



Menschen für Tierrechte
Bundesverband der Tierversuchsgegner e.V.

Menschen für Tierrechte • Roermonder Straße 4a • 52072 Aachen

Versuchstier des Jahres 2015: Das Kaninchen



Foto: Ruth Rudolph, pixelio.de

Einführung

Seit 2003 ernennt der Bundesverband Menschen für Tierrechte das „Versuchstier des Jahres“. Diese jährliche Ernennung holt eine Tierart aus der Anonymität des Labors, macht die Versuche an diesen Tieren öffentlich, deckt Störfaktoren bei der Entwicklung

Geschäftsstelle Menschen für Tierrechte – Bundesverband der Tierversuchsgegner e.V.:

Roermonder Straße 4a
52072 Aachen
Internet: www.tierrechte.de

Fon 0241-157214
Fax 0241-155642
eMail: info@tierrechte.de

Postbank Köln
BLZ 370 100 50
KTO 100 505

Als gemeinnützig und
besonders förderungs-
würdig anerkannt

Mitglied bei ›European Coalition To End Animal Experiments‹,
›European Coalition for Farm Animals‹, ›The European
Network to END the keeping of Wild Animals in CAPtivity‹

tierversuchsfreier Verfahren auf und fordert deren Beseitigung ein. Insgesamt soll das Versuchstier des Jahres dabei helfen, die Abschaffung der Tierversuche so schnell wie möglich zu erreichen.

„Versuchskaninchen“ sind in unserer Gesellschaft bestens bekannt, wir haben ihnen sogar in unserer Umgangssprache einen festen Platz eingeräumt. Wir verwenden das Wort gerne im übertragenen Sinne, um risikoreiche und ethisch verwerfliche Nutzungen von Menschen und Tieren zu charakterisieren.

Jedes Jahr leiden und sterben über 95.000 Kaninchen im Labor. Das ist besonders verwerflich, weil in den letzten Jahren für verschiedene Bereiche tierversuchsfreie Verfahren praxisreif entwickelt wurden, so dass die Experimente an Kaninchen deutlich abnehmen müssten. Das ist aber nicht der Fall. Woran liegt es also, dass die Kaninchenzahlen nicht signifikant rückläufig sind? Mit dem „Versuchstier des Jahrs 2015“ legen wir genau hier den Finger in die Wunde.

Kurzportrait Kaninchen

Kaninchen in der Natur

Kaninchen leben von Natur aus in Gruppen mit enger sozialer Bindung. Die Gruppen bestehen aus einigen erwachsenen Weibchen, einem Bock und den Nachkommen bis zu deren Geschlechtsreife. In der Natur beträgt das Territorium einer Wildkaninchen-Kolonie



Foto: Animal-Plant, Fotolia.com

ca. 20 Hektar (nach durchschnittlichen Maßen ca. 28 Fußballfelder). Die Tiere graben ausgedehnte unterirdische Bauten mit weit verzweigten Röhrensystemen. Sie entwickeln eine stabile Rangordnung. Gruppenaktivitäten und Sozialkontakte, wie gemeinsames

Graben, gemeinsames Weiden, gegenseitige Körperpflege und Ruhen mit Körperkontakt nehmen einen großen Teil des Tages ein. Kaninchen liegen gern auf einem erhöhten Platz mit guter Übersicht, der von oben geschützt ist. Mehrstündige Ruhephasen wechseln sich mit Aktivitätsphasen, vor allem in der Dämmerung, ab.

Naht bei einem trächtigen Weibchen die Geburt, gräbt sie eine Neströhre in den Erdboden und polstert sie mit trockenem Gras und mit Haaren aus, die sich hormonell bedingt an ihrer Brust und den Flanken lockern und die sie sich ausrupft. Es werden etwa fünf bis zwölf Junge geboren, die als Nesthocker unbehaart und blind sind. Die Mutter sucht die Neströhre in der Regel nur einmal am Tag auf, säugt die Jungen und scharrt das Nest anschließend wieder mit Erde zu. Mit knapp drei Wochen verlassen die Jungen – vorerst nur kurz – die Neströhre; von Tag zu Tag vergrößert sich ihr Aktionsradius. Mit etwa 27 bis 30 Tagen haben sie das Entwöhnungsalter erreicht.



Foto: Animal_Planet, Fotolia.com

Kaninchen verbringen täglich mehrere Stunden mit der Futterraufnahme. Sie fressen Gras und Kräuter und benagen Äste und Wurzeln.



Häufiger Mitbewohner in Kinderzimmern: Junges Zwergkaninchen.

Foto: Petra Hegewald, Pixelio

Kaninchen im Labor

Die sehr geselligen Tiere werden in der Regel einzeln in kleinen Käfigen mit perforierten Böden ohne Einstreu gehalten, um die Reinigung möglichst einfach zu machen. Die Tiere leiden, weil sie ihren Grundbedürfnissen in den Käfigen nicht nachgehen können. Hierzu zählen: mehrere Hoppelsprünge hintereinander, Graben und Scharren und Leben in einer sozialen Gruppe. Die Folge sind Langeweile und Einsamkeit. Außerdem erhalten die Tiere wenig artgerechtes Standardfutter (energiereiche Pellets), das viel zu rasch aufgenommen wird und zu Verdauungsproblemen führen kann. Es entspricht nicht dem natürlichen Futter, das grob strukturiert ist und über Stunden aufgenommen wird.

Die europäische Tierversuchsrichtlinie 2010/63/EU legt für Kaninchen ab der 10. Lebenswoche einen Lebensraum in Käfigen oder Buchten fest. Die Grundfläche beträgt je nach Gewicht der Kaninchen 3.500 cm² (70 x 50 cm, das klassische Poster-Kunstdruckformat), 4.200 cm² (60 x 70 cm) oder 5.400 cm² (70 x 80 cm, die Größe einer Babywickelauflage). Falls die Tiere in Gruppen gehalten werden, erhält das siebte Kaninchen noch 2.500 cm²

Bodenfläche. Die Mindesthöhe der Käfige beträgt bei Tieren bis zu einem Gewicht von 5 kg 45 cm, bei schwereren Tieren 60 cm.

Welche Kaninchenrassen werden eingesetzt?

Es werden hauptsächlich „weiße Neuseeländer“, aber auch kleine oder mittelgroße Rassen wie „Chinchilla-Kaninchen“ (z.B. in Berlin), „rote Neuseeländer“, „Holländer-Kaninchen“ eingesetzt.



Weißer Neuseeländer-Kaninchen.

Foto: anilbolukbas, iStockPhoto

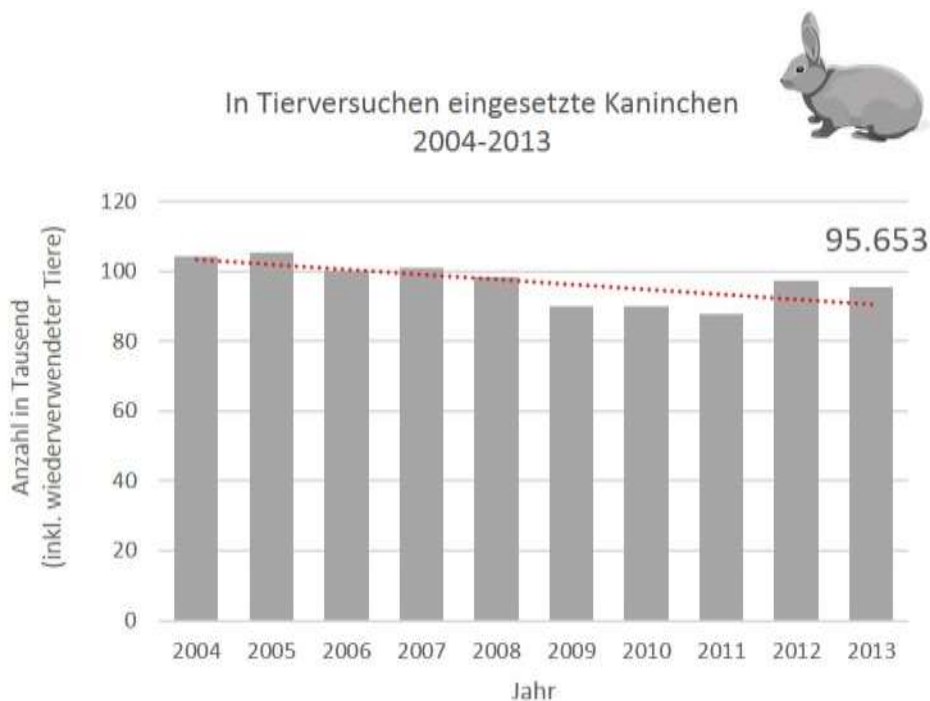
In welchen Bereichen werden Kaninchenversuche durchgeführt?

Kaninchen werden in der reinen Grundlagenforschung, die nur dem Erkenntnisgewinn dienen soll, eingesetzt. Sie sind aber auch in der sogenannten translationalen Forschung zu finden, wenn es darum geht, Erkenntnisse der Grundlagenforschung und der präklinischen Forschung zu prüfen, ob diese Erkenntnisse für die klinische Forschung (am Menschen) Bedeutung haben könnten. Kaninchen werden auch in der angewandten Forschung benutzt, um beispielsweise Therapien (z.B. Medikamente mit neuen Wirkmechanismen) zu entwickeln.

Die Versuchstierstatistik

Kaninchen stehen in der Versuchstierstatistik des Bundes an vierter Stelle nach Mäusen, Ratten und Fischen. Die jüngsten Zahlen stammen aus 2013 (1).

Die meisten Kaninchen werden aber für die Herstellung von Antikörpern und die Testung von Medikamenten und Chemikalien eingesetzt. Traurige Berühmtheit erreichte der Draizé-Test, der seit Jahrzehnten an den Augen lebender Kaninchen durchgeführt wird.



Entwicklung der Kaninchenverbrauchszahlen im Tierversuch in den letzten 10 Jahren.

Bei langjähriger Sicht schwanken die Zahlen der Kaninchen im Tierversuch (siehe Grafik Statistik) und nehmen dabei tendenziell leicht ab. Ein Abwärtstrend oder gar ein signifikanter Rückgang ist aber bisher nicht erkennbar. Laut Tierversuchstatistik des Bundes 2013 wurden 95.653 Kaninchen benutzt, das waren circa 1,6 % weniger Tiere als 2012.

2014: Tierversuche werden transparenter

Seit November 2014 gibt es eine öffentlich zugängliche Datenbank. Diese beinhaltet alle Tierversuchsprojekte, die von den Behörden genehmigt wurden. Spätestens 15 Monate nach

der Genehmigungserteilung werden Zusammenfassungen der Versuche in einer leicht verständlichen Sprache und anonymisiert vom Bundesinstitut für Risikobewertung auf der Website <http://www.animaltestinfo.de> für fünf Jahre eingestellt. Diese Veröffentlichungspflicht setzten Europas Tierversuchsgegner durch. Sie wird durch die EU-Tierversuchsrichtlinie 63/EU63/291 rechtlich bindend festgeschrieben und muss durch die Mitgliedstaaten erfolgen. Aber diese Datenbank enthält nur die Hälfte der Tierversuche. Tierversuche, die aufgrund rechtlicher Vorschriften (z.B. Arzneibuch) oder nach erprobten Verfahren erfolgen (Impfstoffe/Serenherstellung) und Ausbildungszwecken dienen, sind nicht einstellungspflichtig. Dennoch bringt diese Datenbank Transparenz: Hier wird ausgewiesen, dass seit Ende 2014 16 Tierversuchsprojekte mit knapp 3.000 Kaninchen eingestellt wurden, die der Grundlagenforschung sowie der translationalen und angewandten Forschung zuzuordnen sind.

Verwendung der Kaninchen in der Medizin

Die Bundes-Versuchstierstatistik führt den Einsatz der Kaninchen nach unterschiedlichen Paragraphen des Tierschutzgesetzes an. Daraus ergibt sich:

86 % werden für die Herstellung, Gewinnung, Aufbewahrung oder Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen verbraucht (§ 10a Tierschutzgesetz, alte Fassung, jetzt § 8 a Absatz 1 Nr. 3 Tierschutzgesetz neue Fassung).

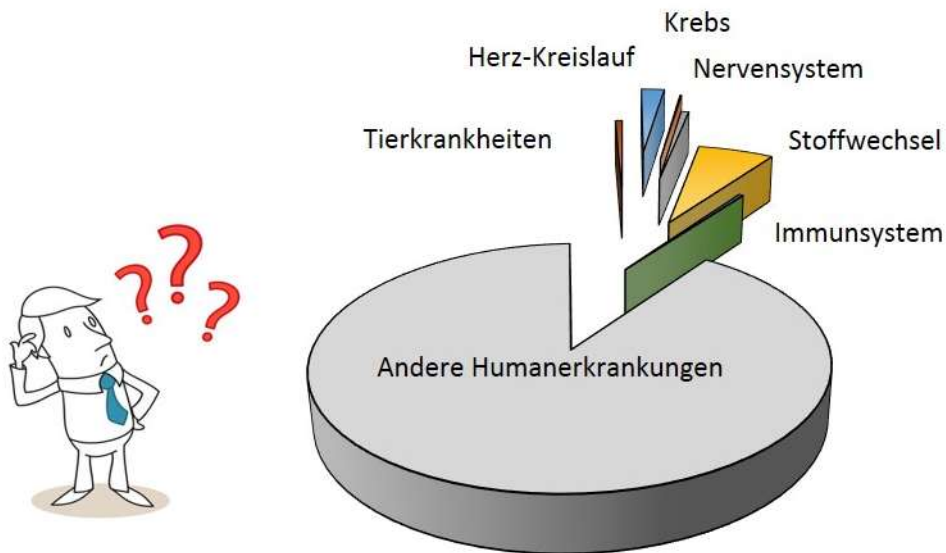
11 % wurden in Versuchen mit Betäubung und Wiedererwachen verwendet,

1,4 % wurden in Versuchen ohne Betäubung verwendet

1,6 % der Kaninchen wurden zu wissenschaftlichen Zwecken, zur Entnahme von Geweben und Organen sowie zu Aus-, Fort- und Weiterbildungszwecken benutzt.



Einsatz von 95 Prozent der Kaninchen zur Erforschung von Erkrankungen



95 % der Kaninchen dienen auf die eine oder andere Weise zur Erforschung menschlicher Erkrankungen. Im Gegensatz dazu wurden nur 0,5 % der Kaninchen zur Erforschung von Tierkrankheiten verwendet. Die Kategorie „andere Humanerkrankungen“ in der Grafik bezieht sich im Wesentlichen auf § 10a TierSchG (Herstellung, Gewinnung, Aufbewahrung oder Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen), also die Impfstoff- und Serenentwicklung.

Prüfung der Medizinprodukte an Kaninchen

Die Tierversuchstatistik des Bundes zeigt für das Jahr 2013, dass die Hälfte der Kaninchen (44.457 oder 47 %) zur Herstellung und Qualitätskontrolle von „Produkten“ oder „Geräten“ für die Humanmedizin oder Zahnmedizin benutzt wurden. Dies geschieht auf der Grundlage der EG-Rechtsvorschriften einschließlich der Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs (Pharmakopöe). Als „Produkt“ gelten gemäß Medizinproduktegesetz auch Transplantate, Gewebe oder Zellen von Mensch und Tier. Produkte, die „einen Stoff/eine Stoffzubereitung enthalten, die bei gesonderter Verwendung als Arzneimittel angesehen werden können“, zählen auch dazu.

Nicht zu den Medizinprodukten gehören Arzneimittel nach § 2 Arzneimittelgesetz. Die Entscheidung darüber, ob ein Produkt ein Arzneimittel oder ein Medizinprodukt ist, erfolgt „insbesondere unter Berücksichtigung der hauptsächlichen Wirkungsweise des Produkts“ (§ 2 Medizinproduktegesetz).

Verwendung von Kaninchen in der Toxikologie

In der *Toxikologie* (Chemische Industrie oder Arzneimittel) wurden 2,34 % der Tiere verbraucht. Diese Versuche werden insbesondere für Chemikalien, Arzneimittel, medizinische Produkte und Geräte durchgeführt und zwar nach speziellen Prüfrichtlinien, die zudem rechtsverbindlich sind.

Mehr als die Hälfte der Tiere wurden für Prüfungen (sogenannte toxikologische Sicherheitsprüfungen) für medizinische Produkte und Geräte eingesetzt. Die Prüfbestimmungen schreiben vor, dass die Tests auch an einer Nicht-Nager-Spezies vorgenommen werden müssen. Hier hat sich das Kaninchen als Nicht-Nagetier leider zum Tier der Wahl entwickelt. Die Kaninchen wurden in folgenden toxikologischen Tests eingesetzt: 633 Kaninchen wurden benutzt, umentwicklungsschädigende Eigenschaften der Substanzen auf die Nachkommen festzustellen, 724 Tiere zur Feststellung schädigender Wirkungen auf das männliche und weibliche Fortpflanzungssystem. Der sogenannte Hautreizungstest wurde an 274, der Augenreizungstest an 255 Kaninchen durchgeführt.

Auch für toxikologische Prüfungen von Stoffen und Produkten, die in der Landwirtschaft eingesetzt werden, starben im Jahr 2013 Kaninchen. Genau 660 Tiere wurden für Pestizid-/Herbizidtests mit einer nicht-Nager-Spezies verwendet.



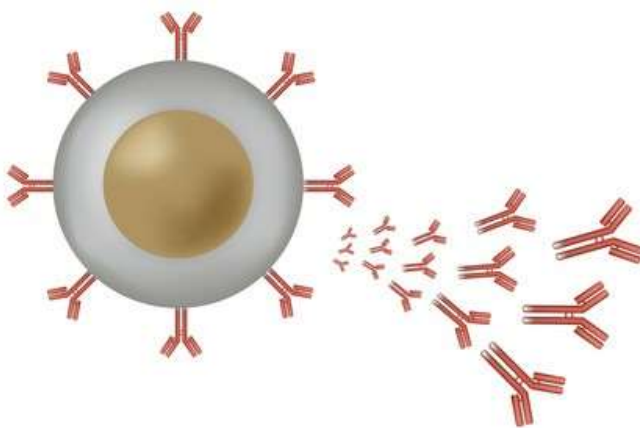
Foto: Vielfalt. Fotolia.com

Spezielle Tierversuche am Kaninchen

1. Kaninchenverbrauch zur Herstellung, Gewinnung, Aufbewahrung oder Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen (§ 10a TierSchG in der alten Fassung, jetzt § 8a Absatz 1 Nr. 3 Tierschutzgesetz neue Fassung)

Hierunter verbirgt sich insbesondere die Verwendung der Kaninchen zur Herstellung von Antikörpern und Immunsereen. Es handelt sich hierbei gemäß Tierschutzgesetz um anzeigepflichtige, aber nicht genehmigungspflichtige Tierversuche, die nach erprobten und etablierten Verfahren durchgeführt werden. Diese Versuche dienen nicht dem Erkenntnisgewinn, sondern ausschließlich der Gebrauchsherstellung. Sobald die Herstellung mit einem vorsätzlichen Erkenntnisgewinn verknüpft ist, handelt es sich jedoch um einen genehmigungspflichtigen Tierversuch (wie im Tierschutzgesetz in § 7 und § 8 angeführt) (2). Tatsächlich wurden laut Statistik 12,7 % der Kaninchen für genehmigungspflichtige Tierversuche eingesetzt.

Der Großteil, nämlich 86 % aller Tiere dienen der sogenannten Herstellung von Antikörpern (82.218 Kaninchen). Die Antikörper werden überwiegend nicht für den Verkauf oder die Weitergabe hergestellt, sondern für die Verwendung im eigenen Haus, um ein neues Produkt zu entwickeln, z.B. einen therapeutischen Antikörper. Therapeutische Antikörper werden derzeit für eine Vielzahl von Anwendungsgebieten entwickelt, z.B. zur Behandlung von Krebserkrankungen (3). Werden Antikörper produziert, um überwiegend an Dritte verkauft oder weitergegeben zu werden, so dürfen z.B. monoklonale Antikörper (siehe unter 1.1) nicht mehr in Tieren hergestellt werden (2).



Schema: Ein B-Lymphozyt produziert Antikörper.

Foto: Extender_01 Fotolia.com

1.1. Herstellung monoklonaler Antikörper im Tier

Sie werden bislang noch immer im Kaninchen oder in der Maus hergestellt. Die Antikörper sind sehr spezifisch und richten sich gegen ein einzelnes Epitop (= Bindungsstelle genau des Moleküls, gegen das immunisiert worden ist). Bei der Herstellung wird zunächst dem Tier ein Antigen injiziert. Spezielle Leukozyten des Kaninchens, die B-Lymphozyten, entwickeln den spezifischen Antikörper und bauen somit ein immunologisches Gedächtnis auf. Nach circa drei Wochen werden die Tiere erneut immunisiert, um das Immungedächtnis zu aktivieren und die Antikörperproduktion zu steigern (Booster-Effekt). Hiernach werden die Tiere getötet, um die Antikörper produzierenden Zellen in der Milz zu entnehmen.

Um die Zellen nun unbegrenzt zur Teilung zu bringen, werden sie mit Tumorzellen eines Lymphoms fusioniert, dadurch entsteht ein sogenanntes Hybridom. Der gewünschte Antikörper wird mit einem speziellen Trennverfahren (Affinitätschromatographie) herausgefiltert. Anschließend können die Antikörper weiter bearbeitet werden. Da es durch im Tier hergestellte Antikörper im Menschen früher zu Abwehrreaktionen (Humane-Anti-Maus-Antikörper-Antworten, kurz HAMA-Antworten) gekommen war, entwickelten Forscher Möglichkeiten, die Antikörper gentechnisch *in vitro* nachzubearbeiten (4). Bei der sogenannten Humanisierung können auch entsprechend gentechnisch veränderte Tiere, die ein humanes Immunsystem ausprägen, zur Antikörperproduktion eingesetzt werden (5).

1.2. Herstellung polyklonaler Antikörper im Tier

Bei der Herstellung polyklonaler Antikörper werden die Kaninchen ebenfalls wie für monoklonale Antikörper unter 1.1 beschrieben immunisiert. Den Kaninchen wird bei dieser Prozedur zunächst mehrfach das Antigen, gegen das die Antikörper gebildet werden sollen, gespritzt. Der Erfolg der Antikörperproduktion wird durch mehrmalige Blutentnahmen verfolgt. Sechs bis acht Wochen nach der ersten Antigen-Injektion können die ersten Antikörper gewonnen werden. Bei der Herstellung wird eine Mischpopulation verschiedener Antikörpertypen erzeugt. Nach Aufreinigung des Serums spricht man von polyklonalen Antikörpern. Auch hier werden die Kaninchen am Ende für eine maximale Ausbeute an Antikörpern getötet.

Polyklonale Antikörper sind Nachkommen vieler Immunzellen (B-Zellen). Sie können sich an unterschiedlichen Oberflächenstrukturen (Epitope) des Antigens binden und es unschädlich machen. Dies wird in der Medizin genutzt, da die Oberflächenstrukturen auf einem Antigen nicht immer gleich ausgebildet und z.B. Viren sich zum Teil auch im Laufe einer Infektion verändern. Durch Verabreichung zuvor hergestellter Antikörper im Wege der passiven Immunisierung bleiben dadurch die Antikörper auch dann wirksam, wenn sich das Antigen leicht verändert (6). Aber auch als Laborreagenzien zur Analyse von Proteinen werden polyklonale Antikörper gebraucht. Unabhängig von der ethischen Fragwürdigkeit der Tiernutzung kann man diese Antikörper nur zeitlich begrenzt herstellen und die Qualität ändert sich mit der Zeit (7).

Hilfsstoffe (Adjuvanzien) erhöhen Antikörperproduktion und Tierleid

Sowohl bei der monoklonalen als auch bei der polyklonalen Antikörper-Herstellung ist die Verwendung eines Adjuvans (Hilfsstoff) für das Tier besonders belastend. Um die Antikörperproduktion im Organismus des Tieres zusätzlich zu stimulieren, wird der Antigenzubereitung oft das sogenannte Freund-Adjuvans zugesetzt, das die Immunreaktion des Versuchstiers verstärken soll. Durch Verursachung lokaler Gewebereizungen und -zerstörungen wird der Hilfsstoff als tierschutzrelevant eingestuft.

Man unterscheidet zwischen dem vollständigen und dem unvollständigen Freund-Adjuvans. Beim vollständigen wird das Immunsystem des Tieres durch Paraffinöl, Mannose-Monooleat als Emulgator und abgetöteten Mykobakterien geboostert. Das unvollständige Freund-Adjuvans hat alle diese Komponenten außer den Bakterien. Dadurch stimuliert es weniger stark (7). Die Anwendung des kompletten Freudschen Adjuvans wird als schwerbelastender Versuch eingestuft.

Am Ende der Nutzung werden die Tiere in Narkose durch Punktierung des Herzens entblutet.

2. Am Kaninchen wird noch immer auf fieberauslösende Partikel getestet

Fiebererzeugende Partikel können schon während des Herstellungsprozesses eines medizinischen Produkts anfallen. Der Test auf fieberauslösende Partikel am Kaninchen läuft

folgendermaßen ab: Drei Kaninchen erhalten die Testsubstanz in die Ohrvene injiziert und werden dann in einem kleinen Kasten bewegungsunfähig fixiert. Rektal befindet sich ein Fieberthermometer, das kontinuierlich die Temperatur der Tiere misst. So müssen die Kaninchen für mehrere Stunden ausharren (8). Sie werden in weiteren Tests immer wieder verwendet.



Weißer Neuseeländer in Pyrogentest-Kästen.
Foto: One Voice

Von der Validierungspflicht zur Anwendungspflicht

Im Oktober 2010 ist der In-vitro-Pyrogentest als *Monozyten-Aktivierungstest* (MAT) in das europäische Arzneimittelbuch aufgenommen worden. Ab diesem Zeitpunkt sind die Hersteller gehalten, den neuen Test in ihrem Haus einzuführen und als Testmethode zu nutzen. Hierzu muss die zuverlässige und reproduzierbare Aussage des Tests an den Produkten des Hauses nachgewiesen werden (Validierung). Nach erfolgreicher Validierung sind die Produkthersteller verpflichtet, den MAT anzuwenden. Rechtsgrundlage dafür ist Kapitel 2.6.30 des europäischen Arzneimittelbuchs (9). (*“The MAT is suitable, after a product-specific validation, as a replacement for the rabbit pyrogen test”*).

Gleichzeitig gibt es im europäischen Arzneibuch noch unter Kapitel 2.6.8 die In-vivo-Prüfung auf Pyrogene für den Fall, dass ein Produkt noch nicht für das In-vitro-Verfahren validiert worden ist.

Verschiedene Testsysteme sind mittlerweile für den MAT etabliert worden. Als Quelle für Monozyten für den Test können Vollblut, Kryoblut, PBMCs (peripheral blood mononuclear

cells), Monozyten-Zelllinien oder eine humane Leukämie-Zelllinie verwendet werden. Fünf Varianten wurden vom Europäischen Zentrum für die Validierung alternativer Testmethoden (ECVAM) validiert und werden an Stelle des Kaninchentests anerkannt. Tatsächlich sind die Tests empfindlicher und können noch geringere Mengen an Fieber erzeugenden Partikeln als das Kaninchen erkennen (10).

Die European Medicines Agency (EMA) hat den MAT als In-vitro-Verfahren für den Test auf Pyrogene in Plasma enthaltenden Medizinprodukten zugelassen (11).


Monozyten-Aktivierungstest (MAT) bereitet Anwenderlaboren Schwierigkeiten

Nach Recherchen hatten einige Firmen, die den MAT in ihren Laboren anstelle des Kaninchenversuchs einführen wollten, ein Problem. Sie konnten die Validierung des MAT für ihre Produkte mit dem kommerziell verfügbaren Kryoblut nicht erfolgreich abschließen. Während die Validierung mit Frischblut einwandfrei funktioniert, bereitet das Kryoblut Schwierigkeiten. Es können aber nur wenige Einrichtungen wie z.B. das Paul-Ehrlich-Institut stets auf entsprechenden Frischblutmengen und entsprechend ausgebildetes medizinisches Personal zurückgreifen.

Die Validierung eines medizinischen Produkts wird von den zuständigen Behörden wie dem Paul-Ehrlich-Institut und dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte begleitet. Auch die United States Pharmacopeia und die Chinese Pharmacopeia arbeiten derzeit an der Aufnahme des MAT in ihre Rechtsvorschriften (MAT-Monographien).

Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (LAL) ist kein In-vitro-Pyrogentest

Bislang gibt es einige Hersteller, die auf den Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (LAL) aus der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses ausweichen, weil sie in ihm eine In-vitro-Alternative zum Kaninchentest sehen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Unabhängig vom Artenschutzaspekt – der Pfeilschwanzkrebs ist mittlerweile vom Aussterben bedroht – kann der LAL-Test nur Gram-negative Bakterien und Blaualgen nachweisen. Der In-vitro-Pyrogentest bzw.

 Monozyten-Aktivierungstest weist dagegen ein umfassendes Pyrogen-Spektrum vergleichbar dem des Kaninchens nach (12).

3. Der Kanincheneinsatz bei der Entwicklung medizinischer Produkte

Im Rahmen der Prüfung zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten müssen diese nach DIN EN ISO 10993-1 auf eine Vielzahl biologischer Effekte geprüft werden (13). Dabei spielt häufig wieder das Kaninchen eine Rolle. Medizinprodukte sind in drei Klassen eingeteilt. A) Medizinprodukte, die Kontakt mit Körperoberflächen haben. B) Medizinprodukte, die mit dem Körperinneren in Kontakt kommen. C) Medizinprodukte, die implantiert werden (z.B. Stents, künstliche Hüft- oder Kniegelenke, (14)). Je nach Kategorie müssen umfangreiche Tests durchgeführt werden. Zum Beispiel Tests auf akute systemische Toxizität, subchronische Toxizität (ISO 10993-11) oder Blutverträglichkeitsprüfungen (Hämokompatibilität) (13).

Alle Medizinprodukte der drei Kategorien müssen nach dieser Vorschrift auf Zytotoxizität, Hautsensibilisierung und Hautirritation getestet werden. Bei den Hauttests werden oft Kaninchen eingesetzt. Soll ein Medizinprodukt mit der Schleimhaut oder langfristig mit geschädigter Haut in Kontakt kommen, so muss das Produkt zudem auf subchronische Toxizität und Genotoxizität (Änderungen des genetischen Materials in den Körperzellen) getestet werden. Produkte, die dauerhaft mit dem Körperinneren in Kontakt kommen, wie z.B. Gewebe- oder Knochenersatz, müssen auf Entzündungs- bzw. Immunreaktionen auf den neuen Fremdkörper getestet werden. Bei solchen Produktentwicklungen und -prüfungen werden oft Kaninchen eingesetzt.

3.1 Beispiel: Das Kaninchen in der Aneurisma-Therapie-Forschung

Wenn ein Blutgefäß an einer Stelle erweitert ist, wird dies als Aneurisma bezeichnet. Diese Erweiterungen kommen gehäuft in Schlagadern (Arterien) vor. Spätestens seit den 90er Jahren setzt man das Kaninchen zur Untersuchung von Behandlungsmöglichkeiten bei Aneurismen von Gehirnarterien (sog. zerebrale Aneurismen) ein (15). Die Wandaussackungen der Hirnarterien passieren häufig an Aufgabelungsstellen des Gefäßes

(Bifurkationsaneurismus). Da dies zu Kopfschmerzen, Übelkeit, bis hin zu epileptischen Anfällen oder einem Hirninfarkt führen kann (16), suchen die Wissenschaftler nach Möglichkeiten, diese Aussackungen zu verschließen. Dies erfolgt z.B. durch den Einbau einer Verschlussvorrichtung. Um die Funktionalität dieser Technik zu studieren, wird im Kaninchen zunächst ein Aneurismus unter Vollnarkose künstlich erzeugt. Dabei kann es bereits zu einem Hirninfarkt, zu Lähmungen oder zu Wundinfektionen im Tier kommen. Auch der Verschluss des Aneurismas erfolgt unter Vollnarkose. Nach erfolgreicher Behandlung werden die Tiere geröntgt und untersucht. Nach Ablauf der Versuche sowie bei Komplikationen erfolgt deren Tötung (17).

3.2 Untersuchungen von Stents (Gefäßstützen) im Kaninchen

Durch arteriosklerotische Ablagerungen kann es zu einem Verschluss der Halsschlagader kommen. Dagegen werden häufig sogenannte Medikament-beschichtete Gefäßstützen (Stents) eingesetzt, um den betroffenen Gefäßabschnitt wieder zu öffnen und offen zu halten. Dies kann auf die Dauer jedoch zu einer Thrombose führen, weshalb Wissenschaftler versuchen, die Stentbeschichtungen zu optimieren.

Die Stents werden Kaninchen implantiert und die Tiere langfristig beobachtet, ob sie Gefäßveränderungen bzw. Thrombosen entwickeln. Nach Abschluss des Versuchs werden die Tiere getötet (17).

3.3 Implantateinbau zur schnelleren Heilung bei Knochenbruch

Hier setzen die Testdurchführenden Kaninchen ein, um z. B. zu untersuchen, ob zur Behandlung eines Knochenbruchs ein vollständig resorbierbares Implantat geeignet ist. Bei den Kaninchen wird unter Vollnarkose eine Oberschenkelfraktur erzeugt und das Implantat einoperiert. Wundschmerzen werden mit Schmerzmitteln behandelt. Am Ende werden die Tiere getötet und die Bruchheilung untersucht (z.B. Resorption des Implantats, Knochenwucherungen) (17).

Wundinfektionen: Wo kommen die Bakterien her?

Beim operativen Einbau von z.B. Knie- oder Hüftimplantaten in den menschlichen Körper kann es zu bakteriellen Wundinfektionen kommen, die den Austausch nötig machen. Deshalb forschen Wissenschaftler an neuen Beschichtungen von Implantaten und nutzen hierfür auch Kaninchen. Derartige, oft resistente, Bakterien sind potenziell auf jeden Menschen aus verschiedenen Quellen übertragbar. Menschen, die in der Landwirtschaft arbeiten oder Vielreisende gehören zu den Risikogruppen (18). Probleme mit Resistenzen wurden über viele Jahre einerseits durch die lasche Vergabe von Antibiotika in der Humanmedizin in Europa verursacht, aber mehr noch durch die kommerzielle Landwirtschaft verursacht. Ein ZEIT-Feature gibt einen guten Überblick über die Situation (19). Unlängst hat der BUND in neun von zehn Putenfleischproben resistente Erreger gefunden.

Dadurch resistent gewordene Keime gelangen über den Tiertransport und den Menschen selbst in die Umwelt und verbreiten sich überall, auch in Krankenhäusern über Besucher.

Es gibt nur noch einige Antibiotika als „Sicherheitsreserve“, die dem Menschen helfen können. Neun Länder drängen auf Verbot von Reserve-Antibiotika in Tiermast (20). Die Regierung hat das Arzneimittelgesetz überarbeitet, will den Gebrauch derartiger Reserveantibiotika in der Tiermast jedoch zunächst nicht völlig verbieten, sondern einschränken (21, 22). Eine internationale Lösung muss gefunden werden.

4. Das Kaninchen in der Toxikologie

Nach der REACH-Verordnung 440/2008, zuletzt geändert am 6. Juli 2012, ABl. L 193, werden in verschiedenen Tests Kaninchen zur Prüfung chemischer Substanzen eingesetzt.

4.1 Akute dermale Toxizitätstests

Diese Methode entspricht der OECD Testrichtlinie 402 (1987) bzw. der recht neuen Testrichtlinie 434, Fixed Dose Procedure (2004) mit nur einer Testkonzentration.

Bei dem Test werden vor Versuchsbeginn den Kaninchen das Fell auf dem Rücken durch Scheren oder Rasieren entfernt. Dabei wird mindestens 10 % der Körperoberfläche für die Applikation der Prüfsubstanz vorbereitet. Dann wird die Prüfsubstanz aufgetragen. Sie soll mit Hilfe eines Mullverbandes und eines nicht reizenden Pflasters mit der Haut 24 Stunden Kontakt haben. Die Versuchsfläche ist außerdem abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, dass die Tiere die Prüfsubstanz nicht ablecken

können. Der nachfolgende Beobachtungszeitraum beträgt mindestens 14 Tage. Beobachtet werden Veränderungen von Fell, behandelte Haut, Augen, Schleimhäuten, Atmung und Kreislauf. Außerdem wird beobachtet, ob es zu veränderten Reaktionen des Nervensystems oder der Skelettmuskeln kommt (z.B. Zittern, Krämpfe, vermehrter Speichelfluss, Durchfall, Schläfrigkeit, Koma). Der Zeitpunkt des Todes ist so genau wie möglich festzuhalten. Die während des Versuchs gestorbenen und die zum Abschluss des Versuchs getöteten Tiere werden seziiert (23).

4.2 Hautreizungs- und -verätzungstest erfolgt noch immer am Tier

Der Hautreizungs- und -verätzungstest am Tier wird von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) in der Prüfrichtlinie 404 aus dem Jahr 2002 vorgeschrieben (OECD TG 404, 2002) und ist bislang noch nicht abgeschafft. Immerhin gibt es eine Einschränkung: Diese In-vivo-Tests sollen erst dann durchgeführt werden, nachdem alle zur Verfügung stehenden einschlägigen Daten für das Hautverätzungs- bzw. -reizungspotenzial durch den betreffenden Stoff in einer kritischen Analyse ausgewertet worden sind; diese Daten schließen auch Ergebnisse aus in vitro-Methoden sowie die Auswertung der Literaturdaten ein.

Unter Hautreizung versteht man das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung, nachdem die Prüfsubstanz bis zu 4 Stunden auf die Haut einwirken konnte.

Die Hautverätzung ist eine irreversible, sichtbar bleibende Hautschädigung. Sie zerstört die obere Hautschicht (Epidermis) und reicht bis in die darunter gelegene Lederhaut (Corium). Die Prüfsubstanz soll bis maximal vier Stunden auf die Haut einwirken. Als Folge der Verätzungen kommt es zur Bildung von Geschwüren, zu Blutungen oder blutigen Verschorfungen. Am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen sind Hautverfärbungen und komplett haarlose Bereiche feststellbar. Hautverätzungen gehen immer mit Narbenbildungen einher.



Weißes Neuseeländerkaninchen in einem Hautätzungstest.

Foto: Quelle?

Die Prüfsubstanz wird einmalig auf eine kleine Hautfläche (etwa 6 cm²) aufgetragen. Die Stelle wird mit Mull bedeckt. Nach Ablauf der Expositionszeit von maximal vier Stunden werden die Hautveränderungen beurteilt. Tiere, die starke und anhaltende Schmerzreaktionen zeigen, werden vorzeitig getötet.

4.3. Augenreizungs-/Augenätzungstest

Diese Prüfmethode entspricht der Prüfrichtlinie 405 der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD TG 405) aus dem Jahr 2002.

Wie bei dem Hautverätzungstest (s. 4.2) bereits beschrieben, so soll auch dieser In-vivo-Test erst dann durchgeführt werden, nachdem alle zur Verfügung stehenden einschlägigen Daten für das Augenverätzungs- bzw. -reizungspotenzial durch den betreffenden Stoff in einer kritischen Analyse ausgewertet worden sind; diese Daten schließen auch Ergebnisse aus In-vitro-Methoden sowie die Auswertung der Literaturdaten ein.

Die Augenreizung ist dadurch gekennzeichnet, dass die von der Prüfsubstanz ausgelösten Veränderungen an der Augenoberfläche spätestens nach 21 Tagen vollständig *reversibel* sind.

Bei einer Augenverätzung treten dagegen irreversible Gewebeschädigung im Auge oder eine massive Verschlechterung des Sehvermögens innerhalb von 21 Tagen nach Applikation der Prüfsubstanz auf. Die Veränderungen sind nicht vollständig reversibel sind.



Weißes Neuseeländer-Kaninchen im Draizé-Test.

Foto: PeTA

Die Prüfsubstanz wird in einer einmaligen Dosierung in den Bindehautsack eines Auges jedes Versuchstiers eingebracht; das unbehandelte Auge dient als Kontrolle. Der Grad der Reizung/Verätzung wird bestimmt, indem zu festgelegten Zeitpunkten Schädigungen der Bindehaut, der Hornhaut und der Iris anhand einer Punkteskala bewertet werden. Die Augen der Versuchstiere sollen frühestens 24 Stunden nach Applikation der Prüfsubstanz ausgewaschen werden. Tiere mit starken und anhaltenden Anzeichen von Leiden und/oder Schmerzen können jederzeit während des Versuchs getötet werden.

4.4 Dermale Toxizität nach 28-tägiger Exposition

Diese Prüfmethode entspricht der Prüfrichtlinie 410 der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD TG 410 - Repeated Dose Dermal Toxicity 21/28-day Study") (22).

Die Tiere werden einzeln in Käfigen gehalten. Sie erhalten die Prüfsubstanz vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Prüfsubstanz ist während der Expositionszeit mit einem porösen Mullverband und einem hautschonenden Pflaster in Kontakt mit der Haut zu halten. Während des Versuchszeitraums werden die Tiere täglich beobachtet, um Symptome toxischer Wirkungen festzustellen (z.B. Zittern, Krämpfe, vermehrter Speichelfluss, Durchfall, Schläfrigkeit, Koma). Am Ende des Versuchs werden alle überlebenden Tiere getötet und seziiert. Tiere, die während des Versuchs sterben oder getötet werden, werden ebenfalls seziiert.

Das Tier als letzte Reserve

Eine Revision der OECD TG 404 aus 2002 (Hautreizungs/Hautverätzung, siehe unter 4.2) schlug im November 2014 eine abgestufte Vorgehensweise durch Abarbeiten von drei Modulen zur Bestimmung für Hautreizung/-verätzung vor (24, 25). Darin ist nach einer integrierten Teststrategie vorzugehen. Diese bezieht Ergebnisse bereits früher durchgeführter Tests und andere Daten zur Bewertung des Hautreizungs-/ätzungs potenzial mit ein (sogenannte "Weight-of-Evidence" – WoE-Analyse) (26). Falls die Ergebnisse der WoE-Analyse nicht ausreichen, wird zunächst mit In-vitro-Tests begonnen. Der Tierversuch bleibt als letzte Möglichkeit erhalten.

Immer mehr Verantwortliche erkennen die Bedeutung der tierversuchsfreien Verfahren bei der Bewertung von medizinischen Produkten oder toxischen Substanzen. Trotzdem ist der Zeitraum von der Entwicklung bis zur routinemäßigen Umsetzung viel zu lang (15 bis 20 Jahre und länger sind keine Seltenheit).

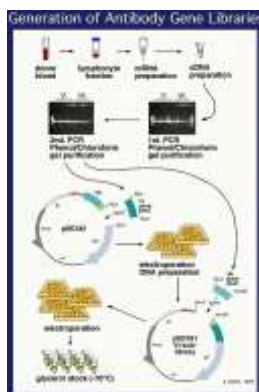
Zur derzeitigen Lage der tierversuchsfreien Methoden Entwicklung

Praxistaugliche und behördlich anerkannte tierversuchsfreie Methoden geraten in Vergessenheit, weil ihre Anwendung in Prüfbestimmungen nicht verbindlich festgeschrieben wird. Stattdessen wird der etablierte Tierversuch weiter durchgeführt.

Prof. Dr. Stefan Dübel ist Miterfinder des sogenannten Antikörper-Phagen Displays, einer tierversuchsfreien Methode zur Herstellung von Antikörpern (siehe hierzu auch Tierversuchsbeispiele wie unter 1.1 und 1.2. beschrieben). *Prof. Dübels* Methode wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bereits vor Jahren anerkannt. Das Antikörper-Phagen Display war früher Teil des Projekts "Antikörperfabrik" (27), das vom Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN) initiiert und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziell unterstützt wurde.

Was dann passierte, ist bezeichnend für viele sehr gute Projekte auf dem Gebiet der tierversuchsfreien Methodenentwicklungen: Es wurde still um die Entwicklung, die Methode geriet scheinbar teilweise in Vergessenheit.

Prof. Dübel schätzt, dass durch den Einsatz seines Phagen-Displays weltweit der Tod von 250.000 bis 500.000 Tieren pro Jahr vermieden werden könnte, denn das Ausmaß des Tierverbrauchs zur Antikörpergenerierung sei enorm. Für die Ersterzeugung jedes einzelnen Antikörpers werden typischerweise zwischen 2 und 5 Tiere benötigt. Und es werden ständig neue Antikörper hergestellt. Jedes Labor produziert weiterhin seine eigenen Antikörper, obgleich etwa 450 Firmen schätzungsweise bereits vier Millionen Antikörperprodukte kommerziell anbieten. Nur wenige Firmen veröffentlichen Zahlen zu neu hergestellten Antikörpern.



Schema der Gewinnung der Bibliothek für das phagen-Display
Urheber: Prof. Stefan Dübel, 1999.

Zu den kommerziell erzeugten Antikörpern kommen viele Hybridomtechniken hinzu (Verfahren zur Produktion von monoklonalen Antikörpern, für die auch Mäuse benutzt werden), die von Universitäts- und Forschungslaboren hergestellt werden, so Prof. Dübel. Eine Dokumentation erfolgt in Deutschland nicht. Als eine der führenden biomedizinischen Forschungsnationen ist der Anteil Deutschlands deshalb mit mindestens 25.000 Tieren abschätzbar, mit steigender Tendenz, schätzt der Braunschweiger Forscher.

Zusätzlich werden mit der Antikörperherstellung viele Firmen im Ausland beauftragt, die z.B. weniger Restriktionen bei der Verwendung schmerzzeugender Adjuvanzien (s. 1.2) und bei der äußerst schmerzhaften Aszites-Methode unterliegen. In Deutschland ist die Produktion Monoklonaler Antikörper in der Maus (Aszites-Maus) seit 1989 verboten.

5. Antikörperherstellung ohne Tier

5.1. Monoklonale Antikörper

Für die Entwicklung monoklonaler Antikörper gibt es seit einiger Zeit tierversuchsfreie Verfahren, z.B. das Phagen-Display. Die Methode ermöglicht die komplette Einsparung aller bisheriger Tierversuche für diesen Bereich. Sowohl Pharmaindustrie als auch akademische Forschung brauchten zudem keine Qualitätsverluste der Antikörper zu befürchten.

Das sogenannte „Phagen-Display“ (Phagen sind Viren, die Bakterien befallen) ist die zentrale Technik zur Erstellung einer „Antikörperbibliothek“ mit zigtausend rekombinanten Antikörpern. Bei dem Verfahren werden mit molekularbiologischen Techniken zunächst Antikörpergene aus menschlichen Abwehrzellen isoliert, vervielfältigt und mit der DNA eines Virus (Bakteriophage) vereinigt, das in *E. coli* Bakterien eingeschleust wird. Die Bakterien produzieren nun Viren, auf deren Oberfläche verschiedene Antikörper sitzen. Viele solcher Phagen-Klone, die unterschiedliche Antikörper tragen, werden als „Phage-display-Bibliothek“ bezeichnet. In mehreren Schritten werden nun die Antikörper nach ihren passenden Eiweißen sortiert, herausgefiltert und wiederum mit Hilfe von Bakterien vervielfältigt (28, 29, 30).

Dieses Verfahren bietet gegenüber der Antikörpergewinnung in Tierversuchen den Vorteil, dass auch Antikörper hergestellt werden können, die ein Kaninchen beispielsweise gar nicht bilden kann, oder deren Antigene für Kaninchen oder andere Tiere toxisch sind (27b).

Zur Herstellung des Prototyps beim Braunschweiger Phagen-Display werden menschliche Antikörpergene genutzt, die aus freiwilligem Spenderblut stammen. Immunreaktionen gegen Tier-Sequenzen und dadurch bedingte notwendige biotechnologische Nachbearbeitungen fallen weg.

Mit dem Phagen-Display werden von Anfang an monoklonale Antikörper ohne Tier erzeugt. Dieses Verfahren ist also auch in der Lage, die auf Mäuse angewiesene Hybridom-Technologie zu ersetzen. Auch eine Anwendung für den Ersatz polyklonaler Seren ist teilweise möglich.

In-vitro-Immunsierung

Neben der Herstellung von Antikörperprototypen mit Bakterien und Bakteriophagen lassen sich auch Prototypen mit humanen Immunzellen in der Petrischale herstellen. Bei dem Verfahren der sogenannten In-vitro-Immunsierung werden z.B. humane B-Lymphozyten in der Petrischale zur Bildung der spezifischen Antikörper angeregt. In einer Potsdamer Forschergruppe werden zunächst humane Antigen-präsentierende Zellen (Dendritische Zellen) mit dem gewünschten Antigen aktiviert und anschließend mit antigenunerfahrenen, sogenannten naiven T- und B-Lymphozyten zusammen kultiviert. Nach einigen Tagen Kultivierung finden sich spezifische Antikörper im Kulturmedium. Diese werden isoliert und gereinigt (31). Die Forschergruppe, die an diesem Ersatzverfahren arbeitet, weist jedoch darauf hin, dass weitere Forschungsarbeiten nötig seien, da natürliche Prozesse, wie die Affinitätsreifung im Organismus unter In-vitro-Bedingungen realisiert werden müssten (32).

5.2 Polyklonale Antikörper im Hühnerei

IgY-Technologie

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Herstellung polyklonaler Antikörper, bei der zwar auch Tiere (Hennen) für die Antikörperproduktion eingesetzt werden, die Gewinnung dieser Antikörper aber „unblutig“ aus den Eiern zuvor immunisierter Hennen erfolgt.

Gegenüber den von Säugern gewonnenen Antikörpern haben die mit der IgY-Technologie gewonnenen Vogel-Antikörper den Vorteil, dass mehr Antikörper gebildet werden als beim Kaninchen (33).

Die Methode würde zwar den Kaninchenversuch ersetzen und ist im Vergleich dazu auch tierschonender; sie stellt aber letztlich aus Tierschutzsicht keine wirkliche Alternative dar, weil sie die Verwendung von Tieren zu Produktionszwecken bedeutet. Hinzu kommt, dass diese Art polyklonaler Antikörper nur für eine begrenzte Zeit zur Verfügung steht, das Produkt „altert“, die Qualität nimmt ab.

Insofern ist auf jeden Fall dem Phagen-Display (siehe oben) der Vorzug zu geben.

5.3 Rekombinante tetravalente Antikörper (TanDabs) als therapeutische Antikörper

Auch TanDabs werden ebenfalls in Bakterien, Hefen oder Pflanzen gentechnisch hergestellt. Ein Tier wird nicht benötigt.

Zur Entwicklung von therapeutischen Antikörpern zur Tumorbekämpfung verwendet die Pharmaindustrie inzwischen bevorzugt kleinere Moleküle. Monoklonale Antikörper sind viel zu groß, um durch die Plasmamembran direkt an den Wirkungsort zu gelangen. Dadurch können sie sich auch nicht an Zielmoleküle binden, die irgendwo tief im Gewebe versteckt sind. Ein weiterer Nachteil der monoklonalen Antikörper ist z.B. die große Menge, die verabreicht werden muss, weil die Bindung an das Zielmolekül einer Zelle reversibel sein kann und dadurch die Wirkung abschwächt. TanDabs können besser an den Wirkungsort gelangen, stärker binden und reduzieren dadurch die Kosten (34, 35).

6. Monozyten-Aktivierungstest (MAT In-vitro-Pyrogentest (IPT)), PyroDetect®-System

Im Oktober 2010 wurde der Pyrogentest am Kaninchen zur Prüfung von Medikamenten auf fieberauslösende Substanzen in der EU durch den In-vitro-Pyrogentest mit menschlichem Blut ersetzt. Der Test wurde unter der Bezeichnung Monozyten-Aktivierungstest in das europäische Arzneibuch aufgenommen. Der Unterschied zwischen In-vitro-Pyrogentest (IPT) und dem monozyten-Aktivierungstest (MAT) besteht darin, dass beim IPT ausschließlich Vollblut verwendet wird, beim MAT sind zusätzlich auch andere Varianten (siehe unter 2) möglich.

Für den Test wird ein weißer Blutzelltyp (Monozyt) verwendet, der auf fieberauslösende Partikel (Pyrogene) bestimmte chemische Botenstoffe, die sogenannten Zytokine, ausschüttet, z.B. TNF α oder Interleukin- β 1 (IL- β 1). Das IL-1 β ist normalerweise im gesunden Zustand im menschlichen Körper in so geringen Mengen vorhanden, dass es unter der Nachweisgrenze liegt. Daher ist dieser Fieberbotenstoff als Nachweis von pyrogenen Reaktionen im In-vitro-Test bestens geeignet.

Der MAT/IPT weist ein vergleichbar umfassendes Pyrogen-Spektrum wie der Kaninchentest und ein wesentlich breiteres Pyrogen-Spektrum nach als der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test. Mit dem LAL können lediglich Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien nachgewiesen werden (12).

Die konsequente europaweite Umsetzung des MAT-Tests würde das Leiden von ca. 200.000 Kaninchen pro Jahr beenden (36).




Kryoblut wird mit der zu untersuchenden Probe zusammengemischt, auf Mikrotiterplatten aufgebracht und anschließend bei 37°C für ca. 18 Stunden inkubiert. Bei Anwesenheit von Pyrogenen in der Probe wird von den Monozyten des Blutes der Fiebersignalstoff IL-1 β ausgeschüttet. Danach wird der Probenansatz auf eine mit einem Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte überführt. Ist IL-1 β vorhanden, bindet der und färbt die Testlösung blau (hier nicht gezeigt). Mit einer Stopplösung erfolgt ein Farbumschlag nach gelb, dessen Intensität photometrisch gemessen wird. Foto: t4nkyong - Fotolia.com

Dass ein sehr großes Interesse an dem MAT besteht zeigt sich daran, dass es einige Medizinprodukt-Testlabore gibt, die sogar versuchen, den Test auch auf andere Fragestellungen zu übertragen, wie z.B. auf Routinetests von Arzneimitteln.

Daraus lässt sich entnehmen, dass es einen umfangreichen Bedarf an der neuen In-vitro-Methode gibt, die in der Lage ist, durch zuverlässige, humanspezifische Aussagen den Kaninchentest abzulösen.

Fazit: Dreh- und Angelpunkt der Verzögerung bei der Testvalidierung war bislang die Verfügbarkeit von Blut. Inzwischen werden jedoch Wege und Mittel gefunden, um sich ggf. vom Kryoblut unabhängig zu machen. Auch der Pfeilschwanzkrebs ist ein Auslaufmodell: In

 Kürze wird der vom Aussterben bedrohte Pfeilschwanzkrebs durch einen In-vitro-Test mit einem künstlich erzeugten Enzym ersetzt. Die Validierung dazu soll noch in diesem Jahr zum Abschluss gebracht werden.

7. Der Kaninchenersatz bei der Entwicklung medizinischer Produkte

Die Blutverträglichkeit (Hämokompatibilität) und fieberauslösende Partikel (Pyrogene) solcher Art Produkte lassen sich seit längerem schon mit dem In-vitro-Pyrogentest/MAT testen (12). Unabhängig davon wäre es vielleicht möglich, die Flusskammersystem-Entwicklung auszubauen, mit denen bereits 2011 Untersuchungen zur Entstehung von Arteriosklerose durchgeführt wurden. (37, 38, 39).

8. Ersatzverfahren für Kaninchen in der Toxikologie

8.1 Ersatzverfahren zum Hautreizungs-/Hautverätzungstest

In-vitro-Verfahren an künstlichen humanen Hautmodellen sind aktuell im Juli dieses Jahres in die OECD Guidelines (Prüfvorschriften) aufgenommen worden und gelten damit als weltweit behördlich anerkannt. Aktuelle Testrichtlinien sind z.B. die neuüberarbeitete OECD-Testrichtlinie 431 (40). Bei Hautätzungs- und Hautreizungstests gilt die integrierte Teststrategie unter Ausnutzung aller vorhandenen Möglichkeiten, der existierenden Informationen, Humandaten, In-vitro-Tests, die Berücksichtigung von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen sowie Weight-of-Evidence-Analysen. Der Tierversuch sollte nur dann durchgeführt werden, wenn alle anderen Möglichkeiten ausgeschöpft sind und die Informationslage nicht ausreicht (41).

EpiDerm™ , Episkin® , SkinEthik™ und MatTek

Diese Testsysteme werden schon längere Zeit kommerziell angeboten. Sie bestehen aus einer dreidimensionalen, vollständigen menschlichen Oberhaut (Epidermis). Hautreizende Chemikalien können die äußere Hautschicht durchdringen und die darunter liegenden

lebenden Zellschichten schädigen. Mit biochemischen Methoden lässt sich die Gewebeschädigung erfassen und auswerten. Es können sowohl flüssige, feste, halb feste als auch wachsartige Substanzen getestet werden. Feststoffe werden in pulverisierter Form aufgetragen (42, 43).

Hautverätzungen durften schon seit 2004 mit diesen Hautmodellen überprüft werden. Nun dürfen auch weniger schwere Hautreizungen mit diesen tierversuchsfreien Verfahren weltweit getestet werden.

8.2 Ersatzverfahren zum Augenreizungstest

Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) und Isolated Chicken Eye (ICE) Test

Zur Prüfung starker Augenreizwirkungen kann der BCOP-Test nach OECD 437 (44) eingesetzt werden. Im September 2009 hatte die OECD bereits einen in vitro-Test mit isolierter Rinderhornhaut (BCOP-Test, mit Rinderhornhaut von geschlachteten Rindern) zugelassen, der als Ersatz des Draizé-Tests zur Substanztestung auf starke Augenreizung genutzt werden kann. Allerdings bestand über einen langen Zeitraum ein Bedarf an einem Messgerät, mit dem man die starke Augenreizung überhaupt zuverlässig feststellen kann. Dieses Gerät wurde von BASF weiterentwickelt und wird zum Selbstkostenpreis vertrieben (45).

Bei der Methode wird die intakte Hornhaut der Augen von geschlachteten Rindern bzw. Hühnern (Isolated Chicken Eye (ICE) Test)) (46) herauspräpariert und in eine Spezialhalterung gespannt. Mit speziellen Medien gefüllte Kammern simulieren dabei die Außen- bzw. Innenseite der Hornhaut. Das spezielle Messgerät (Opacitometer) ermöglicht die exakte Bestimmung der Hornhauttrübung, die durch die Substanzschädigung ausgelöst wurde.

Ex Vivo Eye Irritation Test (EVEIT)

Das Aachener Centrum für Technologietransfer in der Ophthalmologie (ACTO) e.V. hat ein Ersatzverfahren für den sehr umstrittenen und schmerzhaften Draizé-Test am Auge eines lebenden Kaninchens entwickelt (47, 48, 49). Das Verfahren stellt – ähnlich dem Bovine



Corneal Opacity/Permeability Assay (BCOP) – eine tierversuchsfreie Alternative zum Draizé-Test auf Augenreizung am lebenden Kaninchen dar.

Wesentliches Kriterium des Ersatzverfahrens zum Tierversuch EVEIT ist die Möglichkeit, außerhalb eines Tierversuches dynamisch die Heilung von Wunden unter exakt reproduzierbaren Versuchsbedingungen zu beobachten (49). Dabei werden jedoch leider Hornhäute von geschlachteten Kaninchen über 28 Tage in Kammern kultiviert. Die Testchemikalie wird dann auf die Hornhautkultur aufgegeben. Hiernach können geschädigte Bereiche mit verschiedenen Methoden untersucht werden. Umgekehrt kann auch der Heilungsverlauf künstlich geschädigter Hornhautkultur in vitro untersucht werden, nachdem z.B. ein neues Augenarzneimittel auf die Kultur aufgegeben worden ist. Mit dem Test können auch wiederholte Substanzenanwendungen bis zu 100 Mal am Tag getestet werden.

Bei der in vitro-Prüfung der akuten Augenreizung werden Hornhauttrübungen und Veränderungen der oberflächlichen und tieferen Hornhautschichten mit vier Methoden untersucht: mit dem Mikroskop, der Optischen Kohärenztomografien (OCT), biochemisch und histologisch – also weitaus genauer als es beim Kaninchen der Fall ist. Beim OCT wird Licht geringer Kohärenzlänge zur Entfernungsmessung streuender Materialien eingesetzt. Das Untersuchungsobjekt wird punktweise abgetastet.

Der EVEIT kann in Kombination mit der OCT-Technik durchaus mit den Ergebnissen der Tierversuche mithalten (48).

Derzeit herrscht Übereinstimmung, dass in absehbarer Zukunft ein einzelner In-vitro-Test nicht in der Lage sein wird, den Draizé-Test zu ersetzen (50). Daher sollten Testkombinationen in einem abgestuften, sogenannten "Top-Down"- bzw. "Bottom-Up"-Prinzip erfolgen.

Positiv validiert: EpiOcular™ Human Cornea-like Epithelium (RhCE)

Während der BCOP starke Augenreizwirkungen erfasst, können schwächere Augenreizwirkungen an humanen dreidimensionalen Hornhautmodellen getestet werden. Ein OECD Richtlinienentwurf (Draft proposal) vom Dezember 2014 sieht vor, den Einsatz von rekonstruierten humanen, Cornea-ähnlichen Epithelien als Testmethode zur Feststellung von

Augenreizungen und starker Augenschädigung zu nutzen (50). Dies gilt jedoch nur für Substanzen, die nicht nach der GHS-Vorschrift (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) reguliert werden müssen (51). Die Nutzungsbegrenzung ist dadurch begründet, dass mit dem Test nicht zwischen reversiblen Effekten einer Augenreizung und starken irreversiblen Augenschäden unterschieden werden kann, und auch nicht zwischen Augenreizungen und leichten Augenirritationen (52).

Das Human Cornea-like Epithelium (RhCE) besteht aus humanen primären hornbildenden Zellen (Keratinozyten), die mehrere Tage kultiviert werden können. Dabei bilden sie ein dreidimensionales, geschichtetes, differenziertes, schwammartiges Schichtgewebe (Epithel) aus, das der humanen Augenhornhaut ähnelt. Es besteht aus drei Zellschichten. Die Oberfläche ist keratinfrei.

Die Testchemikalie wird lokal auf das Gewebekonstrukt aufgetragen und die Lebensfähigkeit (Viabilität) der Zellen nach einer gewissen Expositionszeit gemessen. Beobachtet werden können alle Schäden, die auch In-vivo auftreten, also Hornhaut-, Iris- und Bindehautverletzungen.

Der Test wurde vom Referenzlabor für Alternativen zum Tierversuch der EU EURL ECVAM in Zusammenarbeit mit Cosmetics Europe zwischen 2008 und 2011 erfolgreich validiert (53, 54, 55, 55, 57).

Literatur

(1) Versuchstierzahlen 2013.

http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/2013-TierversuchszahlenGesamt.pdf?__blob=publicationFile

(2) Hirt, Maisack, Moritz (2007): Kommentar zum Tierschutzgesetz, Vahlens Kommentare 2. Auflage.

(3) <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs/moderne-verfahren.php>

(4) http://www.molim.uni-erlangen.de/MTG/material_antikoerper/therapeutische_AK.pdf

(5) Heilmann, K.; Messerschmidt, K. & Holzlöhner, P. (2012): Monoklonale Antikörper-Herstellung und Verwendung. BIOSpektrum 02.12: 167-169, Springer-Verlag.

(6) http://www.medizininfo.de/hautundhaar/psoriasis/monoklonale_antikoerper.shtml

(7) Luttmann, W. et al. (2009): Der Experimentator. Immunologie. Springer Verlag, Heidelberg.

(8) Schöffl, H.; Spielmann, H.; Gruber, F. et al., Hrsg. (2000): Forschung ohne Tierversuche. Springer-Verlag, Heidelberg.

(9) European Pharmacopeia. <http://online.pheur.org/EN/entry.htm>

(10) Hasiwa, N.; Daneshian, M.; Bruegger, P. et al. (2013): Evidence for the Detection of Non-Endotoxin Pyrogens by the Whole Blood Monocyte Activation Test. t4 Report. Altex 30: 169-208.

(11) European Medicines Agency (2009): Guideline on the replacement of rabbit pyrogen testing by an Alternative Test for Plasma Derived Medicinal Products. Doc. Ref. EMEA/CHMP/BWP/452081/2007.

(12) <http://www.invitrojobs.de/index.php/de/aktuelles-archiv/149-ag-im-portrait-klinisches-forschungslabor-kinderherzchirurgie.html>

(13) DIN-Taschenbuch 268: Nicht aktive Medizinprodukte. Horizontale, harmonisierte Europäische Normen gemäß EU-Richtlinien auf dem Gebiet der Medizin. 2. Auflage 2014. Beuth-Verlag Berlin.


(14) DIN-Taschenbuch 263: Sterilisation von Medizinprodukten. Sterilisationsverfahren. 4. Auflage 2014. Beuth-Verlag Berlin.

(15) http://www.umm.uni-heidelberg.de/inst/nra/pat_aneurysmen.html

(16) <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Aneurysmen.126810.0.html>

(17) <http://www.animaltestinfo.de/>

(18) Lübbert, C.; Straube, L.; Stein, C.; Makarewicz, O.; Schubert, S.; Mössner, J.; Pletz, M. W. & Rodloff, A. C. (2015): Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and

 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in international travelers returning to Germany. International Journal of Medical Microbiology 305/1: 148-156

(19) <http://www.zeit.de/feature/mrsa-krankenhauskeime>

(20) <http://www.onvista.de/news/neun-laender-dringen-auf-verbot-von-reserve-antibiotika-in-tiermast-2014209>

(21) <http://www.bmel.de/SharedDocs/Interviews/2014/2014-12-18-SC-Zeit.html>

post-operative implant infections. Journal of Orthopaedic Surgery and Research. 8:38. (*wozu gehört das?*)

(22) http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-410-repeated-dose-dermal-toxicity-21-28-day-study_9789264070745-en

(23) VERORDNUNG (EG) Nr. 440/2008 DER KOMMISSION vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), (Text von Bedeutung für den EWR), (ABl. L 142 vom 31.5.2008, S. 1)

(24) OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS DRAFT REVISED GUIDELINE 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion vom 28.11.2014.

(25) ENVIRONMENT DIRECTORATE JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY (2014): Guidance document on Integrated Approached to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. ENV/JM/MONO(2014)19.

(26) Hartung, T.; Bruner, L.; Curren, R.; Eskes, C.; Goldberg, A.; McNamee, P.; Scott, L. & Zuang, V. (2010): First Alternative Method Validated by a Retrospective Weight-of-Evidence Approach to Replace the Draizé Eye Test for the Identification of Non-Irritant Substances for a Defined Applicability Domain. Altex 27, 1/10.

(27) http://rzv054.rz.tu-bs.de/Biotech/antibody-factory/news_pub/index.html

(27b) Schirrmann, T.; Hust, M.; Dübel, S. (2007). Die Antikörperfabrik: Antikörper für jedes Protein. Biologie in unserer Zeit 37: 348-351

(28) Hust, M.; Frenzel, A.; Schirrmann, T.; Dübel, S. (2014): Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. *Methods in molecular biology* 1101: 305-320.

(29) Geyer, CR.; McCafferty, J.; Dübel S.; Bradbury AR.; Sidhu SS (2012): Recombinant antibodies and in vitro selection technologies. *Methods in molecular biology* 901: 11-32.

(30) Schmiedl, A. & Dübel, S. (2004): Rekombinante Antikörper & Phagen-Display. In: „Molekulare Biotechnologie“, Wiley-VCH (2004) Hrsg.: M. Wink.

(31) Wand, I.; Holzlöhner, P.; Neupert, S. et al. (2011): Cooperation of dendritic cells with naive lymphocyte populations to induce the generation of antigen-specific antibodies in vitro. *J Biotechnol* 156:173–181.

(32) <http://www.uni-potsdam.de/de/ibb/arbeitsgruppen/nachwuchsgruppen/heilmann/forschung/induktion.html>

(33) Zhang, X. (2009): Entwicklung von Testsystemen zum Nachweis von Agenzien mit bioterroristischem Potential auf der Basis der IgY-Technologie (aviäre Antikörper). Diss. FU Berlin.

(34) <http://www.bio-pro.de/magazin/thema/00166/index.html?lang=de&artikelid=/artikel/02584/index.html>

(35) Bornscheuer, U.: Vorlesung Biotechnologie II. (Memento vom 17. Februar 2007 im Internet Archive), Institut für Chemie und Biochemie, Universität Greifswald.

<https://web.archive.org/web/20070217092149/http://www.chemie.uni-greifswald.de/~biotech/assets/downloads/antikoerper.pdf>

(36) <http://www.aktuelles.uni-konstanz.de/presseinformationen/2010/67/>

(37) <http://www.invitrojobs.de/index.php/de/aktuelles-archiv/321--hessische-tierschutzforschungspreis-verleihung-2012.html>

(38) Won, D. et al. (2007): Relative Reduction of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression and transcription in Atherosclerosis-Prone Regions of the Mouse Aorta and in an in Vitro Model of Disturbed Flow. The American Journal of Pathology 171/5: 1691-1704.

(39) Bundesverband Menschen für Tierrechte (2012): Versuchstier des Jahres 2012: Die Atherosklerose-Maus.
http://www.tierrechte.de/images/stories/Tierversuche/Versuchstier_des_Jahres_2012/Atherosklerose-Maus-gesamt.pdf

(40) OECD (2014): DRAFT REVISED GUIDELINE 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. July 2014.

(41) ENVIRONMENT DIRECTORATE JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY (2014): NEW GUIDANCE DOCUMENT ON AN INTEGRATED APPROACH ON TESTING AND ASSESSMENT (IATA) FOR SKIN CORROSION AND IRRITATION. ENV/JM/MONO(2014)19, 11-July-2014.

(42) <http://www.mattek.com/pages/products/epiderm>

(43) <http://www.skinethic.com/EPISKIN.asp>

(44) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (2009): Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. 437.

(45) <http://www.invitrojobs.de/index.php/de/aktuelles-archiv/185-arbeitsgruppe-im-portrait-kurzzeit-toxikologie-der-abteilung-experimentelle-toxikologie-und-oekologie-basf.html>

(46) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (2009): Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. 438.

(47) <http://www.invitrojobs.de/index.php/de/aktuelles-archiv/570-arbeitsgruppe-im-portrait-acto-ev.html>

(48) <http://www.rwth-aachen.de/go/id/bqbt/?#aaaaaaaaaabqbu>

(49) <http://www.acto.de/pages/de/projekte/eveit.php#Testprinzip>



(50) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (2014): Draft Proposal for a new test Guideline - Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage.

(51) http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/classification/index_en.htm

(52) Scott, L.; Eskes, C.; Hoffmann, S. et al. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24: 1-9.

(53) Freeman, S.J.; Alépée, N.; Barroso, J.; Cole, T.; Compagnoni, A.; Rubingh, C.; Eskes, C.; Lammers, J.; McNamee, P.; Pfannenbecker, U. and Zuang, V. (2010). Prospective validation study of reconstructed human tissue models for eye irritation testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010: 261-266.

(54) EC EURL ECVAM (2014). Validation Study Report on the EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Corneal Epithelium-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation testing. Available at: (in publication).

(55) EC EURL ECVAM (2014). Eye irritation in vitro assay validation: selection of test item chemicals (EpiOcular™ Eye Irritation Test and SkinEthic™ Human Cornea Epithelium). Validation Management Group report. Available at: (in publication).

(56) TNO (2014). Eye Irritation Validation Study on Human Tissue Models: Statistical Analysis and Reporting on the EpiOcular™ EIT. TNO report TNO2013 R10396 Final, pp. 165. Available at: (in publication).

(57) EC EURL ECVAM (2014). Eye Irritation Validation Study (EIVS): statistical analysis of the data generated under SOP ver 8.0 of EpiOcular™ EIT (solid test substances, laboratory Beiersdorf), pp. 21. Available at: (in publication).