

34. Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Sie sollten die BrdU-Index-Werte pro Tier, den mittleren BrdU-Markierungsindex pro Tier für jede Gruppe, die

damit verbundene Fehlervariable (z. B. SD, SEM) und den mittleren SI für jede Dosisgruppe, verglichen mit der gleichzeitigen Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppe angeben.

Prüfbericht

35. Der Testbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüf- und Kontrollsubstanzen:

- Angaben zur Identität (z. B. CAS-Nummer und EG-Nummer, falls vorhanden; Bezugsquelle; Reinheit; bekannte Verunreinigungen; Chargennummer);
- physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Flüchtigkeit, Stabilität, Löslichkeit);
- bei Mischungen Zusammensetzung und relative Anteile der Bestandteile in Prozent;

Lösungsmittel/Vehikel:

- Angaben zur Identität (Reinheit, Konzentration, gegebenenfalls verwendete Mengen);
- Begründung für die Wahl des Vehikels;

Versuchstiere:

- Herkunft der CBA-Mäuse;
- mikrobiologischer Status der Tiere, soweit bekannt;
- Anzahl und Alter der Tiere;
- Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

Prüfbedingungen:

- Herkunft, Chargennummer und Angaben des Herstellers zu Qualitätssicherung/Qualitätskontrolle (Antikörperempfindlichkeit und -spezifität sowie Nachweisgrenze) für das ELISA-Kit;
- Angaben zur Vorbereitung und Applikation der Prüfsubstanz;
- Begründung der gewählten Dosierung (mit Ergebnissen des eventuell durchgeführten Dosisfindungstests);
- verwendete Konzentrationen des Vehikels und der Prüfsubstanz sowie Gesamtmenge der applizierten Prüfsubstanz;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle);
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv oder negativ;
- Einzelheiten zu eventuellen Protokollabweichungen und eine Erklärung dazu, wie sich diese Abweichung auf Prüfdesign und Ergebnisse auswirkt.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

- Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der letzten Überprüfung der Zuverlässigkeit mit Angaben zu verwendeten Prüfsubstanzen, Konzentration und Vehikel;
- gleichzeitige und/oder historische Positivkontrolle und gleichzeitige Daten der Negativkontrolle (Lösungsmittel/Vehikel) für das Prüflabor;
- wenn keine gleichzeitige PK eingeschlossen war, Datum und Laborbericht über die jüngste periodische PK sowie ein Bericht mit ausführlichen Angaben über die historischen positiven Kontrollen des Labors mit Angabe der Gründe, warum keine gleichzeitige PK durchgeführt wurde;

Ergebnisse:

- Gewicht der einzelnen Tiere bei Beginn der Prüfung und zum Zeitpunkt der tierschutzgerechten Tötung laut Versuchsplan, sowie mittlere und zugehörige Fehlervariable (z. B. SD, SEM) für jede Behandlungsgruppe;
- Beginn und zeitlicher Verlauf der toxischen Erscheinungen für jedes Tier, einschließlich gegebenenfalls Hautreizungen an der Stelle der Verabreichung;
- Tabelle der BrdU-Markierungsindizes für jede Maus und der SI-Werte für jede Dosis-Behandlungsgruppe;
- mittlere zugehörige Fehlervariable (z. B. SD, SEM) für den BrdU-Markierungsindex/Maus für jede Behandlungsgruppe sowie die Ergebnisse der Ausreißer-Analyse für jede Behandlungsgruppe;
- berechneter SI und geeignete Messung der Variabilität, welche die Variabilität der Tiere sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe berücksichtigt;
- Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- gegebenenfalls statistische Analysen.

Diskussion der Ergebnisse:

- Kurze Auswertung der Ergebnisse, der Dosis-Wirkungs-Beziehung und gegebenenfalls statistische Analysen mit Schlussfolgerungen zur Frage, ob die Prüfsubstanz als Hautsensibilisator eingestuft werden soll.

LITERATUR

- (1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.
- (3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.
- (4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.
- (5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular

weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

- (6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]
- (7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 258-273.
- (8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 274-286.
- (9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34(3), 249-257.
- (10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>]
- (11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]
- (12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.*, 25, 129-134.
- (13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

- (15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.
- (16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.
- (17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]
- (18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.
- (19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.
- (20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.
- (22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>].
- (23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- (24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- (25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- (26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- (27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005),

A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

- (28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- (29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- (30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].
- (31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 53, 563-79.
- (33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Abrufbar unter: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Genauigkeit: Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (33).

Vergleichssubstanz: Eine sensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanz, die als Norm zu Vergleichszwecken für eine Prüfsubstanz verwendet wird. Geeignete Vergleichssubstanzen sollten die folgenden Eigenschaften haben: (i) gleichbleibende und verlässliche Quelle(n); (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Effekten und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

Falsch negativ: Eine Prüfsubstanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als negativ oder nicht wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit positiv bzw. wirksam ist (33).

Falsch positiv: Eine Prüfsubstanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als positiv oder wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit negativ bzw. nicht wirksam ist (33).

Gefahr: Potenzial eines negativen Effekts für Gesundheit oder Umwelt. Die negative Wirkung manifestiert sich nur, wenn es zu einem ausreichenden Expositionsniveau kommt.

Inter-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfsubstanz testen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Test erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann. Im englischen Sprachgebrauch spricht man in diesem Zusammenhang auch von „Between-laboratory reproducibility“ (33).

Intra-Labor-Reproduzierbarkeit: Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. In diesem Zusammenhang spricht man auch von Laborinterner Reproduzierbarkeit (33).

Ausreißer: Ein Ausreißer ist ein Messwert, der sich beträchtlich von anderen Werten in einem zufällig ausgewählten Muster in einer Population unterscheidet.

Qualitätssicherung: Ein Managementprozess, mittels dessen die Einhaltung von Laborprüfnormen, Anforderungen und Aufzeichnungsverfahren, sowie die Genauigkeit des Datentransfers durch Individuen bewertet wird, die von den testenden Personen unabhängig sind.

Zuverlässigkeit: Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (33).

Hautsensibilisierung: Ein immunologischer Prozess, der auftritt, wenn ein empfindliches Individuum topisch einem induzierenden chemischen Allergen ausgesetzt ist, das eine kutane Immunreaktion auslöst, die zur Entwicklung einer Kontaktsensibilisierung führen kann.

Stimulationsindex (SI): Ein Wert, der zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials einer Prüfsubstanz berechnet wird. Der SI ist das Verhältnis der Proliferation in behandelten Gruppen zu dem der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe.

Prüfsubstanz (auch Prüfchemikalie): Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.“