



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven

Rapport 340720005/2011

R.J. Vandebriel | A.Opperhuizen



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven

RIVM Rapport 340720005/2011

Colofon

© RIVM 2011

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

R.J. Vandebriel, RIVM/GBO
A. Opperhuizen, RIVM/GBO

Contact:
R.J. Vandebriel
RIVM/GBO
rob.vandebriel@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie van VWS, in het kader van project V340720.

Rapport in het kort

Knelpunten bij de ontwikkeling, validatie en implementatie van Alternatieven voor Dierproeven

Het RIVM heeft geïnventariseerd welke knelpunten door de belangrijkste actoren worden ervaren in de internationale keten waarin testen en teststrategieën worden ontwikkeld, gevalideerd, geïmplementeerd en geaccepteerd op basis van het 3V-principe. Het gaat hierbij om de ontwikkeling van gevalideerde testen, databases en beoordelingsstrategieën om het aantal dierproeven te vervangen, verfijnen en verminderen (3V). De inventarisatie is uitgevoerd in opdracht van het ministerie van VWS en is bedoeld als bijdrage aan de uitwerking van de Kabinetsvisie Alternatieven voor Dierproeven uit 2009.

De belangrijkste constatering is dat bij de huidige keten samenhang, afstemming en regie ontbreekt. Zo zouden ontwikkelaars van alternatieve testen zich meer op het gebruik ervan in de praktijk moeten richten en niet alleen op het wetenschappelijk onderzoek. Bovendien moeten ontwikkelaars van alternatieve testen regelgevers betrekken tijdens de ontwikkeling van die testen om de kansen op validatie, implementatie en acceptatie te vergroten. Evenzeer moeten regelgevers aangeven voor welke doeleinden alternatieve testen moeten worden ontwikkeld om aan deze regelgevende behoeften te voldoen. De industrie kan bovendien het gebruik van alternatieve testen en strategieën stimuleren. Hiervoor is het nodig dat regelgevers en beoordelaars de resultaten van bruikbare alternatieve testen zullen accepteren en erkennen bij de beoordeling van onder meer stoffen, geneesmiddelen en vaccins. Nationale coördinatie kan tot meer samenhang leiden in de Nederlandse initiatieven, maar dat betekent nog niet automatisch dat daardoor meer sturing komt op de internationale validatieprogramma's en op acceptatie van gevalideerde alternatieven door internationale gremia van beoordelaars en regelgevers.

Trefwoorden:

alternatieven voor dierproeven, ontwikkeling, validatie, implementatie, knelpunten

Abstract

Bottlenecks in the development of validated tests, databases and assessment strategies based on Alternatives to Animal Experiments

RIVM has identified a series of bottlenecks encountered by stakeholders of the chain in which tests and test strategies are developed, implemented and accepted based on the 3R-principle. These focused on the development of validated tests, databases and assessment strategies whereby animal tests may be replaced, refined and reduced (3R). This study is commissioned by the Ministry of Public Health, Welfare and Sport, and should support the follow-up on the Vision on Alternatives to Animal Testing of the Dutch Government.

The main observation in the report is the lack of coherence, fine-tuning and guidance for the many stakeholders and activities in the chain between development, validation, acceptance and implementation of alternatives to animal testing. Those who develop tests, strategies and databases should focus more on realistic options for actual use and should not only focus on scientific research. Regulators should be invited by the researchers during the development to create better options for actual validation, implementation and acceptance of tests. In addition, the regulator's needs would be better met if they provide better guidance to researchers with regard to identifying areas where there is a need for alternative tests and strategies. Industry also can stimulate the application of alternatives tests and strategies, although it will be necessary that regulators and risk assessors indicate more clearly the acceptance criteria for information generated by alternative tests, databases and strategies for the assessment of, among others, chemicals, medicines and vaccines. Coordination at the national level will create more coherence among Dutch initiatives, but this does not automatically lead to more guidance for international validation programs and the acceptance of validated alternatives for animal testing by international platforms of risk assessors and regulators.

Keywords:

alternatives for animal testing, development, validation, implementation, bottlenecks

Inhoud

Samenvatting—7

Summary—9

- 1 Inleiding—11**
 - 1.1 Stoffenbeleid en alternatieven voor dierproeven—12
 - 1.2 CMRS stoffen en alternatieven voor dierproeven—13
 - 1.3 Voeding en alternatieven voor dierproeven—15
 - 1.4 Geneesmiddelen en alternatieven voor dierproeven—17
 - 1.4.1 Inleiding—17
 - 1.4.2 Regulering—17
 - 1.4.3 Praktijk—18
 - 1.4.4 Registreren en vrijgeven—18
 - 1.4.5 Registreren—18
 - 1.4.6 Implementatie van nieuwe teststrategieën in het geneesmiddelenveld—18
 - 1.4.7 Vrijgifte—19
 - 1.5 Vaccins en alternatieven voor dierproeven—20
 - 1.6 Drempels in het traject tussen ontwikkeling en implementatie van alternatieven voor dierproeven—20

- 2 Testontwikkeling en validatie van Alternatieven voor Dierproeven—23**
 - 2.1 Welke testen zijn door ECVAM, ICCVAM en JaCVAM gevalideerd en welke soorten effecten kunnen hiermee in beeld worden gebracht?—23
 - 2.2 Welke gevalideerde vervangende testen worden gebruikt in het veiligheidsonderzoek?—25
 - 2.3 Welke gevalideerde vervangende testen worden niet gebruikt in het veiligheidsonderzoek en waarom niet?—25
 - 2.4 Welke testen zijn momenteel in een fase van validatie?—25
 - 2.4.1 Alternatieve testen in het validatieproces bij de OECD—25
 - 2.4.2 Alternatieve testen in het validatieproces—26

- 3 Acceptatie van (gevalideerde) testen in het veiligheidsonderzoek—29**
 - 3.1 Worden er nog steeds testen geaccepteerd waarin het 3V-principe niet wordt gehanteerd?—29
 - 3.1.1 OECD—29
 - 3.1.2 EPAA—30
 - 3.2 Voor welke gebieden in het veiligheidsonderzoek is acceptatie van alternatieven aan de orde?—31

- 4 Databases die van belang zijn bij de ontwikkeling van nieuwe beoordelingstrategieën in het veiligheidsonderzoek—33**
 - 4.1 Welke databases zijn in ontwikkeling om bij te dragen aan alternatieve teststrategieën in het veiligheidsonderzoek?—33
 - 4.1.1 Toxicologische databases—33
 - 4.1.2 Overig—34
 - 4.1.3 Op 3V gerichte databases—34
 - 4.1.4 EU-projecten met data compilaties—34
 - 4.1.5 Commerciële databases—35
 - 4.2 Welke databases zijn het meest kansrijk en welke zijn minder van belang?—35
 - 4.3 Hoe zouden geïntegreerde teststrategieën een plaats kunnen krijgen in het veiligheidsonderzoek?—35

5	Wat zijn de belangrijkste barrières voordat alternatieve teststrategieën gebruikt zouden kunnen worden in het veiligheidsonderzoek?—37
5.1	Algemeen—37
5.2	Opinie van de OECD—40
5.3	Opinie van de EPAA—40
5.3.1	Obstakels voor Validatie—40
5.3.2	Mogelijke oplossingen voor het nemen van obstakels voor validatie—41
5.4	Opinie van een ECVAM workshop (Bottini et al., 2008)—43
5.4.1	De belangrijkste en meest voorkomende obstakels met betrekking tot validatie en regelgevende acceptatie—43
5.4.2	Thema's die worden gezien als mogelijkheden om het post-validatieproces te versnellen en tot acceptatie van alternatieve methoden te komen—43
5.5	Opinie van het Nationaal Toxicogenomics Centrum—44
	Conclusies—47
	Literatuurlijst—49
	Erkenningen—51
	Bijlage 1. De tijdsas van REACH—53
	Bijlage 2. Het PARARE-initiatief—55
	Bijlage 3. De modulaire benadering van validatie—57
	Afkortingenlijst—59

Samenvatting

De meeste proefdieren worden in Nederland gebruikt voor wetenschappelijk onderzoek (52,8%) en voor de werkzaamheids- en veiligheidsbeoordeling van geneesmiddelen en vaccins (35,7%). Het veiligheidsonderzoek aan chemische stoffen betreft 6,7% van de gebruikte proefdieren. Dit veiligheidsonderzoek wordt uitgevoerd binnen wettelijke kaders aan de hand van door de OECD (OESO) en ICH vastgestelde richtlijnen. Dit betreft over het algemeen het uitvoeren van dierproeven. Er is een aantal redenen om het gebruik van dierproeven terug te dringen: (1) ethische redenen, (2) verbeteren van de risicobeoordeling, (3) verbod van dierproeven op het gebied van cosmetica. Het REACH-initiatief, waarin de komende jaren veel stoffen zullen worden beoordeeld, geeft duidelijk aan dat het gebruik van proefdieren alleen geoorloofd is wanneer er geen alternatieven kunnen worden gebruikt. Er is dus dringend behoefte aan testen waarin de 3V's (vermindering, verfijning en vervanging van dierproeven) een dominante rol spelen, de zogenaamde alternatieve methoden.

Voor het invoeren van alternatieve methoden is er sprake van een 'bottom-up' benadering: alternatieve methoden worden, vaak binnen universiteiten of industriële onderzoekscentra, ontwikkeld, waarna de meest veelbelovende methoden worden gevalideerd, dat wil zeggen dat de betrouwbaarheid en relevantie worden nagegaan. Hierna kan de alternatieve methode worden aangeboden voor het accorderen door de OECD, de EU en/of ICH waarna deze vervolgens kunnen worden opgenomen in regelgevende kaders (implementatie). Aangezien alternatieve methoden, vooral degenen die gebruikmaken van diervrije testen, vaak slechts een gedeelte van het geheel van de toxische effecten weergeven worden geïntegreerde teststrategieën ingezet. Om deze teststrategieën goed te ontwerpen wordt gebruikgemaakt van databases met chemische (stofspectifieke) en biologische (toxiciteit) gegevens.

De keten van ontwikkeling via validatie en acceptatie naar implementatie is niet een gestroomlijnd geheel, maar bestaat uit afzonderlijke organisaties die niet op een structureel georganiseerde basis samenwerken. In het voorliggende briefrapport is deze keten in kaart gebracht, met als doel aangrijpingspunten te zoeken om de efficiëntie van deze keten en daarmee de acceptatie van 3V alternatieve methoden te bevorderen. De conclusie is dat de diverse partijen die zich met de verschillende onderdelen bezig houden, gedurende het hele proces met elkaar moeten samenwerken. Er is geen behoefte aan een gevalideerde alternatieve methode zonder toepassingsmogelijkheden in het regelgevende kader. Aan de andere kant kan men ook niet op afroep betrouwbare *in vitro* testen afleveren, vooral niet voor complexe eindpunten zoals carcinogeniciteit en reproductietoxiciteit.

Summary

In the Netherlands, most experimental animals are used for scientific research (52.8%) and the assessment of efficacy and safety of medicines and vaccines (35.7%). The safety evaluation of chemical substances accounts for 6.7% of the animals used. This safety testing is conducted within legislative frameworks according to guidelines set by the OECD and ICH. These tests generally concern animal experimentation. There are several reasons to reduce the use of animal experiments: (1) ethical reasons, (2) improvement of risk assessment, and (3) prohibition of animal testing for cosmetics. The REACH initiative, in which many substances will be assessed in the coming years, clearly indicates that the use of animals is permitted only if no alternatives can be used. Therefore, there is an urgent need for testing in which the 3Rs (reduction, refinement and replacement of animal testing) play a dominant role, the so-called alternative methods.

To introduce alternative methods, there is a bottom-up approach: alternative methods are developed, often in universities or industry, and the most promising ones are validated, i.e. the reliability and relevance are examined. After this validation phase, the alternative method is offered for approval by the OECD, EU, or ICH, after which they may be included in regulatory frameworks (implementation). Since alternative methods, especially those that use animal-free testing, often display only a portion of all toxic effects, integrated testing strategies are used. To design these testing strategies, databases with chemical (substance specific) and biological (toxicity) data are required.

The chain from development via validation to implementation is not a streamlined one, but consists of separate organizations, which are not linked on a structural basis. In the present report the chain is mapped, in order to find targets to promote the efficiency of the chain and thereby the acceptance of alternative methods to promote 3R. It can be concluded that the various parties involved in the various components of the chain have to work together throughout the process. On the one hand, there is no need for a validated alternative method without applicability in a regulatory framework. On the other hand, reliable *in vitro* tests cannot be delivered on demand, especially for complex endpoints such as carcinogenicity and reproductive toxicity.

1 Inleiding

Op het gebied van Alternatieven voor Dierproeven is de keten van ontwikkeling, validatie, acceptatie en implementatie van een alternatieve veiligheidstest een belangrijke kwestie. Voor een goede voortgang in deze keten is naast wetenschappelijke onderbouwing, adequate wet- en regelgeving noodzakelijk. De algemene opvatting is dat het traject validatie-acceptatie-implementatie stroef verloopt. Verbeterde wet- en regelgeving is een middel om deze keten sneller en efficiënter te laten verlopen.

Het doel van het project waarbinnen dit rapport is geschreven, is beleid te ontwikkelen om de keten te versterken. In het project komen aan de orde: het in kaart brengen van de actoren en hun rol, aansturing en mandaat, de beïnvloeding van actoren om het traject te versterken en beleidsontwikkeling om dit ook daadwerkelijk te doen.

Een complicerende factor is dat de verschillende domeinen, zoals stoffen, biociden, geneesmiddelen en vaccins, verschillende actoren kennen, waarbinnen de aandacht voor alternatieven verschillend is, maar ook de instrumenten voor het bevorderen van alternatieven in verschillende mate ontwikkeld zijn. Zo is het stoffendomein daarin duidelijk verder dan het domein van de vaccins.

Dit rapport geeft een inventarisatie van knelpunten bij het traject validatie-acceptatie-implementatie.

In de diverse domeinen: stoffen, voeding (additieven, aromastoffen en 'food contact materials'), geneesmiddelen en vaccins bestaat veel aandacht voor alternatieven voor dierproeven. Vanzelfsprekend zijn in alle domeinen ethische redenen een belangrijke impuls voor het terugdringen van dierproeven. Er zijn echter ook andere, eveneens zeer valide, redenen om het proefdiergebruik terug te dringen. In het stoffendomein zijn dominante trends (1) de 'paradigmawijziging' die moet leiden tot een betere risicobeoordeling, (2) het REACH-initiatief, dat noopt tot snelle beschikbaarheid van gevalideerde alternatieve testen en (3) het cosmetica directief, dat dierproeven ten behoeve van veiligheidsevaluatie van cosmetica verbiedt vanaf 2013. Dominante trends in het domein van geneesmiddelen zijn (1) de bewustwording dat proefdieren onvoldoende voorspellend zijn voor de mens, mede gezien het toenemende inzicht dat verschillen in leeftijd en genetische opmaak een belangrijke rol spelen in werkzaamheid en veiligheid van geneesmiddelen, (2) de aandacht voor 'high-throughput' methoden voor het screenen van 'lead compounds' en (3) proefdiervrije methoden die werkzaamheid en veiligheid van geneesmiddelen bij de mens zeer goed kunnen voorspellen. In het domein van vaccins worden de huidige proefdiertesten als te variabel, te belastend en soms zelfs inadequaat (slecht voorspellend) beschouwd. In het domein van voeding (additieven, aromastoffen en 'food contact materials') is er nog de minste ontwikkeling op het gebied van alternatieven.

Hieronder worden de diverse domeinen apart besproken. Niet alle domeinen waarin veiligheidsonderzoek wordt uitgevoerd, worden hier behandeld. Zo worden bijvoorbeeld biociden niet besproken. De in dit rapport besproken kwesties spelen echter in alle domeinen waar veiligheid voor mens en milieu worden vastgesteld binnen wettelijke kaders.

1.1 Stoffenbeleid en alternatieven voor dierproeven

Aan het veiligheidsbeleid op het gebied van stoffen en producten dragen vele nationale en internationale organisaties bij, zoals de Gezondheidsraad, ECHA, OECD, IPCS, Verenigde Naties, EFSA en 'Scientific Committees'. Niet alleen op het gebied van REACH en consumententoepassingen zoals cosmetica, maar ook op het gebied van voeding en verpakkingen, biociden en arbeidblootstelling is voortdurend behoefte aan kennis van toxische stoffen. Tevens wordt deze kennis benut voor de beoordeling van de veiligheid van geneesmiddelen (EMA-CHMP). Op het gebied van het vaststellen van de sterkte van toxiciteit zijn werkgroepen binnen de EU, de Verenigde Naties en de OECD actief. Dit geldt ook voor de 'classificatie en labeling' van stoffen. Naast de beschikbaarheid van fundamenteel wetenschappelijke kennis, wordt in het veiligheidsbeleid van stoffen meestal uitgegaan van toxicologische informatie die verkregen is door gebruik te maken van gestandaardiseerde en gevalideerde testen, waarbij testen met proefdieren meestal de gouden standaard zijn. Ook bij nieuwe agentia met onbekende risico's is de toxicologische kennisbasis van cruciale waarde, maar zijn standaard testmethoden soms niet direct voor handen. Dit zien wij momenteel met de problematiek rondom nanodeeltjes. De vraag naar veiligheidsonderzoek voor nanodeeltjes is groot en in het onderzoek dat is opgestart op dit gebied wordt voor een deel terug gegrepen op dierproeven, omdat inzichtelijke en betrouwbare alternatieve methoden niet voor handen zijn.

Het onderzoek wordt gestuurd door het gegeven dat een goede risicobeoordeling een voorwaarde is voor een verantwoord stoffenbeleid. Het is daarom belangrijk om veranderingen in internationale testrichtlijnen en 'guidance' documenten voor chemische verbindingen kritisch te blijven volgen en daar waar nodig een bijdrage te leveren aan opvulling van hiaten binnen het systeem van de stoffen risicobeoordeling en 'hazard identification'. Het onderzoek heeft tevens als doel bestaande testen door middel van alternatieven voor dierproeven te vervangen en daar waar mogelijk te verbeteren. De nadruk ligt daarbij op verfijning, vermindering of waar mogelijk vervanging van proefdiergebruik (het 3V-principe). Nationaal en internationaal wordt er gewerkt aan methoden die de 'hazard identification' en de risicoschatting kunnen verbeteren, en waarbij geen of weinig proefdieren meer ingezet hoeven te worden. Aan meer radicale vernieuwing van de 'hazard identification' en risicobeoordeling, zoals op basis van 'Integrated Testing Strategies' (ITS) en 'Assuring Safety without Animal Testing' (ASAT) kan plaatsvinden, wordt nog maar in beperkte mate gewerkt. Dit zal de komende jaren, voor de diverse wettelijke kaders waaronder cosmetica en REACH, geïntensiveerd moeten worden. Een groot aantal stoffen moet beoordeeld worden, en de klassieke methoden zijn daarvoor vaak ongeschikt. De REACH wetgeving en 'guidance' geeft hiertoe diverse mogelijkheden: registerende instanties van overeenkomstige stoffen worden geacht gezamenlijk dossiers in te dienen, voorts is herhaling van proefdiertesten voor eenzelfde stof niet toegestaan, het gebruik van 'non-testing' methoden (QSARs, 'read across' en 'category approaches') wordt gestimuleerd en voor de eindpunten die veel dierproeven vergen dienen eerst 'testing proposals' ingediend te worden die pas na goedkeuring door de lidstaten en ECHA mogen worden uitgevoerd. In Bijlage 1 is de tijdas met de verschillende tranches binnen REACH (2010-2013-2018) aangegeven, evenals de bij elke tranche behorende aan te leveren informatie. De tijdas geeft aan dat stoffen met de hoogste productievolumes (tonnages) en de grootste hoeveelheid aan te leveren informatie per 1 december 2010 geregistreerd moesten zijn.

1.2 CMRS stoffen en alternatieven voor dierproeven

Kennis over humane risico's van stoffen die carcinogeen, mutageen, reproductietoxisch of sensibiliserend (CMRS) zijn, wordt meestal verkregen op basis van dierproeven. In het streven naar de vermindering van het proefdiergebruik wordt vaak gezocht naar *in vitro* alternatieven. Recent is echter opnieuw duidelijk geworden dat *in vitro* alternatieven nog zeer veel beperkingen hebben als het gaat om de implementatie in de regelgeving (RIVM, Bessems et al., 2009). In een overzicht heeft Bessems aangegeven dat voor *screening en prioriteitsbepaling* verschillende *in vitro* methoden beschikbaar zijn. Dit wordt ook aangegeven in een recent overzicht dat gemaakt is door ECVAM. Echter, geschikte methoden voor screening en prioriteitsbepaling van meer complexe effecten zoals CMRS zijn nog maar zeer beperkt, of in het geheel niet beschikbaar. Methoden die al wel meer gebruikt worden en gebruikt zullen worden, zijn onder meer 'read across', 'category approaches' en 'waiving' op basis van blootstelling. Voor 'classificatie en labeling' is de situatie ernstiger, en is er alleen een aantal *in vitro* testen beschikbaar voor lokale toxiciteit (zoals huideffecten en oogirritatie) maar niet voor CMRS. Voor *kwantitatieve risicoschatting* is er zelfs nog geen enkele *in vitro* test beschikbaar. Dit betekent dat er nog een lange weg te gaan is voordat proefdiervrije alternatieven daadwerkelijk gebruikt zullen worden in het stoffenbeleid. In dit kader zal er dus vooral gebruikgemaakt worden van 'exposure based waiving', 'read across' en 'category approaches', evenals het voorkomen van dubbele testen door de industrie in de 'substance information exchange forums' (SIEFs). Dat geldt in het bijzonder voor CMRS stoffen, en in bepaalde mate ook voor stoffen die andere toxische effecten kunnen veroorzaken.

De recent gestarte grootschalige actie van de EU om in samenwerking met Colipa (het platform van samenwerkende cosmetica industrieën) door een impuls van 50 miljoen euro in het komende decennium een aanzet te geven tot het uitfasen van de 'repeated-dose' toxiciteitstest met knaagdieren illustreert dat nog veel tijd en geld geïnvesteerd moet worden om bepaalde diertesten te kunnen uitfasen, en dat nog veel kennis opgebouwd moet worden. Daarnaast is door experts op het gebied van CMRS, 'repeated-dose' toxiciteit en toxicokinetiek aangegeven dat het nog een decennium zal duren, voordat proefdiervrije alternatieven voor het testen van cosmetica beschikbaar zijn.

REACH biedt de mogelijkheid om stoffen te beoordelen via een 'category approach' of 'read across'. Deze benadering is gebaseerd op de aanname dat verbindingen met vergelijkbare chemische structuren, vergelijkbare fysische en biologische eigenschappen bezitten. Op basis van deze aanname wordt het mogelijk om stoffen waarvoor weinig of geen data beschikbaar zijn, op basis van beschikbare stofinformatie van structuuranalogen toch te kunnen beoordelen. Inmiddels wordt onderzocht in hoeverre deze 'category approach' in combinatie met -omics technieken bruikbaar is voor de bepaling van carcinogeniteit/mutageniteit, reproductietoxische effecten en sensibilisatie. Een uiteindelijke 'category approach' kan leiden tot het schrappen ('waiving') van verplichte experimenten (met of zonder proefdieren) en ook 'non-testing'-beoordeling kan leiden tot een enorme besparing op proefdieren, kosten en snelheid van beoordeling. Deze 'category approaches', 'non-testing systems' en 'integrated testing strategies' (combinatie van 'testing' en 'non-testing') zijn volop in ontwikkeling, en werden in het verleden ook al gebruikt, zoals door het 'technical committee on new and existing substances / classification and labeling' (TC NES/C&L), door de 'screening information data set (SIDS) initial assessment meeting' (SIAM) van de OECD en door REACH. Andere proefdiervrijbesparende initiatieven die nu al gebruikt worden zijn 'exposure based waiving' (van testen kan worden afgezien, omdat de blootstelling dusdanig laag

is dat een toxische dosering redelijkerwijs nooit gehaald wordt) en SIEFs (voorkomt dubbel testen van een stof).

In het recent verschenen strategiedocument 'Toxicity Testing in the 21st Century' van de National Research Council in de Verenigde Staten wordt uitstekend duidelijk gemaakt dat voor de verdere ontwikkeling van de humane risk assessment ook in de toekomst op beperkte schaal specifieke dierexperimentele kennis noodzakelijk zal zijn. Verfijning en vermindering van het proefdiergebruik zullen de komende decennia nog prominent op de onderzoeksagenda moeten staan als de risk assessment op basis van 3V-alternatieven verder geïmplementeerd zal worden. Momenteel is het verbinden van allerlei databases om te komen tot kennisintegratie die betrouwbaar voorspellend kan zijn, de belangrijkste ontwikkeling op het gebied van alternatieven in de risk assessment. Die databases zullen van belang zijn om 'Integrated Testing Strategies' (ITS) te ontwikkelen. Hierbij is de gedachte dat toxicologische testen getrapd ingezet worden, waarbij over de noodzaak tot uitvoering van complexe hogere orde testen besloten wordt op basis van de uitkomsten van eenvoudigere proefdierarme lagere orde testen. Deze zogenaamde 'tiered approach' wordt ook door de OECD verwoord in haar recent geformuleerde 'Conceptual Framework of Testing and Assessment' in het Guidance Document 43 over Reproductive Toxicity Testing and Assessment. 'Non-testing' beoordeling (beoordeling alleen op basis van 'voorspelde' effecten) hoort daar in principe bij, als het gaat om stoffen waaraan mensen niet of nauwelijks worden blootgesteld. Voor wetgevende kaders die zich niet baseren op risk assessment maar op 'classification and labeling' geldt een andere benadering.

Verfijnen, verminderen en vervangen van dierproeven zal vanaf nu samen moeten gaan met versoberen en versimpelen, omdat anders de beoordeling van een groot aantal stoffen nooit gerealiseerd kan worden. Toch mag de betrouwbaarheid van de testresultaten niet in het geding zijn. Dat hoeft ook niet. Het inzicht in de mechanismen van schadelijkheid van stoffen is de laatste tijd sterk toegenomen, vooral onder invloed van 'omics-technologieën' zoals toxicogenomics.

De humane risico's van chemische stoffen worden thans in Europa onder meer beoordeeld binnen de REACH-wetgeving, maar er zijn ook andere wettelijke kaders waarbinnen chemische stoffen worden beoordeeld, zoals pesticiden en biociden, maar ook voedseladditieven. Binnen deze andere kaders wordt vaak meer informatie over een specifieke stof gevraagd dan binnen REACH. In REACH wordt nadrukkelijk beoogd teststrategieën te vernieuwen, vooral met het oog op reductie van proefdiergebruik (3V-principe).

Er zijn schattingen die aangeven dat verreweg de meeste proefdieren (circa 65%) binnen REACH worden gebruikt voor het vaststellen van mogelijke schadelijke effecten op de fertiliteit en de prenatale ontwikkeling (reproductietoxiciteit). Dit hoge percentage dieren voor testen voor reproductietoxiciteit geldt eveneens voor andere wettelijke kaders. Hier ligt dan ook de hoogste prioriteit voor het implementeren van alternatieve testen. De Europese Commissie onderkent deze noodzaak en financiert verschillende projecten waarin ondermeer het RIVM participeert (OSIRIS, CHEMSCREEN, REPROTECT). Opgemerkt moet worden dat binnen REACH informatie over reproductietoxiciteit van bestaande stoffen vooral voor de 2010 tranche werd gevraagd (zie Bijlage 1). Er is dus haast met het implementeren van alternatieven. De recente acceptatie van de 'Extended One Generation Reproductive Toxicity Study' (EOGRTS) door de OECD Joint Meeting is daarin een belangrijke mijlpaal. De EORGTS geeft een besparing van 40% in het aantal

proefdieren ten opzichte van de twee-generatiestudie. Andere voordelen zijn dat de EOGRTS immunologische en neurologische parameters bepaalt; het immunologische en het neurologische systeem zijn zeer gevoelig voor toxiciteit in de pre- en postnatale fase. Verder heeft de EOGRTS een betere statistische 'power'. Implementatie door de Europese Commissie moet nog wel volgen, daar is dus ook haast bij.

De gevolgen van de implementatie van REACH voor hazard identificatie, risicoschattingen en 'classificatie en labeling', op het gebied van mutageniteit en carcinogeniteit, zijn beschreven in een RIVM rapport (601200008/2007) 'The effect of REACH implementation on genotoxicity and carcinogenicity testing' (Van Benthem, 2007). Risicoschatting van genotoxische carcinogenen geschiedt normaliter op basis van lineaire extrapolatie van de resultaten uit de tweejaars proefdiertest die gebruikmaakt van honderden proefdieren. De verwachting is dat deze gegevens onder REACH vaak niet voorhanden zullen zijn. Gebruikmaken van dosis-respons gegevens uit testen voor genotoxiciteit zou een oplossing kunnen bieden, hoewel ook de kwaliteit van de diverse testen voor genotoxiciteit vaak ter discussie staat.

Een apart, maar heel groot probleem dat met de invoering van REACH naar voren komt, is de herkenning van niet-genotoxische carcinogenen. Dit zijn stoffen die kanker veroorzaken, maar niet genotoxisch zijn. Onder REACH speelt de genetische toxicologie de belangrijkste rol bij het bepalen van het carcinogene risico van een verbinding. Omdat niet-genotoxische carcinogenen negatief zijn in (*in vitro*) testen voor genotoxiciteit, kunnen ze eenvoudig over het hoofd worden gezien. Dit vormt daardoor een aanmerkelijk risico voor de bevolking, zie onder andere het RIVM rapport (340700003/2008) 'Implications of not detecting non-genotoxic carcinogens in the absence of carcinogenicity tests under REACH guidelines' (Hernandez et al., 2009).

Op het gebied van sensibilisatie dient binnen REACH voor alle verbindingen (alle tonnages) informatie te worden aangeleverd. Dit betreft huidsensibilisatie en niet luchtwegsensibilisatie, omdat voor luchtwegsensibilisatie geen gevalideerde testen bestaan. De 'local lymph node assay' (LLNA) kan stoffen die luchtwegsensibilisatie induceren identificeren, maar het is onbekend of de potentie en/of de drempelwaarden van dit soort stoffen in dit model kunnen worden vastgesteld.

Er zijn voor huidsensibilisatie en in mindere mate voor respiratoire sensibilisatie QSAR (*in silico*) modellen in ontwikkeling, die, gebaseerd op bekende reactiemechanismen, informatie over de sensibiliserende activiteit kunnen verschaffen. Er zijn ook testen voorhanden die de reactiviteit van verbindingen in kaart brengen (*in chemico*), welke een basis kunnen vormen voor de inschatting van de sensibiliserende activiteit. Verder is er een aantal cellulaire *in vitro* testen in ontwikkeling, die allen onderdelen van het sensibiliserende proces beschrijven. Geen van deze *in vitro* modellen is geprevalideerd, laat staan gevalideerd. Er is nog weinig zicht op welke van deze testen het meest voorspellend zijn, en of zij voor een breed panel van sensibiliserende stoffen geschikt zullen zijn.

1.3 Voeding en alternatieven voor dierproeven

Met betrekking tot voeding is hoge blootstelling mogelijk aan additieven (ordegrootte van tientallen tot honderden mg/kg lichaamsgewicht/dag). Blootstelling aan aromastoffen belooft hoogstens enkele tientallen mg per persoon per dag, maar vaak minder dan 1 mg. De maximale blootstelling aan 'Food Contact Materials'(FCM) is lager dan de maximale blootstelling aan additieven of aromastoffen, namelijk tot circa 1 mg/kg lichaamsgewicht/dag.

De normstelling voor additieven (in mg/kg voedsel) is gebaseerd op de Aanvaardbare Dagelijkse Inname (ADI) of de Toelaatbare Dagelijkse Inname (TDI). Deze gezondheidkundige normen worden afgeleid uitsluitend op basis van uitgebreide toxiciteitstesten, vooral testen voor subchronische en chronische toxiciteit en reproductietoxiciteit/teratogeniteit. Gegevens over acute toxiciteit (letaliteit, irritatie/corrosiviteit) en sensibilisatie spelen vrijwel geen rol. Voor de eindpunten die relevant zijn voor de afleiding van een ADI of TDI zijn nog geen alternatieven voor dierproeven beschikbaar. De eisen aan de data voor aromastoffen en FCM zijn afhankelijk van de blootstelling, waarbij geldt dat hoe hoger de blootstelling is hoe uitgebreider getest moet worden, vergelijkbaar dus met REACH. Overigens geldt voor additieven dat als verwacht wordt dat ze onder 'classificatie en labeling' vallen, ze niet op de markt gebracht worden en dus niet getest worden. Verder spelen alternatieven in het kader van additieven geen rol.

Voor additieven is in principe altijd het volledige pakket toxiciteitstesten nodig, slechts incidenteel kan daarvan worden afgeweken. De huidige Europese leidraad inzake de evaluatie van additieven (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out98_en.pdf) wordt momenteel door de EFSA geactualiseerd (<http://www.efsa.europa.eu/en/answgs/documents/answggped.pdf>). In hoeverre daarbij introductie van alternatieve benaderingen, zoals 'threshold of toxicological concern' (TTC) en een aan de verwachte blootstelling gekoppelde 'Tiered testing' strategie een rol speelt is nog onbekend. Blootstelling aan additieven is beter in te schatten dan blootstelling aan andere chemische stoffen, omdat toepassing, en dus blootstelling, van chemische stoffen meer divers is.

Voor aromastoffen wordt gebruikgemaakt van een TTC-concept. Hierin worden 3 klassen van stoffen onderscheiden, met drempelwaarden 1.800 µg persoon/dag (klasse I), 540 µg persoon/dag (klasse II) en 90 µg persoon/dag (klasse III). Als de blootstelling onder de voor die klasse geldende drempelwaarde blijft is geen informatie nodig over toxiciteit, mits wordt verwacht dat metabolisme leidt tot inactieve metabolieten. Bij geringe overschrijding (minder dan 10 maal) is voor stoffen met gedeactiveerde of inactieve metabolieten alleen een 90-dagen studie vereist. Bij grotere overschrijding (meer dan 10 maal) wordt ook een teratogeniteitstudie gevraagd. Voor stoffen met actieve metabolieten is altijd minstens een 90-dagen studie vereist, ook als de verwachte blootstelling niet boven de drempelwaarde komt. Bij overschrijding van de drempelwaarde is dan een teratogeniteitstudie (overschrijding minder dan 10 maal) of een volledig pakket (overschrijding meer dan 10 maal) vereist. Daarnaast kan 'read across' worden toegepast, door (mede) op basis van gegevens over kinetiek, gegevens over stof X te gebruiken voor structuuranaloge stof Y. Ook bij beoordeling van genotoxiciteit wordt 'read across' gebruikt (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1623.pdf>). Voor deze groep wordt dus een 'tiered' systeem gehanteerd.

Voor 'Food Contact Materials' (FCM) wordt blootstelling geschat aan de hand van migratie naar de voeding. Bij geringe blootstelling (migratie minder dan 50 µg/kg voedsel) zijn alleen gegevens over genotoxiciteit vereist. Bij oplopende migratie (tot 5 mg/kg voedsel) zal tevens gevraagd worden naar een 90-dagen studie en, zeer beperkt, naar kinetiek. Bij hogere blootstellingen (tot de maximale migratie van 60 mg/kg voedsel) is een pakket aan toxiciteitstesten nodig, vergelijkbaar met die voor voedseladditieven. In de praktijk worden tamelijk veel stoffen toegelaten op basis van geringe migratie en afwezigheid van genotoxiciteit en zijn er geen aanvullende dierstudies vereist. Bovengenoemde testen voor FCM worden momenteel herbeoordeeld met betrekking tot mogelijke inclusie van het TTC-concept.

1.4 Geneesmiddelen en alternatieven voor dierproeven

1.4.1 Inleiding

De toelating van geneesmiddelen in Europa is sterk gereguleerd. Er zijn toelatingssystemen op alle fasen die een geneesmiddel doorloopt:

1. Nationale autoriteiten voor het toelaten van klinisch onderzoek. In Nederland zijn dit de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO) en de Medisch-ethische toetsingscommissies (METCs).
2. Nationale en Europese autoriteiten voor de markttoelating. In Nederland is dit het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG) en in Europa de 'European Medicines Agency' (EMA).
3. Nationale autoriteiten voor controle en batchrelease na markttoelating, gecoördineerd door de 'European Directorate for the Quality of Medicines' (EDQM). In Nederland wordt dit uitgevoerd door het Centrum voor Biologische geneesmiddelen en Medische Technologie (BMT) van het RIVM. Dit betreft vooral vaccins en andere bio(techno)logische producten.

Resultaten verkregen met proefdieren tijdens de ontwikkeling en bij de controle van het uiteindelijke geneesmiddel, spelen een belangrijke rol in dit proces. Werkingsmechanisme en doseringsterkte kunnen vaak alleen met proefdieren bestudeerd worden. Door diverse initiatieven gedurende de afgelopen decennia (onder andere gesteund door ECVAM, EDQM, EPAA en OECD) zijn toch veel proefdiertesten ten behoeve van geneesmiddelencontrole komen te vervallen, dan wel vervangen door minder belastende testen.

Van de 35,7% van alle proefdieren in Nederland die voor geneesmiddelen en vaccins worden gebruikt, is 14,4% ten behoeve van ontwikkeling en 21,4% ten behoeve van productie, controle en ijking. Als we de dieren die gebruikt worden voor de productie van geneesmiddelen en vaccins buiten beschouwing laten, worden dus ruim 3 maal zoveel dieren voor de controle van geneesmiddelen en vaccins als voor controle van stoffen gebruikt.

1.4.2 Regulering

Toelating van geneesmiddelen wordt op diverse bestuursniveaus gereguleerd. Naast nationale organisaties zoals in Nederland het CBG, bestaan ook internationale organisaties zoals de EMA, met de 'Committee on Human Pharmaceutical Products' (CHMP) als belangrijkste commissie, en de WHO, met onder andere de 'Expert Committee on Biological Standardization' (ECBS). De EMA/EU neemt ook deel in de 'International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use' (ICH), maar de ICH heeft zelf geen implementatiebevoegdheid. Implementatie hoort bij de regionale autoriteiten.

Te hanteren eisen en richtlijnen zijn onder andere nationale wetgeving, Europese directieven (richtlijnen met wettelijke status) zoals het EU-directief 2001/83, de EMA-CHMP richtlijnen, Europese Farmacopee monografie eisen en richtlijnen die wereldwijd worden toegepast (zoals WHO-eisen, ICH-richtlijnen). Hoewel gestreefd wordt naar harmonisatie tussen eisen en richtlijnen in ICH-verband (tussen bijvoorbeeld de FDA, Japan en Europa), kunnen de eisen gesteld aan een geneesmiddel per land variëren. De uit te voeren (dier)testen kunnen hierdoor per land variëren. In dit opzicht gaat de WHO heel nadrukkelijk uit van de zelfstandige beslissingsbevoegdheid van de nationale autoriteiten. Dit staat dus in scherpe tegenstelling met de OECD, waar 'Mutual Acceptance of Data' (MAD) bestaat. Deze regel betekent dat resultaten van een studie die onder GLP is uitgevoerd volgens een OECD testrichtlijn, geaccepteerd wordt door de regelgevende autoriteiten in alle OECD-lidstaten. Dit betekent dus een grote besparing aan proefdieren, omdat testen binnen deze lidstaten niet herhaald hoeven te worden.

1.4.3 *Praktijk*

Een belangrijk aspect voor de keuze van uit te voeren testen voor een geneesmiddel is de markt waar het product voor bedoeld is. Door een uitgebreide consolidatieslag in de farmaceutische sector worden geneesmiddelen vaak geproduceerd door mondiaal opererende farmaceutische bedrijven voor wereldwijd gebruik. Dit betekent dat een fabrikant vaak alle cumulatief gevraagde studies en testen uitvoert, zodat hij het product op al zijn markten kan afzetten. Om deze reden dient voor het laten vervallen van een test vaak wereldwijde consensus te bestaan. Dit was een belangrijke reden voor het starten van het ICH-proces.

Een positief voorbeeld is het testen voor reproductietoxiciteit. In Japan bestonden hiervoor afwijkende intervallen (bijvoorbeeld dag 7-18 in plaats van dag 6-15 in de Verenigde Staten en Europa), en dan moest de studie gewoon over. Door de ICH S5 richtlijn is dit geharmoniseerd over de drie gebieden (in feite mondiaal) en dat bespaart een groot aantal dieren. Een negatief voorbeeld hierin is de 'general safety test' voor vaccins; deze diertest (op 5 muizen en 2 cavia's) is al jaren niet meer vereist in Europa, maar wordt nog vaak uitgevoerd. Dat komt omdat veel Aziatische landen deze test nog eisen en daarvoor de ruimte krijgen van de WHO, zoals hierboven vermeld.

1.4.4 *Registreren en vrijgeven*

Voor geneesmiddelen valt het toezicht en de vereiste testen onder te verdelen in (1) ontwikkelen en registreren (marktautorisatie) van het geneesmiddel, en (2) vrijgeven van geproduceerde partijen voor gebruik (na marktautorisatie).

1.4.5 *Registreren*

Tijdens de ontwikkeling van een geneesmiddel dient de werkzaamheid en veiligheid aangetoond te worden. De eisen zijn in algemene zin opgesteld door EU-directief 2001/83. De EMA-CHMP heeft op basis hiervan nadere (gedetailleerde) eisen vastgelegd in richtlijnen. De fabrikant kan hiervan afwijken mits dit op wetenschappelijke wijze, voldoende wordt beargumenteerd. De benodigde veiligheidsinformatie, deels bepaald in proefdieren, dient te worden verstrekt aan de geneesmiddelenautoriteit door middel van een vastgestelde structuur, het 'Common Technical Dossier' (CTD) van de ICH.

De richtlijnen beschrijven min of meer de onderdelen van het CTD, en daarmee ligt de structuur van de ontwikkeling van een geneesmiddel in feite vast. Zo zijn er richtlijnen voor genotoxiciteit, 'repeated-dose' toxiciteit, reproductietoxiciteit en carcinogeniteit. Er zijn ook richtlijnen voor specifieke categorieën, zoals voor recombinant eiwitten ('biotechnology-derived proteins') en vaccins. Daarin wordt aangegeven dat bepaalde standaardbenaderingen voor deze categorieën niet altijd nodig zijn, of dat onderzoek met slechts één diersoort voldoende is.

Het is voor bepaalde producten soms lastig om het noodzakelijke pakket aan eisen vast te stellen, maar uiteindelijk laten de autoriteiten een grote flexibiliteit toe in de benadering betreffende veiligheid. Er zijn ook veel mogelijkheden om hierover tijdens het ontwikkelingsproces advies te krijgen van individuele registratieautoriteiten, dan wel van de EMA.

1.4.6 *Implementatie van nieuwe teststrategieën in het geneesmiddelenveld*

Het vervangen van een testprocedure in dieren, zoals verwoord in bovengenoemde richtlijnen, door een *in vitro* benadering is niet zo gemakkelijk. Het is eenvoudiger om een test toe te voegen, dan om er een te schrappen.

Er is in Europees verband een 'Reflection Paper' geschreven over de vervanging van standaard *in vivo* testen door *in vitro* procedures. In de praktijk wordt echter nauwelijks een beroep gedaan op dit document. Dit was reden voor de 'Safety Working Party' van de EMA-CHMP om het initiatief te nemen een nieuw document op te stellen dat een beter kader schept hoe in de praktijk om te gaan met de 3V's.

Voor een verandering in de zogenaamde 'Testing Strategy' lijkt vooral initiatief van de ICH nodig. In 2006 is een prioriteringslijst afgesproken, waarin genotoxiciteit de hoogste prioriteit kreeg omdat er veel nieuwe kennis was op dit terrein. Het feit dat bij *in vitro* testen veel vals-positieven werden waargenomen, was aanleiding om de strategie als geheel te herzien. Daarnaast werd aan de hand van de richtlijnen voor studies die noodzakelijk zijn voor het starten van klinisch onderzoek in de verschillende fasen van een geneesmiddel (ICH-M3), het hele pakket aan studies nog eens doorgenomen. Daarmee werd voor elke fase nagegaan welke studies echt noodzakelijk zijn. Een voorbeeld hiervan is dat voor het starten van een Fase II studie met inclusie van vrouwen in de vruchtbare leeftijd, volstaan kan worden met het verschaffen van de 'non-GLP dose-range finding' gegevens voor reproductietoxiciteit. Voor dit beperkte doel geven deze gegevens al voldoende zekerheid. Een volledige studie is pas nodig in het stadium van marktautorisatie, als een groter publiek wordt blootgesteld zonder directe controle.

Een ander voorbeeld is de overweging of de gebruikelijke twee species voor embryofoetale toxiciteitstesten wel nodig zijn, dan wel dat één species vervangen zou kunnen worden door een *in vitro* benadering. Dit is door de ICH aan de orde gesteld in 2009. Naar aanleiding van het afronden van het EU REPROTECT project, is in juni 2010 de stand van zaken met betrekking tot *in vitro* testen ('whole embryo culture', 'embryonic stem cell test') geëvalueerd. Er kon niet tot besluitvorming gekomen worden, ook omdat het validatieprogramma niet gericht was op de mogelijkheid om op deze wijze (gedeeltelijke vervanging) geïmplementeerd te worden.

Genoemde voorbeelden geven aan dat voor implementatie van nieuwe teststrategieën contact met de werkgroepen met deskundigen binnen de registratieautoriteiten, van groot belang is. Dit geldt al in de fase van testontwikkeling en validatie, omdat dan al draagvlak kan worden ontwikkeld voor acceptatie. Wanneer vervolgens de medewerking wordt verkregen van deze deskundigen op het niveau van de ICH ligt implementatie binnen bereik. Een voorbeeld hiervan is de herziening van studies voor reproductietoxiciteit bij apen. Deze worden nu uitsluitend gebruikt voor monoklonale antistoffen die ook bij vrouwen in de vruchtbare leeftijd (bij indicaties anders dan kanker) zullen worden toegepast. Het is echter gebleken dat over het algemeen een embryofoetale toxiciteitstudie (behandeling van dag 20 tot dag 50, en keizersnede op dag 100 van de dracht [totale dracht 155 dagen]) niet leidt tot echte blootstelling van het embryo omdat de placenta deze geneesmiddelen niet doorlaat. Dat begint pas rond dag 70 (voor de mens het tweede trimester van de zwangerschap). Daarom wordt nu op het niveau van de ICH nagedacht om de gebruikelijke twee studies (de 'embryo-fetal developmental' [EFD] studie en de 'pre- and postnatal developmental' [PPND] studie) te combineren tot één studie, waarbij mogelijk slechts één dosisgroep noodzakelijk is. Dat zou al een behoorlijke vermindering van het aantal apen opleveren.

1.4.7 Vrijgifte

Voor de controle van geregistreerde geneesmiddelen worden in de regel geen proefdieren gebruikt. Wanneer aangetoond kan worden dat een product consistent geproduceerd kan worden en productiefwijkingen met

laboratoriumtesten aangetoond kunnen worden, zullen proefdier testen niet worden toegepast. Uitzondering hierop zijn enkele 'biologicals'. Producten die gemaakt worden met een biologisch productiesysteem (bijvoorbeeld vaccins op basis van bacteriekweken) worden nu nog als te variabel beschouwd om volledig *in vitro* te kunnen controleren. Voor goed te karakteriseren vaccins (zoals vaccins op basis van recombinant technieken) worden in de regel geen proefdierexperimenten meer uitgevoerd. Ter beperking van *in vivo* testen worden alternatieve testen ontwikkeld. Vaak zijn de ontwikkelde alternatieve testen minder belastend dan de originele test of worden de producten efficiënter getest (bijvoorbeeld een combinatie van testen zonder extra ongerief). Veelbelovende modellen worden in Europa internationaal gevalideerd door steun van vooral EDQM en ECVAM. Nederland heeft de afgelopen decennia deze studies ondersteund via het RIVM en het NVI. Vervolgens kunnen de methoden worden opgenomen in de Europese Farmacopee, op gezag van de Pharmacopee-werkgroepen. Ontwikkelde alternatieve methoden kunnen dan eenvoudiger worden overgenomen door fabrikanten. Deze methoden dienen echter wel voor ieder specifiek product te worden gevalideerd. Vervolgens dient een wijziging van het registratiedossier aangevraagd te worden in alle landen waar het product geregistreerd is. Dit betekent in de praktijk een erg langdurig maar ook erg kostbaar proces voor een fabrikant (vele malen 'registration fees', vele verschillende vragen van de diverse registratieautoriteiten, onzekerheid of alle landen de variatie wel zullen accepteren). Dit knelpunt geldt voor humane geneesmiddelen, maar nog meer voor veterinaire geneesmiddelen door de lage marges op deze producten. Acceptatie van onderlinge beoordelingsconclusies tussen landen ontbreekt regelmatig in dit proces.

1.5 Vaccins en alternatieven voor dierproeven

Een speciale groep geneesmiddelen wordt gevormd door vaccins. Deze geneesmiddelen worden populatiebreed vrijwillig toegepast in kwetsbare, vaak jonge gezonde individuen. Veiligheidsrisico's worden voor vaccins tot een absoluut minimum beperkt en om deze reden worden bestaande (bewezen) testsystemen niet eenvoudig gewijzigd.

Volledige vervanging van proefdier testen is vaak lastig, aangezien door toediening van een geneesmiddel aan een proefdier diverse parameters gelijktijdig kunnen worden bepaald/geverifieerd. Voor volledige vervanging van een diertest zal het alternatief in principe de diverse parameters ook moeten kunnen bepalen. Dit maakt de beoordeling van alternatieve methoden complex en de uitkomst van een beoordeling door registratieautoriteiten onzeker. Momenteel wordt gediscussieerd over een alternatieve benadering voor producten waar diertesten op het eindproduct zijn voorgeschreven. In plaats van testen te vervangen, is het doel meer vertrouwen te krijgen in de consistentie van het productieproces, de zogenaamde 'consistency approach'. Door strikte 'good manufacturing process' (GMP) toepassing, verbeterde productiesystemen, en beter gedefinieerde en gecontroleerde tussenproducten, kunnen klassieke biologische producten ook als 'well-defined' beschouwd gaan worden. Proefdier testen voor het vrijgeven van partijen kunnen dan vervallen.

1.6 Drempels in het traject tussen ontwikkeling en implementatie van alternatieven voor dierproeven

Zoals uit de programmeringstudie en de trendanalyses van het NKCA en ZonMw blijken, zijn er veel factoren die verbeterd kunnen worden in het traject van wetenschappelijke initiatie van een alternatieve testmethode tot implementatie in regelgeving, met als doel het gebruik van proefdieren op basis van het 3V-principe te verminderen. Proefdieren worden in verschillende kennisvelden

gebruikt; in de onderhavige rapportage zal vooral worden ingegaan op het gebruik van proefdieren ten behoeve van het veiligheidsonderzoek van chemische stoffen. Slechts in beperkte mate zal ook ingegaan worden op het veiligheidsonderzoek naar additieven, aromastoffen, 'food contact materials', geneesmiddelen en vaccins. De keuze voor het chemische stoffendomein is ingegeven door de grote politieke en maatschappelijke druk die er op dit veld staat om gevalideerde alternatieve methoden te gebruiken in het kader van REACH, ondanks het feit dat er in het stoffendomein slechts een beperkt deel van het totale aantal proefdieren wordt gebruikt en dat in de genoemde andere wettelijke kaders evenzeer dierproeven worden gebruikt om de veiligheid voor mens en milieu vast te stellen. Met de inwerkingtreding van REACH is vastgelegd dat de veiligheid van vele tienduizenden stoffen beoordeeld moeten worden. Omdat er van zeer veel van deze stoffen vrijwel geen toxicologische gegevens zijn, wordt door sommigen het perspectief geschetst van talloze testen met miljoenen proefdieren. Gevalideerde implementeerbare alternatieve methoden kunnen dan uitkomst bieden. In de onderhavige rapportage wordt ingegaan op de mogelijkheden en beperkingen die hierbij aan de orde zijn, waarbij opgemerkt moet worden dat er ook tijdsdruk staat op deze methoden omdat de eerste datum van registratie al achter ons ligt (zie Bijlage 1).

In hoofdstuk 2 wordt eerst een overzicht gegeven van testen die door internationale organisaties zijn gevalideerd en het soort toxicologische eindpunten dat daarmee kan worden vastgelegd. Omdat het aantal testen dat tot op heden gevalideerd is en gebruikt wordt heel beperkt is, wordt ook ingegaan op testen die momenteel in de fase zitten van validatie.

In hoofdstuk 3 wordt ingegaan op het stoffen veiligheidsbeleid, waarbij nagegaan wordt of er ook nog testen geaccepteerd worden waarin de 3V's niet centraal staan.

In hoofdstuk 4 wordt nagegaan welke databases beschikbaar zijn (of komen) waarin informatie over alternatieven voor dierproeven beschikbaar is. Daarnaast wordt nagegaan welke databases ontwikkeld worden die bij kunnen dragen aan vernieuwing van de risicobeoordeling ('integrated testing' en geïntegreerde beoordeling) op basis van mechanistisch informatie, en niet op basis van het 'één op één principe'.

In hoofdstuk 5 ten slotte, wordt verder ingegaan op de barrières die er kunnen zijn voordat alternatieve methoden en teststrategieën gebruikt kunnen worden in het veiligheidsonderzoek.

2 Testontwikkeling en validatie van Alternatieven voor Dierproeven

2.1 Welke testen zijn door ECVAM, ICCVAM en JaCVAM gevalideerd en welke soorten effecten kunnen hiermee in beeld worden gebracht?

Voor een goed begrip dient hier aangegeven te worden dat validatie en implementatie twee gescheiden trajecten zijn. Het is beslist niet zo dat gevalideerde testen ook meteen worden opgenomen in regelgeving voor veiligheidsevaluatie van stoffen.

Verder moet hier ook aangegeven worden dat ECVAM (en ICCVAM, JaCVAM) niet bij de opstelling/herziening van alle door de OECD geaccordeerde methoden betrokken zijn. Zo is de EOGRTS, die veel proefdieren bespaart, ontwikkeld door lidstaten, waaronder Nederland, Duitsland, de Verenigde Staten en Canada in samenwerking met de OECD.

Voor een overzicht van gevalideerde en door de OECD geïmplementeerde alternatieve testen wordt verwezen naar Tabel 1 (bron: OECD-website). Samenvattend kan gesteld worden dat er voor wat betreft de toxicologie, gevalideerde en door de OECD geïmplementeerde alternatieven bestaan op het gebied van acute toxiciteit, huidcorrosie en -irritatie, dermale absorptie, mutageniteit/genotoxiciteit en fototoxiciteit. Het RIVM (Bessems, 2009) heeft eerder aangegeven dat deze testen vooral geschikt zijn voor screening, maar niet voor 'classificatie en labeling'.

Legenda Tabel 1:

[]: OECD 'Technical Guideline' (TG) nummer

(a) maakt gebruik van slachtafval; alleen bruikbaar om corrosieve en sterk irriterende stoffen te identificeren, niet geschikt voor zwak of matig irriterende stoffen.

(b) *in vitro*: alleen bruikbaar voor niet-irriterende en sterk irriterende stoffen. Nog niet geaccordeerd.

(c) geen volledige vervanging; wordt gebruikt in een 'tiered testing strategy' voor pesticiden en biociden

(d) dit is slechts een gedeeltelijke vervanging; deze testen kennen veel vals-positieven: bij een positieve uitslag is een *in vivo* vervolgtest noodzakelijk.

Tabel 1: overzicht van gevalideerde en door de OECD geïmplementeerde alternatieve testen

Bestaande alternatieven naar eindpunt	Verfijning	Vermindering	Vervanging
Acute oral toxicity vervangt [401] acute oral toxicity			
Fixed dose procedure [420]	X	X	
Acute toxic class method [423]	X	X	
Up-and-down procedure [425]	X	X	
Acute inhalation toxicity [403] is herzien		X	
Acute toxic class method [436]	X	X	
Skin corrosivity vervangt [404] acute dermal irritation / corrosion			
Rat skin TER test [430]			X
Reconstructed human epidermal (RHE) equivalents: EpiSkin™/EpiDerm™/SkinEthic™/ESTd-1000 [431]			X
Skin irritation vervangt [404] acute dermal irritation / corrosion			
EpiSkin™/Modified Epiderm™ SITE/SkinEthic™			X
RHE (draft test guideline)			X
Eye irritation vervangt [405] acute eye irritation / corrosion			
BCOP [437] / ICE [438]		X (a)	
Cytosensor microphysiometer/ Fluorescein leakage test		X (b)	
Skin sensitization vervangt [406] skin sensitization			
LLNA (incl. rLLNA) [429]	X	X	
Dermal absorption vervangt [427] <i>in vivo</i> dermal absorption			
<i>In vitro</i> dermal absorption [428] (c)			X
Mutagenicity/genotoxicity			
Bacterial Reverse Mutation Test [471]			X (d)
<i>In Vitro</i> Mammalian Chromosome Aberration [473]			X (d)
<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Test [476]			X (d)
<i>In Vitro</i> Micronucleus Test [487]			X (d)
Reproductive Toxicity extended one generation reproduction toxicity (EOGRT) test vervangt voor een deel [416] two-generation reproduction toxicity		X	
Whole Embryo Culture test / MicroMass test/Embryotoxic Stem Cell test		X	
Photo-induced toxicity			
3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test [432]			X

2.2 Welke gevalideerde vervangende testen worden gebruikt in het veiligheidsonderzoek?

De beschikbaarheid van volledig vervangende *in vitro* methoden is beperkt.

1. Voor screening/prioritering zijn er diverse *in vitro* testen beschikbaar voor lokale en systemische eindpunten.
2. Voor 'classificatie en labeling' zijn *in vitro* testen alleen beschikbaar voor lokale eindpunten.
3. Voor kwantitatieve risicobeoordeling zijn überhaupt geen (!) *in vitro* alternatieven beschikbaar.

2.3 Welke gevalideerde vervangende testen worden niet gebruikt in het veiligheidsonderzoek en waarom niet?

De huidige *in vitro* testen zijn niet geschikt als volledige vervanging van dierproeven voor systemische eindpunten ('classificatie en labeling' en kwantitatieve risicobeoordeling) om de volgende redenen:

1. De huidige *in vitro* testen zijn te simpel van aard. Ze reflecteren onvoldoende de complexiteit van de meeste systemische eindpunten. De thans beschikbare geïntegreerde benaderingen van batterijen van *in vitro* tests kunnen dat nog evenmin.
2. De huidige stand van zaken met betrekking tot kwantitatieve *in vitro* / *in vivo* extrapolatie is onvoldoende voor één op één vervanging voor risicobeoordeling van chemische stoffen.

Zowel voor voorspelbaarheid ('predictability') als toepassingsgebied ('applicability domain') weten we over het algemeen nog veel te weinig van alternatieven om te kunnen denken aan implementatie.

2.4 Welke testen zijn momenteel in een fase van validatie?

2.4.1 Alternatieve testen in het validatieproces bij de OECD

Om te weten wat er op dit moment speelt bij de OECD op het gebied van alternatieven, bijgaand een overzicht van de 'Draft Test Guidelines'. De commentaar rondes voor deze 'Draft Test Guidelines' bestreken september 2009 – februari 2010. Indien van toepassing is aangegeven of het om vermindering, verfijning of vervanging gaat:

- H295R Steroidogenesis Assay. Test voor 'Endocrine disrupters': humane cellijn.
- Aanpassing TG 429 (local lymph node assay; LLNA)
 - Invoering 'reduced LLNA' (rLLNA) om het aantal dieren terug te brengen. **vermindering** Inmiddels geaccepteerd.
 - Een tweede aanpassing in TG 429 is het vervangen van de voor het uitvoeren van de LLNA (en rLLNA) noodzakelijke radioactiviteit door niet-radioactieve methoden. Dit zou kunnen leiden tot **vermindering en verfijning**, omdat door deze aanpassingen radioactiviteit geen obstakel meer is voor het uitvoeren van de (r) LLNA en daarmee de keuze voor de GPMT (die meer dieren en meer ongerief kost) minder aantrekkelijk maakt. Inmiddels geaccepteerd in TG 442A en TG 442B.
- Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method. Test voor irritatie: humane cellen. **Vervanging van TG 404 (acute dermal irritation / corrosion)**

- Aanpassing TG 417 (toxicokinetiek). Leidt tot een betere test, dus op een indirecte manier tot **vermindering**. Bij een betere test kan verwacht worden dat de resultaten beter zijn, dus dat de test met minder dieren uitgevoerd hoeft te worden, of minder vaak herhaald hoeft te worden.
- Aanpassing TG 487 (*In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test). Verbetering van een bestaande *in vitro* test.
- Extended One-Generation Reproduction Toxicity Study. **Vermindering van TG 416 (two-generation reproduction toxicity study)**. Recent geaccepteerd.
- Histopathology for inhalation toxicity studies, supporting TG 412 (28-Day) and TG 413 (90-Day). Leidt tot een betere test, dus op een indirecte manier tot **vermindering**.
- Using Cytotoxicity Tests to estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. **Vermindering ten opzichte van TG 420 (fixed dose procedure), TG 423 (acute toxic class method) en TG 425 (up-and-down procedure)**

Samenvattend kan gezegd worden dat de OECD zich richt op alle 3 V's. Bij sommige 'Draft Test Guidelines' is sprake van verbetering van bestaande richtlijnen voor *in vivo* studies, die op een indirecte manier leiden tot vermindering.

2.4.2 *Alternatieve testen in het validatieproces*

Tabel 2 geeft aan wat er momenteel wereldwijd gebeurt op het gebied van alternatieven (bron: website van NICEATM/ICCVAM). Het gaat hier niet zomaar om één op één vervanging van verplichte testen, maar om verdere verbeteringen van al ingezette alternatieven, of om vervanging naast vermindering. Dit overzicht is vergelijkbaar met het overzicht op de ECVAM-website. Voor een aantal onderwerpen is het proces verder dan hier is aangegeven.

Tabel 2: wereldwijde gebeurtenissen op het gebied van alternatieven

Toxicity Endpoint	Test Method	Regulatory Application and ICCVAM Recommendations
<i>In vitro</i> Metabolism and Toxicokinetics	Biotransformation enzyme induction assays	NICEATM and ICCVAM participants are providing input and guidance to an ECVAM Validation Study of a human hepatic biotransformation enzyme induction assay using HepaRG cells and cryopreserved human hepatocytes.
Endocrine Disruptors	<i>In vitro</i> estrogen receptor (ER) transcriptional activation (TA)	NICEATM-ICCVAM are sponsoring an ongoing international validation study of an <i>in vitro</i> ER TA assay, and is working with the test method developer to develop and implement validation study protocols for a second <i>in vitro</i> ER TA assay.
Eye Corrosion/Irritation	<i>In vitro</i> test methods for assessment of the eye irritation potential of antimicrobial cleaning products	An approach using the bovine corneal opacity and permeability, the EpiOcular and the Cytosensor Microphysiometer test methods for evaluating the eye irritation potential of certain antimicrobial cleaning products is currently under review.
	<i>In vitro</i> tissue-based test methods for detecting mild to moderate irritants and nonirritants	The four tissue-based <i>in vitro</i> methods evaluated by ICCVAM for detection of ocular corrosives are currently being evaluated by ICCVAM for their utility for identification of mild to moderate irritants and substances not labeled as ocular irritants.
	<i>In vitro</i> cell function-based test methods for detecting mild to moderate irritants and nonirritants	ECVAM evaluations of four cell function-based <i>in vitro</i> methods (fluorescein leakage, neutral red release, cytosensor microphysiometer and red blood cell haemolysis test methods) for identification of mild to moderate irritants and substances not labeled as ocular irritants are currently being reviewed by ICCVAM for U.S. regulatory applicability.
	Recombinant human tissue models	NICEATM and ICCVAM representatives are serving on the Validation Management Group for a prospective validation of reconstructed human tissue models (EpiOcular and SkinEthic HCE) for identification of mild to moderate irritants and substances not labeled as ocular irritants.
Genetic Toxicity	<i>In vitro</i> mammalian cell micronucleus test	NICEATM and the ICCVAM Genetic Toxicity Working Group (GTWG) are involved in development of a draft OECD Test Guideline and have provided comments on a study to determine the most appropriate measure of cytotoxicity for inclusion in the Test Guideline.
	<i>In vivo</i> rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens	NICEATM and the GTWG are involved in development of the validation study plan, the proposed protocol, and proposed list of reference substances, and have representatives on the Validation Study Management Team.
	<i>In vitro</i> TK6 alkaline comet assay	NICEATM and the GTWG will be involved in development of the validation study plan, the proposed protocol, and proposed list of reference substances, and have representatives on the Validation Study Management Team.
	Cell transformation	NICEATM and the GTWG provided comments to

	assay (a)	JaCVAM on their validation study plan and protocol for their validation study, as well as providing liaison members to the Validation Study Management Team; also provided nominations of independent experts to serve on an ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) 'peer review' panel.
Skin Irritation	EpiDerm™ EPISKIN™ SkinEthic Assay	In 2008, OECD Test Guidelines were proposed based on three <i>in vitro</i> tests. An expert consultation hosted by U.S. took place in June 2009.
Skin Sensitization	Murine Local Lymph Node Assay (LLNA) -Reduced LLNA (rLLNA) -Use for potency determination -Applicability domain -Performance standards LLNA non-radiolabeled methods	In 2009, ICCVAM recommended the rLLNA to regulatory agencies and finalized performance standards for the LLNA. Recommendations included an updated protocol that uses fewer animals. ICCVAM has determined that the LLNA may be useful in determining the relative potency of sensitizers as part of a weight-of-evidence approach. ICCVAM recommendations for the LLNA applicability domain and three non-radiolabeled LLNA methods are currently being finalized.
	<i>In vitro</i> approaches - <i>In vitro</i> cell-based methods -Peptide reactivity Assay	The human cell line activation test (h-CLAT), the myeloid U937 skin sensitization test (MUSST), and the dipeptide reactivity assay are under consideration for further validation studies. ICCVAM is participating in the Validation Management Group with ECVAM and JaCVAM.

(a) Feitelijk een *in vitro* test voor carcinogeniteit. Voor geneesmiddelen afgewezen vanwege groot aantal vals-positieven en niet-interpreteerbare resultaten.

3 Acceptatie van (gevalideerde) testen in het veiligheidsonderzoek

3.1 Worden er nog steeds testen geaccepteerd waarin het 3V-principe niet wordt gehanteerd?

3.1.1 OECD

In elke revisie van de 'Technical Guidelines' komt het onderdeel 'Animal Welfare Considerations' aan bod. Er worden geen revisies geaccepteerd waarin dit aspect niet afdoende aan bod komt (zie onder). Hier wordt met acceptatie bedoeld een OECD protocol. In alle genoemde testen wordt het 3V-principe gehanteerd. OECD Guidance Document (GD) 34 'Guidance Document on the Validation and International acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment' is verplichte literatuur voor iedereen die zich bezig houdt met validatie en implementatie. Hierin worden onder meer de principes en criteria voor het accepteren van een nieuwe of up-to-date gebrachte testmethode door wetgevende autoriteiten weergegeven. In dit proces staat het belang van transparantie centraal. Belangrijke aspecten die in GD34 beschreven staan zijn onder meer:

a. De voorgelegde testmethode en de ondersteunende validatiegegevens moeten een transparante en objectieve 'peer review' hebben ondergaan.

De 'peer review' moet worden uitgevoerd door experts, die niet daadwerkelijk bij het ontwikkelen of valideren van de test betrokken zijn geweest, kennis hebben van de testmethode en evaluatie van de resultaten en niet materieel of financieel afhankelijk zijn van het resultaat van de review. Selectie van 'peer reviewers' moet gedaan worden op grond van wetenschappelijke kwalificaties, expertise en ervaring en onafhankelijk zijn van de werkgever of organisatie.

b. Resultaten van de testmethode moeten op een adequate manier het eindpunt meten of voorspellen. Voor testmethoden die vallen onder 'vervanging' moeten de resultaten een verband aangeven tussen de voorgestelde test en een bestaande test en/of de voorgestelde test en effecten in de 'target species' of 'model species'.

c. De testmethoden dienen resultaten op te leveren die nuttig zijn voor hazard/risk assessment.

Nieuwe testmethoden kunnen een bekende 'data gap' vullen. De testmethode kan op zichzelf nuttig zijn of deel uitmaken van een 'test batterij' of 'tiered testing' benadering. Voor vervangende testmethoden moeten de gegenereerde resultaten minstens zo nuttig en liever nuttiger zijn dan de bestaande testmethoden.

d. De voorgelegde testmethode en de ondersteunende validatiegegevens moeten een spectrum van stoffen beslaan die representatief zijn voor degenen die het wetgevende programma beheren of de instantie waar de testmethode wordt voorgelegd. De toepassingen en beperkingen van de testmethode moeten helder beschreven zijn.

e. De testmethode moet voldoende robuust zijn (relatief ongevoelig voor kleine veranderingen in het protocol) en overdraagbaar naar voldoende geoutilleerde laboratoria met voldoende getraind personeel.

De testmethode moet bij voorkeur gestandaardiseerd kunnen worden. Als zeer gespecialiseerde apparatuur, materialen of expertise nodig is, moeten middelen vrijgemaakt worden om de overdraagbaarheid te vergemakkelijken.

f. De testmethode moet tijd- en kosteneffectief zijn en met grote waarschijnlijkheid gebruikt kunnen worden in een regelgevende context.

g. Er dient (wetenschappelijke, ethische, economische) rechtvaardiging te worden gegeven voor de nieuwe of up-to-date gebrachte testmethode in het licht van al bestaande methoden.

Indien van toepassing dient dierenwelzijn, inclusief 3V, besproken worden.

3.1.2

EPAA

De 'European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing' (EPAA) is een samenwerkingsverband tussen de Europese Commissie en grote bedrijven uit zeven industriële sectoren. De partners streven naar bundeling van kennis, onderzoek en middelen om de ontwikkeling, validatie en acceptatie van alternatieve benaderingen te bevorderen. Door de EPAA zijn principes en criteria voor het accepteren van nieuwe of up-to-date gebrachte testmethodes door wetgevende autoriteiten beschreven. Deze principes en criteria dienen als hulpmiddel en zijn op geen enkele wijze bindend. Ze richten zich vooral op het proces en minder op testspecifieke criteria, zoals hoe goed het biologische systeem is omschreven, het toepassingsgebied van de test en wat de test vermindert, verfijnt of vervangt.

Tijdens een EPAA workshop werden criteria benoemd die belangrijk zijn voor prioritering van validatiestudies (onderstaand). Aan de hand van deze lijst kunnen partijen de prioriteit inschatten om een bepaalde alternatieve test te valideren. Er zijn echter geen wegingsfactoren gegeven, weging is zelfs niet genoemd. Opnieuw moet opgemerkt worden dat deze criteria op geen enkele wijze bindend zijn.

Ook binnen de Programmeringstudie zijn prioriteringscriteria aangelegd, waarbij wel is getracht weging aan deze criteria te geven.

Een recente ontwikkeling is het PARERE-initiatief van de Europese Commissie. Hierin worden validatiestudies geprioriteerd op basis van relevantie ten aanzien van regelgeving (zie Bijlage 2).

EPAA criteria voor prioritering van validatiestudies:

a. Ethisch

- Het aantal dieren gebruikt in de diertest en de alternatieve test, in de overall context van het daadwerkelijke diergebruik.
- De vermindering van het ongerief of het voordeel ten aanzien van 3V.
- De toegenomen veiligheid.

b. Regelgeving

- Betreft de test behoeftes vanuit regelgeving?
 - Betreft de methode een specifiek testdoel vanuit de regelgeving?
 - Is de test toepasbaar in strikte zin? hazard/risk.
 - Zijn er duidelijke, overeengekomen regels/criteria over hoe de test gebruikt wordt bij beslissingen: regelgeving of veiligheid?
 - Gaat het om een volledige vervanging voor het vaststellen van veiligheid of wordt deze in een 'tiered' strategie gebruikt?
- Zijn er tijdslijnen voor wat betreft regelgeving?

c. Industriële prikkel

- Is het erg waarschijnlijk dat de test wordt geaccepteerd door wetgevers (aspecten van aansprakelijkheid)? In dit licht moet ook de acceptatie van alternatieve testen door de industrie worden gezien, indien deze leidt tot het afnemen van de markt van een product of labeling van een product.
- De toepasbaarheid van de test in verschillende sectoren.
- De toepasbaarheid van de test voor alle stoffen/voor een beperkt arsenaal stoffen.
- De frequentie van het gebruik van de methode.
- De overdraagbaarheid van de methode.
- De noodzaak voor speciale apparatuur, getraind personeel, middelen (totale kosten).
- De vermindering in tijd.
- Is de test bruikbaar voor screening ('High-Throughput Screening')?
- Zijn er patenten bij betrokken, is de test commercieel beschikbaar?

d. Status van ontwikkeling

- Relevante en consistente reacties met positieve and negatieve referentiestoffen.
- Niveau van ontwikkeling van de test (geoptimaliseerd protocol, 'standard operating procedures') en van de methode (predictiemodel).
- Onderdeel van een overall strategie.
- Beschikbaarheid van gegevens (optimalisatie studies, prevalidatie, publicaties).
- Maakt deze test gebruik van de beste beschikbare wetenschappelijke kennis?
- Waarschijnlijkheid van succes.

Opgemerkt moet worden dat één van de genoemde criteria, namelijk de kans dat een test wordt geaccepteerd door wetgevers, afhangt van de robuustheid van de methode en of de relevante partijen betrokken zijn bij de beoordeling van de robuustheid van deze methode en daarnaast nut en noodzaak ervan.

3.2 Voor welke gebieden in het veiligheidsonderzoek is acceptatie van alternatieven aan de orde?

In het algemeen kan worden gezegd dat voor lokale eindpunten acceptatie van alternatieven aan de orde is, maar voor systemische eindpunten niet. Voor huid- en oogcorrosie, huid- en oogirritatie, acute toxiciteit en mutageniteit/genotoxiciteit zijn alternatieve methoden beschikbaar en is acceptatie aan de orde. Voor 'repeated-dose' toxiciteit, carcinogeniteit, reproductietoxiciteit en ontwikkelingstoxiciteit zijn weliswaar alternatieve methoden beschikbaar, maar omdat deze alternatieven slechts een klein deel van het complexe geheel dat aan elk van de typen toxiciteit ten grondslag ligt, vertegenwoordigd, is acceptatie door zowel industrie als overheid nog lang niet aan de orde. Sensibilisatie (huidsensibilisatie) is een systemisch eindpunt dat zich er als het ware tussenin bevindt, onder andere omdat de onderliggende mechanismen snel duidelijk worden.

4 Databases die van belang zijn bij de ontwikkeling van nieuwe beoordelingstrategieën in het veiligheidsonderzoek

4.1 Welke databases zijn in ontwikkeling om bij te dragen aan alternatieve teststrategieën in het veiligheidsonderzoek?

De hier beschreven databases hebben een geheel verschillende signatuur. Binnen de toxicologische databases zijn er databases van hoge kwaliteit met 'curated' gegevens over diverse chemische en biologische eigenschappen van stoffen, databases met testresultaten en databases met modellen die toxiciteit voorspellen.

Daarnaast zijn er databases die gericht zijn op 3V waarin de voortgang op het gebied van ontwikkeling van alternatieve methoden kan worden gevolgd.

Datacompilaties zijn erg nuttig om als vertrekpunt te gebruiken voor 'applicability domain' (hoe goed werkt een test voor een bepaalde (sub-)klasse van stoffen?) en zeker ook bij het ontwikkelen van geïntegreerde teststrategieën.

Commerciële databases worden zowel door de industrie als door dossierbeoordelaars gebruikt voor de daadwerkelijke beoordeling. Overigens worden daarbij ook niet-commerciële databases gebruikt zoals de OECD-toolbox.

4.1.1 Toxicologische databases

Websites met verzamelingen van databases:

EPA. 'Aggregated Computational Toxicology Resource' (ACToR) is een verzameling databases bijeengebracht of ontwikkeld door de EPA 'National Center for Computational Toxicology' (NCCT). Meer dan 200 bronnen van publieke data zijn bijeengebracht.

<http://actor.epa.gov/actor/faces/ACToRHome.jsp>

NIH. Een verzameling databases over toxicologie, gevaarlijke stoffen, milieu en gezondheid en het vrijkomen van toxische stoffen <http://toxnet.nlm.nih.gov>

NTP/NIH. Zoekmachine http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm

OECD. Een database met fysisch-chemische eigenschappen, gedrag in het milieu en (eco-) toxiciteit <http://webnet3.oecd.org/echemportal>

Databases van het EPA National Center for Computational Toxicology:

Dit centrum integreert innovatieve computer- en informatietechnologie met moleculaire biologie om 'high-throughput decision support tools' te ontwikkelen voor de beoordeling van blootstelling aan chemische stoffen, gevaren en risico's.

ToxPi. Toxicological Priority Index <http://epa.gov/ncct/ToxPi>

ACToR. Aggregated Computational Toxicology Resource <http://actor.epa.gov/actor>

ToxRefDB. Toxicity Reference Database <http://actor.epa.gov/toxrefdb>

ToxCast. <http://epa.gov/ncct/toxcast>

Virtual Tissues Update. <http://epa.gov/ncct/v-Embryo> of http://epa.gov/ncct/virtual_liver

Tox21. <http://epa.gov/ncct/Tox21>

CompTox STAR Centers. <http://epa.gov/ncct/star>

4.1.2 Overig

NIOSH/CDC. De 'Registry of Toxic Effects of Chemical Substances' is een samenvatting van gegevens uit de open wetenschappelijke literatuur

<http://www.cdc.gov/niosh/rtecs/default.html>

Cornell University. 'Extension Toxicology Network' database met informatie over meer dan 100 insecticiden, fungiciden en herbiciden

<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/index.html>

EPA. ECOTOX database <http://cfpub.epa.gov/ecotox>

IPCS. Pesticide database <http://inchem.org/pages/pds.html>

NCBI/NIH. zoekmachine. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

NCCT/EPA. Structuur zoekmachine <http://www.epa.gov/NCCT/dsstox>

NIH. Zoekmachine <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>

OECD. (Q)SAR Application Toolbox

http://www.oecd.org/document/54/0,3343,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1_00.html

RCS. Database met chemische structuren is ChemSpider www.chemspider.com

Toxicology Excellence for Risk Assessment. International Toxicity Estimates for Risk Assessment <http://www.tera.org/iter>

Alliance for Risk Assessment. RiskIE <http://www.allianceforrisk.org/RiskIE.htm>

NIH. Chemical Effects in Biological Systems (CEBS). Toxicogenomics. <http://cebs.niehs.nih.gov>

4.1.3 Op 3V gerichte databases

De ECVAM database over alternatieven <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu> is een waardevolle database waarin onder andere het volgende te vinden is: 'Method-Summaries', literatuur reviews inhoudend doel en toepassing van de test, te gebruiken materialen, experimentele variaties en status van ontwikkeling/validatie. In de INVITTOX database <http://www.invittox.com> staan *in vitro* technieken die in gebruik zijn, die in ontwikkeling zijn en die gebruikt worden in validatiestudies die onder auspiciën van ECVAM worden uitgevoerd. INVITTOX is ontwikkeld door het 'Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments' (FRAME, UK). Op dit moment bevat de INVITTOX database 129 protocollen.

Om op de hoogte te blijven van ontwikkelingen over alternatieven is Altweb <http://altweb.jhsph.edu> een goede ingang. Het bevat ook links naar de nieuwsbrieven van Alttox <http://alttox.org> en EPAA (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing) <http://ec.europa.eu/enterprise/epaa>. AltTox.org <http://alttox.org> is een discussie- en informatie-uitwisselingsite met als doel het stimuleren van proefdiervrije methoden voor toxiciteitstesten. EPAA heeft een website met activiteiten op het gebied van 3V: <http://www.epaawg1.com>

Een informatie 'portal' van NC3Rs naar diverse websites is <http://www.nc3rs.org.uk/landing.asp?id=38>

Een database met alternatieve methoden is AnimAlt-ZEBET (ZEBET is the Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments) van BfR (Duitsland)

<http://www.dimdi.de/static/en/db/dbinfo/zt00.htm>

Davis University (US) heeft een database voor alternatieven: <http://lib.ucdavis.edu/dept/animalalternatives>

4.1.4 EU-projecten met data compilaties

ACuteTox www.acutetox.eu

CADASTER www.cadaster.eu

CAESAR	www.caesar-project.eu
OpenTox	www.opentox.org
OSIRIS	www.osiris.ufz.de
Sens-it-iv	www.sens-it-iv.eu

4.1.5 *Commerciële databases*

Leadscope	www.leadscope.com
Lhasa	www.lhasalimited.org
MDL toxicity Database	accelrys.com
TerraTox	www.terrabase-inc.com

4.2 **Welke databases zijn het meest kansrijk en welke zijn minder van belang?**

Het type databases waar wij veel belang aan hechten zijn ten eerste databases waarin voor een groot aantal stoffen, per stof een groot aantal eigenschappen zijn samengebracht, en waar voor eenzelfde eindpunt vele consistente metingen voor diverse stoffen zijn uitgevoerd, zoals in ToxRefDB. Zonder een robuuste database met consistente referentiewaarden (bijvoorbeeld uit OECD standaardtesten) is het aantonen van de robuustheid van een alternatief zeer lastig (of zelfs onmogelijk). Dit type databases geeft een solide basis aan geïntegreerde teststrategieën. Ten tweede zijn dit databases die veranderingen in biologische systemen die aan toxiciteit ten grondslag liggen, weergeven, zoals ToxCast. Deze database is zeer belangrijk om geïntegreerde systemen aan te tonen, maar dit kan alleen bij de gratie van de ToxRefDB.

<http://www.epa.gov/ncct/toxcast>

<http://www.epa.gov/ncct/toxrefdb>

4.3 **Hoe zouden geïntegreerde teststrategieën een plaats kunnen krijgen in het veiligheidsonderzoek?**

Onder een geïntegreerde teststrategie verstaat men het op een logische wijze uitvoeren van een aantal testen met als doel om, met in achtneming van de 3V-uitgangspunten, tegen zo gering mogelijke kosten, met voldoende zekerheid een uitspraak te doen over (de mate van) toxiciteit van een stof. Eerst wordt nagegaan of er al informatie beschikbaar is. Dit betekent fysisch-chemische gegevens, informatie over blootstellingsniveaus¹ en gegevens over de mens. Dan wordt nagegaan welke informatie nodig is om voldoende zekerheid te krijgen. De volgorde is vaak die van toenemende complexiteit, waarbij verschillende testen deels tegelijkertijd uitgevoerd kunnen worden, (1) computermodellen ('quantitative structure activity relationship' (QSAR) en 'read across'), (2) proefdiervrije methoden (organisch-chemisch, celkweek) en (3) dierproeven. Zelfs wanneer dierproeven nodig zijn, kunnen de stappen ervoor al proefdierbesparend zijn, door opgedane kennis over relevante typen toxiciteit, blootstellingroute en dosering. Een voorbeeld van een teststrategie is die beschreven in hoofdstuk V van het OECD 'draft guidance document on reproductive testing and assessment' (GD43).

¹ Als de blootstellingsniveaus zo laag zijn dat er geen aanleiding is om toxiciteit te verwachten (lager dan de 'Threshold of Toxicological Concern'), dan kan men afzien van het uitvoeren van testen ('Exposure Based Waiving').

Het is nog niet duidelijk hoe dit proces op een eenvormige en objectieve manier moet worden ingericht, laat staan hoe een gevalideerde 'Integrated Testing Strategy' (ITS) te krijgen. Er worden wel pogingen gedaan, bijvoorbeeld met

beslismodellen. In principe kan elk stukje informatie bijdragen om de vooraf bepaalde zekerheidsdrempel te passeren. Er zijn echter valkuilen, zoals het feit dat verschillende technieken (deels) hetzelfde proces meten, of dat de waarde van een testuitslag in termen van toevoegen aan de zekerheid, afhangt van hoe goed de geteste stof binnen het toepasbaarheidsbereik van de test valt. Er worden pogingen ondernomen om hierin verder te komen, ondersteund door de EU, zoals in de projecten:

CEASAR <http://www.caesar-project.eu> (vooral gericht op QSAR / 'read across')

CHEMSCREEN (nog geen website; vooral gericht op teststrategieën)

OSIRIS <http://www.osiris-reach.eu> (vooral gericht op ITS)

Een recente ECVAM/EPAA workshop beschrijft de 'state-of-the-art' voor wat betreft ITS (Kinsner-Ovaskainen et al., 2009). Op dit moment zijn er geen bestaande procedures en richtlijnen voor het opstellen en valideren van 'Integrated Testing Systems'. Volgens de auteurs zou formele validatie niet nodig hoeven zijn, tenzij het een vervanging voor een *in vivo* methode betreft. Hoewel er veel 'Integrated Testing Systems' zijn voorgesteld in de wetenschappelijke literatuur, zijn er slechts weinig op regelgevend niveau overeengekomen en gepubliceerd in regelgevende richtlijnen (ECHA, 2008).

Binnen de geneesmiddelenontwikkeling gaan werkzaamheids- en veiligheidsonderzoek hand in hand. Na de eerste vaststelling van farmacologische werkzaamheid worden toxicologische testen uitgevoerd, leidend tot een schatting van een veilige dosering bij de mens. Bij vrijwilligersonderzoek gaat het alleen om veiligheid.

5 Wat zijn de belangrijkste barrières voordat alternatieve teststrategieën gebruikt zouden kunnen worden in het veiligheidsonderzoek?

5.1 Algemeen

De huidige situatie is er één van 'bottom-up': een onderzoeker ontdekt een respons op een toxisch agens. De logische volgende stap is het hieruit ontwikkelen van een model dat als uitleessysteem kan dienen voor het vaststellen van dat type toxiciteit. Vervolgens wordt dit model getest op een beperkt aantal stoffen. Wanneer dit model goed werkt, wordt het (beperkt) gekarakteriseerd en gepubliceerd. Daarna vervalt vaak de interesse van de onderzoeker, zowel om wetenschappelijke als om financiële redenen. De vervolgfase, vooral de validatie, valt duidelijk ongunstiger uit in de verhouding tussen output (vooral het wetenschappelijke niveau ervan) en input in tijd/geld. Ook zijn budgetten voor validatiestudies gering ten opzichte van ontwikkelingsstudies en bijvoorbeeld binnen EU FP programma's zelfs uitgesloten!

In gunstige gevallen, bijvoorbeeld binnen de industrie of een overheidsorganisatie, of indien er sprake is van budget specifiek gericht op validatie, wordt er een validatiestudie uitgevoerd, waarin onder meer de betrouwbaarheid en relevantie van een test worden onderzocht. Als voorbeeld van een validatieproces wordt in Bijlage 3 de door ECVAM opgestelde modulaire benadering van validatie gegeven. Het aantal stoffen waarmee de testmethode is uitgevoerd, neemt door deze validatiestudie toe. Dit is niet zozeer (alleen) getalsmatig gunstig, maar voor een betekenisvolle validatie is het ook noodzakelijk (alle) verschillende klassen van stoffen met een bepaald type toxiciteit mee te nemen.

Wanneer men een gevalideerde test in handen heeft, is de volgende stap dat deze moet passen binnen de wensen van de regelgevende autoriteiten. Er is immers weinig noodzaak voor een test die in de praktijk niet een 'gap' opvult. Er is dus behoefte aan een 'top-down' benadering, waarbij regelgevende autoriteiten en industrie mee vaststellen welke modellen worden opgezet c.q. welke modellen gevalideerd moeten worden. Onafhankelijk van de vraag of de validatie door ECVAM of door een andere organisatie wordt uitgevoerd, dient elke methode op een transparante wijze te worden onderbouwd, voor relevante chemische klassen geschikt te zijn en een regelgevend doel te dienen. Indien geen regelgevend doel wordt gediend kan de situatie ontstaan dat een gevalideerde test niet wordt geïmplementeerd.

De tijdsduur van een validatieproces is variabel; de tijdsduur van implementatie door de OECD is eveneens variabel en afhankelijk van de validatiestatus van de methode en het moment waarop de methode door een lidstaat aangeboden wordt aan de OECD. Meer in het algemeen kan gezegd worden dat, om een methode goed te onderbouwen, het belangrijk is om een adequate referentieset op te bouwen (referentie database) en een voldoende groot domein van stoffen te testen. Indien dit op een transparante en heldere manier is beschreven en er een 'peer review' is geweest (indien noodzakelijk) en de methodiek een regelgevend relevant eindpunt betreft, kan een testmethode worden opgesteld. Al deze stappen vergen tijd en inspanning van experts. Goede uitwisseling met alle relevante partijen (minimaal wettelijke beoordelaars en industrie) gedurende het gehele proces kan het verloop van dit proces bevorderen. Punt is

en blijft dat uitvoeren van een robuuste onderbouwing van een methode veel tijd en geld vergt, evenals het proces daarna, namelijk de internationale afstemming van de methode. Dit proces kan bevorderd worden als relevante partijen in het proces worden betrokken.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat de huidige 'bottom-up' benadering op diverse schakelmomenten richting implementatie onvoldoende (efficiënt) werkt. Een specifieke vraag om gevalideerde testen die opgesteld wordt door beoordelaars betrokken bij 'classificatie en labeling', en acceptatie en implementatie van OECD-richtlijnen, lijkt erg nuttig. Deze vereist communicatie/coördinatie tussen onderzoekers en eindgebruikers. Men kan zich voorstellen dat de afstand tussen deze groepen (te) groot is en er dus noodzaak is om de tussenliggende fasen te versterken. Afspraken om nieuwe initiatieven te verzamelen en 'gaps' in de strategie te identificeren, zijn afwezig. Er wordt ingezet, onder meer door VWS, om eerst nationaal, later internationaal, deze afspraken ook te maken.

Een positief punt is dat binnen de OECD, 'Mutual Acceptance of Data' (MAD) bestaat. Deze regel betekent dat resultaten van een studie die onder GLP is uitgevoerd volgens een OECD testrichtlijn geaccepteerd wordt door de regelgevende autoriteiten in alle OECD-lidstaten. Dit betekent dus een grote besparing aan proefdieren, omdat testen binnen OECD-lidstaten niet herhaald hoeven te worden. DE OECD heeft in 2010 uitgerekend dat dit alleen al aan kosten een besparing van meer dan 150 miljoen per jaar betreft. Aangezien de kosten vooral zitten in studies die veel proefdieren vergen, is helder dat dit een grote reductie in het aantal proefdieren betreft.

De resultaten van de te valideren methode worden niet vergeleken met datgene waar we eigenlijk in geïnteresseerd zijn, namelijk humane *in vivo* data (die overigens vaak beperkt aanwezig zijn), maar met de resultaten van proefdiertesten. Deze laatste worden als gouden standaard genomen. Het is dus niet mogelijk om meer te bereiken dan deze standaard en de benadering te verbeteren, omdat de diertest geen perfecte evenaring is van de mens. Daarnaast moet bedacht worden dat de te vervangen dierproef zelf niet op een dergelijk strenge wijze is gevalideerd. Bij het vergelijken van resultaten van de te valideren methode met de traditionele manier kunnen afwijkingen dus ook te wijten zijn aan de onvolkomenheid van de dierproef.

Regelgevers zijn terughoudend als het gaat om het implementeren van alternatieven. Hetzelfde geldt voor de industrie; zij zijn terughoudend om maatregelen op basis van alternatieve methoden te accepteren zonder bevestigende dierproef. Een verklaring hiervoor is dat ze uitgebreide kennis bezitten op het gebied van diermodellen, terwijl proefdiervrije benaderingen compleet anders kunnen zijn dan de huidige manier waarop schadelijkheid van een stof bepaald wordt. Het gaat hierbij om andere parameters, andere processen voor validatie en andere expertise die van de regelgever en industrie worden gevraagd. Geïntegreerde teststrategieën, *in silico* methoden, transgene modellen en -omics strategieën zijn hiervan voorbeelden. Een andere verklaring is de weging van veiligheid en dierenwelzijn. De verantwoordelijkheid van regelgevers zorgt ervoor dat vervangende methoden minder vaak worden geaccepteerd dan methoden waar deze kennis wel aanwezig is. Hetzelfde geldt voor de industrie die wel op basis van bestaande proefdiermethoden instemt met maatregelen betreffende hun stoffen (bijvoorbeeld verbod van bepaalde gebruiken/toepassingen), maar hiertoe minder/niet bereid is op basis van nieuwe, minder robuuste methoden.

Voorlopig blijven dierproeven bestaan, omdat we nog niet in staat zijn het proefdier met voldoende zekerheid te vervangen door iets anders. Er moet op toegezien worden dat verfijning en vermindering ook aan de beurt komen. Op dit moment is dat niet gemakkelijk; zo vinden Europese en nationale geldschietters het veel aantrekkelijker om een vervangende methode te stimuleren. Hierbij moet wel worden aangetekend dat de EPAA zich in 2010 juist heeft gericht op 2V (vermindering en verfijning) als een insteek om snel winst te boeken. Hierbij moet vermeld worden dat voor de overwegingen die een selectiecommissie moet maken geen voor de hand liggende oplossingen bestaan. Denk aan een afweging tussen een project dat minder leed bij veel dieren oplevert in vergelijking tot een project dat de vervanging van een minder groot aantal dieren geeft.

ICCVAM heeft een Research and Development werkgroep ingesteld, die wetenschappers omvat die betrokken zijn bij onderzoeksprogramma's van ICCVAM 'member agencies'¹. Hun deelname aan deze werkgroep helpt ICCVAM om veelbelovende testmethoden te identificeren voor verwijzing naar passende ICCVAM werkgroepen voor onder andere evaluatie. De werkgroep en de 'ICCVAM vijfjarenplan implementatie subcommissie'² plannen samen een implementatie workshop, waarin potentiële gebruikers van geaccepteerde alternatieve testmethoden en vertegenwoordigers van de regelgevende agentschappen worden samengebracht, in een poging om te komen tot een ruimer gebruik van toegelaten alternatieve methoden.

¹ ICCVAM 'member agencies' zijn onder andere CPSC, DoA, DoE, EPA, FDA, NCI, NIEHS, NIOSH en NLM.

² Het NICEATM-ICCVAM vijfjarenplan kent vier aandachtspunten (niet per se in het stoffendomein), namelijk:

- het identificeren van prioriteiten en het faciliteren van uitvoering van alternatieve testmethode;
- integratie van nieuwe wetenschap en technologie;
- stimulering van wettelijke erkenning en het juiste gebruik van alternatieve methoden;
- ontwikkeling van partnerschap en versterking van de interactie met ICCVAM 'stakeholders'

De 'ICCVAM vijfjarenplan implementatie subcommissie' is opgericht om deze activiteiten te coördineren en de voortgang ten aanzien van verwezenlijking van de doelstellingen te volgen.

In april 2009 heeft een initiatief door ICCVAM een internationale overeenkomst tussen de Verenigde Staten, Canada, Japan en de EU bevorderd. De verwachting is dat deze tot een verdere verlaging van het gebruik van proefdieren in het veiligheidsonderzoek van stoffen leidt.

De overeenkomst omvat wereldwijd gecoördineerde, hoogwaardige validatiestudies en 'peer reviews', uitgevoerd met behulp van een transparant proces dat de internationale harmonisatie en goedkeuring van alternatieve testmethoden moet versnellen.

NICEATM en ICCVAM nemen deel aan interdepartementale samenwerking tussen het NTP (onderdeel van het NIEHS), de EPA, en de NIHCGC om high-throughput screening te evalueren. Van dit initiatief wordt verwacht dat deze methoden mogelijk toepassing hebben in testen binnen wettelijke kaders. Veelbelovende methoden zullen worden beoordeeld door ICCVAM, die aanbevelingen zal doen voor passend gebruik door federale agentschappen.

5.2 Opinie van de OECD

Acceptatie van een testmethode door een specifieke regelgever betekent niet noodzakelijkerwijs dat deze methode algemeen geaccepteerd wordt door andere regelgevende autoriteiten. Het beleid ten aanzien van acceptatie verschilt van land tot land en soms zelfs tussen regelgevers binnen één land.

Regelgevende autoriteiten kunnen (nog steeds) aanvullende vragen hebben over de testmethode, die verder reikt dan de vastgestelde betrouwbaarheid en relevantie. Deze vragen kunnen van invloed zijn op acceptatie. Harmonisatie van internationale acceptatie van adequaat gevalideerde testen door regelgevers kan worden bereikt door de richtlijnen vermeld in OECD GD34 te gebruiken.

Acceptatie door regelgevende autoriteiten wordt sterk bevorderd door in een zo vroeg mogelijke fase van het validatieproces, de autoriteiten aan wie de test resultaten van de gevalideerde methode worden voorgelegd, hierbij te betrekken.

Een beschrijving van hoe de voorgestelde testmethode het proefdiergebruik kan verfijnen, verminderen of vervangen in vergelijking tot de huidige methoden die worden gebruikt ten behoeve van dat specifieke eindpunt, moet worden toegevoegd. Als de voorgestelde test uitgevoerd wordt met proefdieren, moet de rationale hiervoor worden gegeven. Een beschrijving van de bronnen die gebruikt zijn om vast te stellen of alternatieve testmethoden beschikbaar zijn die proefdiergebruik verfijnen, verminderen of vervangen, moet worden overlegd. Deze beschrijving moet ten minste de onderzochte databases, de zoekstrategie, de zoekresultaten, het resultaat van de zoekactie en de rationale om geen bestaande alternatieve testen te gebruiken, bevatten. De basis om het juiste aantal dieren voor de testmethode vast te stellen moet beschreven worden. Als de test mogelijk pijn en ongerief geeft, moeten de procedures en benaderingen die zijn ingebouwd om deze pijn en dit ongerief te minimaliseren en zo mogelijk te elimineren, bediscussieerd worden.

Ook al zijn sommige alternatieven formeel gevalideerd, nog steeds hebben ze niet de fase bereikt waarbij ze leiden tot vermindering van testen in proefdieren. Punten van zorg zijn onder andere de beperkte informatie over kinetiek en de bijna volledige afwezigheid van metabolisme, bij *in vitro* testen. In het geval van pre-screening voor prioritering van *in vivo* testen zijn ze wellicht nuttig in de toekomst, maar zulke ontwikkelingen wachten op verdere definitie van het toepassingsgebied en het voorspellende vermogen.

5.3 Opinie van de EPAA

Als EU-organisatie richt EPAA zich primair op ECVAM. Deze laatste is echter niet de enige speler in het veld van alternatieven.

5.3.1 *Obstakels voor Validatie*

Er zijn obstakels, die een snelle en succesvolle validatie door ECVAM belemmeren. Al eerder is opgemerkt dat ECVAM niet een verplichte route is voor validatie, of een garantie voor acceptatie. In diverse EPAA discussies binnen de 'validatie en acceptatie' werkgroep en tijdens een interdisciplinaire EPAA workshop over 'obstakels voor validatie' in september 2006 is een aantal probleemgebieden geïdentificeerd.

1. **Gebrek aan duidelijkheid over de doelen en het gebruik van de methode.** Dit resulteert soms in ineffectieve en niet op maat gemaakte validatieprocessen.
2. **Gebrek aan geschikte informatie.** Onderzoek van relevantie en betrouwbaarheid van alternatieve methoden vereist complete en niet gebiaste referentiedata van proefdier of mens, van hoge kwaliteit. Dit omvat ook informatie over referentie testmethoden, positieve en negatieve stoffen

(referentiestandaarden) en over prestatiekenmerken van proefdiertesten, indien een referentiemethode beschikbaar of gedefinieerd is.

3. **Gebrek aan mechanistisch begrip van gezondheids- en milieueffecten.**
4. **Gebrek aan onderzoeksmaterialen.** Het niet beschikbaar zijn van onderzoeksmaterialen om referentiedata te verkrijgen is een obstakel; onderzoeksmaterialen kunnen niet (in voldoende hoeveelheden) beschikbaar zijn, bijvoorbeeld humane weefsels of cellen, humane embryonale stamcellen.
De volgende zaken kunnen door de EPAA aan de orde gesteld worden:
 - *In vivo* en *in vitro* gegevens die nodig zijn voor validatie zijn niet altijd publiek toegankelijk: indien mogelijk kan informatie worden aangeleverd.
 - Geen wettelijke referentietest is beschikbaar: er zijn toxiciteitseindpunten waarvoor geen wettelijke referentietest bestaat, zoals respiratoire irritatie, respiratoire sensibilisatie en immunotoxiciteit.
 - Er bestaan verschillende wettelijke testen: indien verschillende wettelijke testen bestaan, welke moet dan gekozen worden als referentietest?
 - Publicatiebias (groter aantal positieven): omdat wetenschappelijke publicaties meestal betrekking hebben op positieve (toxische) stoffen, is er een bias naar positieve stoffen.
 - Notificatiebias (groter aantal negatieven): veel negatieve stoffen worden bekendgemaakt. Er is dus bias voor negatieve stoffen in deze databases.
 - Gebruik van *in vivo* data als enige referentiestandaard indien humane data niet beschikbaar zijn.
5. **Duur van de validatie procedure.** Validatie door ECVAM duurt 2 tot 5 jaar, afhankelijk van het ontwikkelingsstadium van de methode, dat wil zeggen hoe veel standaardisatie en verfijning nog nodig is (zie onder). Dit wordt veroorzaakt door de duur van de publieke verwervingsprocedure voor het betrekken van externe laboratoria (9 tot 12 maanden) aan de ene kant en de lengte van het 'peer review' proces en de tijd die nodig is om datasets en onderzoeksmiddelen te completeren aan de andere kant.
De duur van het 'peer review' proces kan door de EPAA aan de orde gesteld worden:
 - Beschikbaarheid van experts
 - Beschikbaarheid van alle documenten
6. **Nieuwe methodieken.** Processen voor het valideren van nieuwe of complexe methodieken en benaderingen (teststrategieën, *in silico*, transgene modellen en 'omics') bestaan nog niet. Ze moeten ontwikkeld en vastgesteld worden voor die gevallen waarbij formele validatie nodig is.
7. **Budgettaire beperkingen.** Een gebrek aan financiële middelen kan het validatieproces vertragen als de operationele ondersteuning en de ondersteuning van de staf onvoldoende is om met voor validatie voorgelegde alternatieve methoden om te gaan.

5.3.2 *Mogelijke oplossingen voor het nemen van obstakels voor validatie*

Voor de meest voor de hand liggende tekortkomingen worden pilot oplossingen geïmplementeerd.

1. **Beschikbaarheid van gegevens en onderzoeksmiddelen.** EPAA is begonnen om oplossingen te ontwikkelen om het belangrijkste probleem van ECVAM op te lossen, namelijk het gebrek aan *in vitro* en *in vivo* gegevens om de betrouwbaarheid en relevantie van alternatieve assays en teststrategieën vast te stellen. Verschillende stappen binnen een

samenwerkingsverband zijn geïdentificeerd en worden getest door middel van een serie pilot assays:

- Definitie van benodigdheden in termen van gegevens en onderzoeksmiddelen die het validatie managementteam nodig heeft.
- Vaststellen van eenvoudige en gestandaardiseerde informatieverzoeken die een minimum achtergrond geven die nodig is om snelle beslissingen te nemen en makkelijke voortgang binnen het bedrijf te bereiken.
- Aanstelling van contactpersonen binnen elk bedrijf, die in staat zijn om op technische gronden het verzoek vast te stellen en toegerust zijn met standaardadvies om verzoeken gericht op ondersteuning van 3V-validatie, voortgang te laten vinden.

Nu is het zo dat verzoeken om informatie door ECVAM niet de juiste persoon binnen een bedrijf bereiken. Aanstelling van een 3V-validatie contactpersoon in de bedrijfsverenigingen en bedrijven zou de huidige situatie kunnen verbeteren.

Uitnodiging door het Management Team om voorbereidende discussies te hebben met EPAA kunnen geïnteresseerde bedrijven ertoe leiden om gegevens die relevant zijn voor de studie te delen.

2. **Bedrijfsvertrouwelijke aspecten.** ECVAM heeft een 'Intellectual Property Rights' (IPR) overzichtsvormulier ontwikkeld voor nieuw in te dienen alternatieve methoden met als doel mogelijke problemen van vertrouwelijkheid te identificeren in de vroegste fase van het validatieproces. Overigens beschikt de OECD ook over een dergelijk formulier. Indien er een belangrijk IPR probleem is, dient dit afdoende behandeld te worden met inachtneming van de belangen van de bedrijven aan de ene kant, en de noodzaak om te komen tot snelle validatie van alternatieve testmethoden aan de andere kant.

Een overeenkomst over vertrouwelijkheid geeft een mogelijke oplossing voor aan IPR gerelateerde obstakels. Dit instrument zou beschouwd kunnen worden voor alle commercieel gevoelige data die onderwerp zijn van 'peer review' gedurende het validatieproces. Een dergelijke overeenkomst kan beperkt worden tot de meest gevoelige gegevens.

Om dit punt van bedrijfsgevoeligheid te vermijden, kan het gebruik van bekende referentiestoffen meestal een passende oplossing zijn. In dit geval zou het vaststellen van het mechanisme (punt 1) en contactpersonen voldoende zijn voor antwoord van het bedrijfsleven op verzoeken om informatie door ECVAM.

3. **Vermindering van administratieve vertraging.**

ECVAM heeft een aantal activiteiten opgezet om validatie te versnellen en het validatieproces efficiënter te maken. Het oprichten van een 'Reference Laboratory for Alternative Tests' (CORRELATE) zal het versnellen van het proces van methode-evaluatie versnellen. De geplande vroege betrokkenheid van regelgevers door middel van het nu in oprichten zijnde 'European Regulatory Advisory Panel' (ERAP) zal behulpzaam zijn om het wettelijke gebruik vast te stellen en validatie en de daaropvolgende wettelijke acceptatie te versimpelen.

Om monopolies te vermijden en om te veel verschillende testrichtlijnen die over vergelijkbare methoden gaan te vermijden, kan een generieke beschrijving van de 'performance standards' opgenomen worden in een generieke 'Performance-based Test Guideline' (PBTG). Overigens is deze ontwikkeling ook gaande bij de OECD.

Al in 2006 heeft de 'Validation Management Group for non-animal testing' (VMG-non-animal) de zorg uitgesproken over het grote aantal assays of delen daarvan, ontwikkeld door bedrijven die vallen onder een verschillende mate van handelsmerken en andere gepatenteerde wettelijke voorwaarden.

5.4 **Opinie van een ECVAM workshop (Bottini et al., 2008)**

5.4.1 *De belangrijkste en meest voorkomende obstakels met betrekking tot validatie en regelgevende acceptatie*

- Door wet- en regelgeving wordt niet op een consistente manier omgegaan met **het delen en beschermen van gegevens**. Bedrijven worden als terughoudend gezien om beschikbare onderzoeksresultaten beschikbaar te maken, om concurrentieoverwegingen. De beschikbaarheid hiervan versterkt alternatieve methoden, omdat veel duplicatie kan worden vermeden.
- **Communicatie** tussen de verschillende 'stakeholders' moet verbeterd worden, omdat dit belangrijk is voor implementatie van 3V en validatie en acceptatie. Tussen (a) wetenschappers en regelgevers, (b) regelgevers en beleidsmakers/wetgevers en (c) de verschillende regelgevende instanties, moet de communicatie actief bevorderd worden.
- **Fragmentering van informatie** binnen nationale, Europese en andere internationale instituties heeft vaak problemen tot gevolg met het identificeren van de individuen die bereikt moeten worden voor informatie.
- **Verschillen in de implementatie van 3V's** in verschillende toepassingsgebieden, zoals stoffen, cosmetica, voedsel en geneesmiddelen. Dit geldt niet alleen voor cosmetica met de ban op dierproeven, maar ook voor dicht bij elkaar gelegen gebieden als stoffen en gewasbeschermingsmiddelen.
- **Internationale wederzijdse acceptatie** is onmisbaar. De globalisering van alternatieve methoden is zowel een kans als een uitdaging.
- Naast individuele testmethoden, moeten ook **teststrategieën gevalideerd zijn**, omdat slechts zelden één enkele alternatieve test een dierproef kan vervangen. De systematische ontwikkeling en validatie van teststrategieën staat echter nog in de kinderschoenen. De aanpak hiervan wordt als zeer belangrijk gezien.
- **Regelgevers hebben een voorkeur voor vermindering en verfijning** boven vervanging. Dit wordt veroorzaakt door de bekendheid van regelgevers met traditionele testen en daarmee is verandering naar aangepaste dierproeven gemakkelijker.
- **Wetenschappers zijn onvoldoende bekend met regels en de mogelijkheden om deze te beïnvloeden**. De ontwikkeling van methoden, specifiek gericht op toepassing in het regelgevende veld wordt vaak niet gedaan omdat wetenschappers in de biomedische wetenschappen vaak niet genoeg weten over de mogelijkheden. Geprogrammeerd onderzoek en de actieve zoektocht naar nieuwe methoden door validerende instanties spelen hierin een belangrijke rol. Tegelijkertijd hebben testontwikkelaars vaak onrealistische verwachtingen met betrekking tot het gebruik van hun methoden voor regelgevende doeleinden.

5.4.2 *Thema's die worden gezien als mogelijkheden om het post-validatieproces te versnellen en tot acceptatie van alternatieve methoden te komen*

- **Identificatie van de sleutelfiguren en verantwoordelijken in elk gebied van de toxicologie**. Communicatie start met het identificeren van de personen die je moet spreken. Dit is niet eenvoudig, vooral als verschillende toepassingsgebieden betrokken zijn. Dit bleek bijvoorbeeld bij het opstarten van de EPAA.
- **Ontwikkeling van netwerken om de communicatie tussen 'stakeholders' te verbeteren**. Netwerken is meer dan communicatie, het behelst ook samenwerking, coördinatie en convergentie. Dit betekent dat er

zowel formele als informele manieren moeten zijn om de verschillende agenda's op elkaar af te stemmen.

- **Gebruikmaken van de EPAA.**
- **Zorgdragen dat regelgevers geïnformeerd zijn over de diverse Europese onderzoeksprogramma's en daar ook sterk bij betrokken zijn.** Voor het begrip en om richting te geven aan nieuwe of gereviseerde 3V-testen moeten regelgevers direct vanaf het begin worden betrokken bij de conceptie en ontwikkeling van alternatieve methoden. Het is belangrijk dat methoden geoptimaliseerd worden gericht op de behoefte van regelgeving en dat het validatieproces tegen het licht wordt gehouden van beslissingen op dit vlak. Dat betekent, vooral voor de selectie van teststoffen maar ook met betrekking tot de definitie van de test (-strategie), dat toekomstig gebruik binnen de regelgeving overwogen moet worden en dat relevante regelgevers moeten worden betrokken. Tegelijkertijd moet informatie over opkomende nieuwe methoden, mogelijk ondersteund door validatiestudies, tijdig naar regelgevers worden gecommuniceerd, om het pad te effenen voor validatie en acceptatie.
- **Het betrekken van regelgevers bij de verschillende stadia van het validatieproces** en ze in het ideale geval bevragen naar (a) commentaren en meningen over de noodzaak voor enig voorgesteld alternatief vanaf het begin van het validatieproces, (b) begrip en overeenstemming met betrekking tot het predictiemodel voor specifieke chemische klassen en (c) advies over de selectie van referentiestoffen en overeenstemming over standaarden en positieve en negatieve controles.
- **Het identificeren van bedoeld gebruik in regelgeving van de gevalideerde methoden in ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) verklaringen.** De diverse gebruiksmogelijkheden van testen in overeenstemming met de regelgeving moet meegenomen worden in het ontwerp en de 'peer review' van validatiestudies. Een redelijke vaststelling van de wetenschappelijke geldigheid van een methode moet uitgevoerd worden in het licht van het gebruik in regelgevend kader.
- **Versnellen van het 'peer review' proces en publicatie van de ESAC verklaringen.** De modulaire benadering van validatie (zie Bijlage 3) kan hierbij behulpzaam zijn. Daarnaast kan een 'weight-of-evidence' benadering verdere flexibiliteit geven.

Een mogelijke oplossing voor de boven besproken problemen is om de nationaal coördinatoren van de EU en OECD een (grotere) rol te geven als brug tussen ontwikkeling/validatie en implementatie. Zij beoordelen methoden op de wettelijke toepasbaarheid en zouden meer dan voorheen betrokken moeten worden bij de ECVAM-werkzaamheden. ECVAM heeft tot op heden alleen een panel van experts gehad (ESAC) die veelal geen enkele band hebben met de wettelijke toepassing van methoden.

5.5 **Opinie van het Nationaal Toxicogenomics Centrum**

Een nieuwe test ontwikkelen is één ding, ervoor zorgen dat die test ook breed gebruikt kan en mag worden is iets heel anders. In dit proces spelen nationale en Europese goedkeuringsinstanties, die bepalen of nieuwe geneesmiddelen of chemische verbindingen op de markt toegelaten worden, een sleutelrol. Het beleid dat deze instanties uitvoeren biedt weinig tot geen ruimte om af te wijken van het standaardprotocol, waarin dierproeven een haast onaantastbare positie hebben verworven. Een nieuwe, dierproefvrije, test zal daarom alleen geaccepteerd worden na een uitvoering proces van validatie waarin deze zijn

betrouwbaarheid onomstotelijk heeft bewezen. Dit vormt een groot obstakel. Het validatieproces is namelijk tijdrovend, ingewikkeld en kostbaar, en daarnaast onaantrekkelijk voor wetenschappers omdat het geen uitzicht biedt op aansprekende nieuwe bevindingen. Dat er bovendien nauwelijks financieringsmogelijkheden zijn voor validatiestudies maakt het probleem alleen maar groter. Willen we de investeringen in het onderzoek naar alternatieven voor dierproeven ten volle benutten, dan moeten deze twee hindernissen – moeizame validatie en conservatief beleid van overheid en industrie om resultaten te aanvaarden – worden aangepakt.

Maar daarvoor is politieke actie nodig. Inhoud van beleid en prioriteiten in onderzoeksfinanciering zijn immers het resultaat van politieke keuzes. Er is volop ruimte voor verandering en verbetering in de ontwikkeling en implementatie van alternatieven voor dierproeven, mits de politiek bereid is bestaande conventies te doorbreken.

Wat kan de Nederlandse politiek concreet doen?

- Via de minister van VWS zorgen dat het onderwerp op de juiste Europese agenda's komt.
- Via de Nederlandse leden van het Europees Parlement zorgen voor aanpassing van het beleid van de relevante Europese goedkeuringsinstanties en voor meer middelen voor validatiestudies.
- Via de minister van OCW invloed uitoefenen op de verschillende Europese financieringsprogramma's voor wetenschappelijk onderzoek en ook hier meer aandacht geven aan validatiestudies.
- Op nationaal niveau zorgen voor duurzame investeringen in het onderzoek naar alternatieven voor dierproeven en erop toezien dat ook het Nederlandse bedrijfsleven en de regelgevers hierbij worden betrokken.
- Op alle fronten bevorderen dat Nederland bij de ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven een voortrekkersrol kan (blijven) vervullen.

Conclusies

Binnen het domein van de 'hazard identification' en de 'risk assessment' is het streven om in de toekomst alle dierproeven volledig te vervangen. Dit streven zal echter niet binnen afzienbare tijd gerealiseerd kunnen worden. Zelfs op de lange termijn is het de vraag of voor sommige onderdelen van het veiligheidsbeleid nauwkeurig geselecteerde dierproeven niet noodzakelijk blijven ('targeted testing'). Het RIVM deelt het standpunt dat is verwoord in het rapport: 'Toxicity Testing in the 21st Century' van de US National Research Council.

Het streven naar vervanging van dierproeven zal voornamelijk ook vaak ingevuld moeten worden door proeven te doen met minder dieren en door experimenten uit te voeren die minder ongerief veroorzaken bij de dieren (verfijnen). Er is veel druk (REACH, Cosmetics moratorium) om met snelle, diervrije testen stoffen te beoordelen binnen zeer korte termijn (4 jaar). *In vitro* testen zijn soms een geschikt alternatief, maar helaas vaak ook nog niet. Het RIVM heeft eerder aangegeven (2009, Bessems) dat voor screening en prioriteitsstelling *in vitro* alternatieven soms voor handen zijn, maar voor 'classificatie en labeling', en zeker voor 'risk assessment', is er feitelijk nog niets beschikbaar. In het bijzonder voor complexe toxicologische effecten als carcinogenese, reproductietoxicologie, sensibilisatie en directe immunotoxiciteit zijn er nog geen betrouwbare proefdierloze methoden voor handen. Desondanks is en blijft de maatschappelijke en politieke druk hoog om 'hazard identification' en 'risk assessment' uit te voeren zonder proefdieren.

Voor cosmetica bestaat er sinds 11 maart 2009 een verbod op toxiciteitstesten, met uitzondering van testen voor 'repeated-dose' toxiciteit (inclusief huidsensibilisatie en carcinogeniteit), toxicokinetiek en reproductietoxiciteit. Ook voor het verhandelen van cosmetica geldt dit verbod. Voor de typen toxiciteit waarvoor dit verbod nu nog niet geldt (bovengenoemd), wordt deze 11 maart 2013 van kracht. Recent heeft de Europese Commissie aan een aantal experts gevraagd wanneer men verwacht dat voor deze typen toxiciteit proefdiervrije testen beschikbaar komen. Men richt zich hierbij op het moment van beschikbaarheid van gevalideerde testen, dus niet op validatie, implementatie en opname in wetgevende kaders. Voor 'repeated-dose' toxiciteit en carcinogeniteit gaf men geen jaartal aan, voor huid sensibilisatie 2017-2019, voor toxicokinetiek 2015-2017 en voor reproductietoxiciteit na 2020.

Een goede en wetenschappelijk verantwoorde risicobeoordeling is een voorwaarde voor een verantwoord beleid voor chemische stoffen. 'Assuring Safety without Animal Testing'(ASAT) is ook voor het RIVM en andere instituten de ultieme ambitie, maar de realiteit leert dat voornamelijk op beperkte schaal dierproeven nodig zijn. Verbetering van alternatieven biedt nog veel mogelijkheden om aan de maatschappelijke en politieke wens tot proefdiervervanging tegemoet te komen. Op sommige gebieden zal deze ontwikkeling nog vele jaren vergen, zoals binnen het CMRS-domein. Voor REACH, met eerste opleverdatum 1 december 2010, is dit geen haalbare kaart. Daarom verdient het aanbeveling om deze vraag breder te trekken voor de toekomstige toxicologische beoordeling van onder andere stoffen, food, farma et cetera, en aan te geven dat er binnen REACH vooral 'non-testing' methoden, verfijning en vermindering en blootstellingsargumenten zullen worden toegepast. De stand van de wetenschap is in deze CMRS velden de belangrijkste bottleneck om tot betrouwbare implementatie te komen van alternatieve methoden. In andere gevallen, zoals bij het beperken van een verplichte OECD twee-generatiestudie binnen het reproductietoxicologisch onderzoek tot een verplichte één-generatiestudie, speelt echter bestuurlijk conservatisme een

belangrijke rol bij de vermindering van het proefdiergebruik. Het feit dat de oude testwijze goed functioneert, resulteert in conservatief gedrag, ook al blijkt uit nader onderzoek dat de twee-generatiestudie, die veel meer proefdieren kost, niet of nauwelijks meer informatie oplevert dan een één-generatiestudie met ratten. Dit bestuurlijk conservatisme kan een tweede belangrijke bottleneck zijn bij de introductie van alternatieven voor dierproeven. Door middel van transparante processen en 'capacity building' (opbouw van vaardigheden en competenties, onder andere middels bijscholing) moet gewerkt worden om dit op te lossen. Dit laatste staat ook als aanbeveling in de Programmeringsstudie van het NKCA.

De derde belangrijke bottleneck is dat de meeste alternatieven voor dierproeven ontwikkeld zijn vanuit een wetenschappelijke bottom-up procedure waarbij een wetenschappelijke proef verder is doorontwikkeld richting een testprotocol. Op deze wijze zijn in sommige gebieden veel testprotocollen ontwikkeld, en in andere toxicologische velden vrijwel geen. Het 'aanbod' van protocollen was niet of nauwelijks afgestemd met de 'vraag'. Die 'vraag' zou bepaald moeten zijn door de omvang en de aard van het proefdiergebruik. In de praktijk hebben wij echter kunnen zien dat vooral in velden waar testen relatief simpel waren, en betrekking hadden op lokale toxiciteit zoals irritatie, er relatief veel verschillende alternatieven zijn ontwikkeld. Voor de systemische toxiciteitseffecten, zoals CMRS, die in potentie heel veel proefdieren kosten zijn er echter vrijwel geen alternatieven ontwikkeld. Het beter afstemmen van 'vraag' en 'aanbod' kan een grote verbetering teweeg brengen.

Ten slotte, toxiciteit van stoffen is niet één begrip, omdat er een breed scala van effecten mee bedoeld kan worden. De werkingsmechanismen die ten grondslag liggen aan verschillende effecten zijn erg verschillend. Sommige werkingsmechanismen zijn relatief simpel, terwijl andere uitermate complex zijn. Voor bepaalde effecten zijn betrouwbare alternatieve testmethoden inmiddels al beschikbaar, terwijl voor bepaalde effecten de ontwikkeling nog wel een decennium of langer kan duren. In het wetenschappelijke, maatschappelijke en politieke debat, worden argumenten vaak door elkaar gehaald en versmalt de discussie over de alternatieven voor dierproeven vaak in een debat tussen voorstanders en tegenstanders. Vanuit wetenschappelijk opzicht zou de discussie echter genuanceerder gevoerd moeten worden, omdat sommige toxicologische eindpunten nu of in de nabije toekomst geschikt zullen zijn om getest te worden op basis van vervanging, terwijl op andere velden alleen vermindering of verfijning aan de orde is. Verfijning en vermindering zijn ook belangrijke mijlpalen in het 3V-beleid, en juist op deze gebieden zijn de afgelopen jaren ook veel positieve wetenschappelijke resultaten geboekt. Carcinogeniteit, mutageniteit, reproductietoxiciteit en sensibilisatie en directe immunotoxiciteit zijn het resultaat van complexe processen waarbij vele genen, eiwitten, cellen en zelfs verschillende organen betrokken zijn. De kans dat uiteindelijk één test voor carcinogeniteit vervangen kan worden door één of twee *in vitro* testen is nihil, terwijl dit wel in redelijke mate kan voor lokale huid- of oogirritatie. Het concept van 'één proefdierproef vervangen door één alternatief' zal in veel gevallen dus niet werken, en dat concept moet dus losgelaten worden voor de complexe toxicologische eindpunten. 'Integrated Testing Systems' en 'Integrated Testing' zullen daarvoor in de plaats komen. Deze ontwikkeling moet echter geen excuus worden in gebieden waar het 'één op één' vervangingsconcept kan werken. Implementatie daar waar het mogelijk is moet worden bevorderd, omdat dit een grote stimulans kan geven aan onderzoek naar bruikbare methoden en strategieën om dierproeven te beperken.

Literatuurlijst

Bessems JGM (2009). Opinion on the usefulness of in vitro data for human risk assessment. Suggestions for better use of non-testing approaches. RIVM Briefrapport 320016002.

Bottini AA, Alepee N, Phillips B, Gribaldo L, De Silva O, Hartung T, Hendriksen C, Kuil J, Pazos P, Rhein C, Schiffelers MJ, Stokes W, Theobald A, Vidal JM, Van de Sandt H, Breier S, Sintes JR and Blaauboer B (2008). Optimisation of the post-validation process: the report and recommendations of ECVAM Workshop 67. *Altern Lab Anim*, 36 (3): 353-366.

Hernandez LG, van Benthem J, Luijten M and van Steeg H (2008). Implications of not detecting non-genotoxic carcinogens in the absence of carcinogenicity tests under REACH guidelines. RIVM Rapport 340700003.

Kinsner-Ovaskainen A, Akkan Z, Casati S, Coecke S, Corvi R, Dal Negro G, De Bruijn J, De Silva O, Gribaldo L, Griesinger C, Jaworska J, Kreysa J, Maxwell G, McNamee P, Price A, Prieto P, Schubert R, Tosti L, Worth A and Zuang V (2009). Overcoming barriers to validation of non-animal partial replacement methods/Integrated Testing Strategies: the report of an EPAA-ECVAM workshop. *Altern Lab Anim*, 37(4): 437-444.

van Benthem J (2007). The effect of REACH implementation on genotoxicity and carcinogenicity testing. RIVM Rapport 601200008.

Erkenningen

Veel dank voor de zeer waardevolle bijdragen van Arnoud Akkermans, Jan van Benthem, Jos Bessems, Betty Hakkert, Jan-Willem van der Laan, Wim Mennes, Aldert Piersma en Lianne de Wit.

Bijlage 1. De tijdsas van REACH

Voor Phase-in stoffen is aangegeven, op welk moment (afhankelijk van het productievolume) ze moeten zijn geregistreerd en hoe uitgebreid het registratiedocument moet zijn. Stoffen waarvan een CMR (carcinogeen, mutageen of reproductietoxisch) effect bekend is, moeten ook bij laag productievolume (in 2010) en met een uitgebreid document geregistreerd worden. Indien na registratie blijkt dat van een stof nog testgegevens ontbreken, moet voor de eindpunten die veel dierproeven vergen eerst 'testing proposals' ingediend te worden die pas na goedkeuring door de lidstaten en ECHA mogen worden uitgevoerd. De recent (november 2010) door de OECD Joint Meeting geaccepteerde EOGRT kan dus nog veel proefdierbesparing opleveren. Er is overigens erg veel discussie over het aantal proefdieren dat nodig is voor het uitvoeren van deze 'testing proposals'. Begin 2011 zal ECHA het overzicht hebben hoeveel dieren hiervoor werkelijk nodig zouden zijn.

Alternatieven krijgen pas op latere datum een belangrijke rol. Voor non-phase-in stoffen geldt dat alternatieven daarbij waarschijnlijk een veel grotere rol zullen spelen. De noodzaak om voortvarend *in vitro* alternatieven te ontwikkelen/valideren/implementeren geldt voor andere kaders dan REACH in gelijke, of grotere mate.

Tabel B1. Tijdsas van registratie, aantal stoffen en informatievereisten, afhankelijk van het productievolume.

Productievolume	> 1000 ton/jaar >100 ton/jaar* >1 ton/jaar**	>100 ton/jaar	>1 ton/jaar
Registratie datum	30-11-2010	31-05-2013	31-05-2018
Aantal stoffen ter beoordeling	Circa 4.700***	Circa 5.000	Circa 10.000
Informatievereisten	uitgebreid	beperkt	zeer beperkt

*indien zeer toxisch voor het aquatisch milieu, **CMR, ***Op 30 november 2010 stond de teller op 3.662 geregistreerde stoffen.

Bijlage 2. Het PARARE-initiatief

In oktober 2010 uitte het Europees Parlement haar bezorgdheid over de EU-procedures voor validatie en acceptatie van alternatieve testmethoden, in termen als 'ontoereikende voorschriften voor een efficiënte voorlopige analyse van de relevantie in termen van regelgeving' voorafgaand aan validatie, en 'vertragingen veroorzaakt door niet-transparante, trage, omslachtige, en deels inadequate procedures met betrekking tot de wettelijke erkenning van gevalideerde alternatieve methoden voor dierproeven'.

Om het proces van validatie op wezenlijke punten aan te passen nam de Europese Commissie het 'Preliminary Analysis of REgulatory Relevance' (PARERE)-initiatief. Introductie van 'preliminaire analyse van regelgevende relevantie' moet ervoor zorgen dat wetenschappelijke validatie zich richt op testmethoden die de meeste kans hebben om geschikt te zijn voor helder geïdentificeerde doelen binnen de regelgeving, om daarmee het validatieproces te stroomlijnen en te versnellen.

Kernpunt is dat tot op heden het vaststellen van de relevantie ten aanzien van regelgeving ontbrak bij ECVAM. Deze omissie is hiermee hopelijk opgelost. Het draagt bij aan prioriteitsstelling voor validatie; prioriteitsstelling bij ECVAM was tot nu toe niet zichtbaar. Het PARERE-proces gaat vooraf aan validatie en is preliminair, want nog op basis van beperkte informatie. Pas na wetenschappelijke validatie volgt formele acceptatie door de regelgevende instanties. In de periode waarin de wetenschappelijke validatie wordt uitgevoerd, kan acceptatie door de regelgevende instanties worden voorbereid.

De nationaal coördinatoren van de OECD zijn de meest aangewezen personen om in PARERE zitting te nemen, omdat zij dit type werk binnen OECD al deden en voor Nederland is dit ook het geval.

Bijlage 3. De modulaire benadering van validatie

Door ECVAM is een raamwerk voorgesteld voor het identificeren van studies die nodig zijn om de validatiestatus van een testmethode vast te stellen (Hartung et al., 2004). Dit raamwerk wordt hier weergegeven, omdat dit een overzichtelijke weergave is van stappen in het validatieproces. Andere benaderingen zijn mogelijk. In deze benadering wordt de informatie die nodig is om de validiteit van een testmethode te ondersteunen gestructureerd in modules. Volgens dit voorstel zou elk van deze informatiemodules beschikbaar moeten zijn, maar hoeven ze niet op een lineaire/opeenvolgende manier voltooid te worden.

1. Testdefinitie (inclusief doel, noodzaak en wetenschappelijke basis)
2. Intra-laboratorium reproduceerbaarheid
3. Inter-laboratorium overdraagbaarheid
4. Inter-laboratorium reproduceerbaarheid
5. Voorspellende capaciteit (nauwkeurigheid)
6. Toepassingsgebied
7. Prestatiestandaarden

De modules 2 t/m 4 worden vormen samen de betrouwbaarheid, terwijl de modules 5 en 6 samen de relevantie vormen. Bij alternatieve testen is de relevantie een cruciale kwestie. Validatie is het proces waarbij betrouwbaarheid en relevantie van een test worden vastgesteld voor een bepaald doel. De veronderstelling van dit systeem is dat de zeven modules, op een volgens de 'validation management group' adequate manier, worden ingevuld voordat de test het traject van onafhankelijke 'peer review' in gaat. Deze benadering blijkt in de praktijk echter op grote problemen te stuiten.

Wanneer het toepassingsgebied van een testsysteem voldoende is gedefinieerd kan het protocol worden doorgestuurd naar internationale organisaties zoals de OECD, voor formele wereldwijde acceptatie als testrichtlijn. Deze procedure neemt meestal een paar jaar in beslag vanwege het zorgvuldige review proces, de input van nationale experts over de hele wereld en de noodzaak om consensus te bereiken vanwege de OECD-structuur.

Opnieuw wordt opgemerkt dat deze modulaire structuur niet wezenlijk afwijkt van OECD GD34, hoogstens kan gezegd worden dat de modulaire structuur de verschillende stappen iets meer in een logische context plaatst.

Ook de EPAA onderschrijft dat validatie niet noodzakelijkerwijs via ECVAM moet verlopen. Daarnaast noemt de EPAA, OECD GD34 leidend.

Afkortingenlijst

ASAT	Assuring Safety without Animal Testing
BMT	Centrum voor Biologische geneesmiddelen en Medische Technologie (RIVM)
CBG	College ter Beoordeling van Geneesmiddelen
CCMO	Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CMRS	Carcinogeniteit, Mutageniteit, Reproductietoxiciteit en Sensibilisatie
Colipa	European Cosmetics Association
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products (huidige naam CHMP)
CPSC	Consumer Product Safety Commission
CTD	Common Technical Dossier
DoA	US Department of Agriculture
DoE	US Department of Energy
ECBS	Expert Committee on Biological Standardization
ECHA	European Chemicals Agency
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines
EFD	embryo-fetal developmental study
EFSA	European Food Safety Authority
EMA	European Medicines Agency
EOGRT	extended one-generation reproduction toxicity
EPA	US Environmental Protection Agency
EPAA	European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing
ERAP	European Regulatory Advisory Panel
ESAC	ECVAM Scientific Advisory Committee

EU	Europese Unie
FCM	Food Contact Materials
FDA	US Food and Drug Administration
GMP	good manufacturing process
ICCVAM	US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IPCS	International Programme on Chemical Safety
ITS	Integrated Testing Strategies
JaCVAM	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods
METC	Medisch-ethische Toetsingscommissie
NCI	US National Cancer Institute
NICEATM	NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
NIEHS	US National Institute of Environmental Health Sciences
NIH	US National Institutes of Health
NIHCGC	NIH Chemical Genomics Center
NIOSH	US National Institute for Occupational Safety and Health
NLM	US National Library of Medicine
NTP	US National Toxicology Program
NVI	Nederlands Vaccin Instituut
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OESO	Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling
PARERE	Preliminary Analysis of REgulatory Relevance
PBTG	Performance-based Test Guideline
PPND	pre- and postnatal developmental study
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals

RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
SIAM	SIDS Initial Assessment Meeting
SIDS	Screening Information Data Set
SIEF	Substance Information Exchange Forum
TC NES/C&L	Technical Committee on New and Existing Substances/Classification and Labeling
TTC	Threshold of Toxicological Concern
WHO	World Health Organization

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl