

Rondetafelgesprek

Ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden

14 september 2017

VASTE COMMISSIE VOOR ECONOMISCHE ZAKEN

UITSLUITEND BESTEMD VOOR INTERN GEBRUIK EN VOOR DEELNEMERS AAN HET GESPREK

Den Haag, 7 september 2017

Geachte leden,

Hierbij treft u, op volgorde van de in de convocatie genoemde genodigden, hun bijdragen aan ten behoeve van het rondetafelgesprek over **de ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden op donderdag 14 september 2017 van 14.00 tot 17.00 uur.**

De bijdragen vindt u ook op het tabblad agenda onder agendapunt 'Position Papers' in Parlis.

Van niet alle genodigden hebben wij tot op heden een bijdrage ontvangen. Indien wij deze alsnog ontvangen, zullen deze alleen digitaal worden verspreid.

Met vriendelijke groet,

R. Konings,
Adjunct-griffier van de vaste commissie voor Economische Zaken



Voortouwcommissie: **vaste commissie voor Economische Zaken**
Volgcommissie(s): vaste commissie voor Onderwijs, Cultuur en Wetenschap

Activiteit: **Rondetafelgesprek**
Datum: donderdag 14 september 2017
Tijd: 14.00 - 17.00 uur
Openbaar/besloten: openbaar

Onderwerp: Ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden

Agendapunt: **RONDE Tafelgesprek over de ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden**

Noot: **Blok 1 Wetenschap ten aanzien van de ontwikkeling van proefdiervrije methoden (14.00 - 15.00 uur)**

1. Han van de Sandt (research manager TNO)
2. Jan van der Valk (coördinator 3V-Centrum Utrecht Life Sciences)
3. Ingrid Geesink (coördinator Ziekte en Gezondheid Rathenau Instituut)
4. Peter van Meer (Universiteit Utrecht)
5. Aldert Piersma (reproductietoxicoloog RIVM en bijzonder hoogleraar IRAS Universiteit Utrecht)
6. Wim de Leeuw (hoofd Instantie voor Dierenwelzijn Universiteit Utrecht)

Blok 2 Ngo's (15.00 - 15.20 uur)

1. Marja Zuidgeest (directeur Proefdiervrij)
2. Elly von Jessen (dierenbescherming)

Pauze (15.20 - 15.30 uur)

Blok 3: Implementatie van proefdiervrije onderzoeksmethoden (15.30 - 16.15 uur)

1. Han van de Sandt (research manager TNO)
2. Theo Vermeire (RIVM)
3. Herman Koëter (voorzitter Nationaal Comité advies dierproevenbeleid)
4. Marie-Jeanne Schiffelers (senior adviseur en onderzoeker Universiteit Utrecht)
5. Menk Prinsen (onderzoeker Triskelion)

Blok 4: Dierproeven in het kader van het beperken van gezondheidsrisico's (16.15 - 17.00 uur)

1. Robert Scholten (directeur Dutch Brain Council)
2. Pieter Roelfsema (directeur Nederlands Herseninstituut)
3. Han van de Sandt (research manager TNO)
4. Robert Passier (onderzoeker Leids Universitair Medisch Centrum)

Griffier: D.S. Nava
Activiteitsnummer: 2017A02149



Tweede Kamer

DER STATEN-GENERAAL

Rondetafelgesprek Ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden

*Donderdag 14 september 2017
14.00 – 17.00 uur*



Tweede Kamer

DER STATEN-GENERAAL

**Rondetafelgesprek Ontwikkeling van
proefdiervrije onderzoeksmethoden**
(inbreng genodigden)

Blok 1
Wetenschap ten aanzien van de
ontwikkeling van proefdiervrije
methoden (14.00 - 15.00 uur)

*Donderdag 14 september 2017
14.00 - 17.00 uur*

Proefdiervrije innovaties binnen biomedisch effectiviteitsonderzoek in perspectief

Han van de Sandt - TNO
4 september 2017

Voor het beantwoorden van een aantal maatschappelijke vraagstukken is het inzetten van dierproeven op het moment (helaas nog) onvermijdelijk. Deels is dit gevolg van eisen die overheden stellen, deels omdat er (nog) geen proefdier-vrije methoden zijn met voldoende betrouwbaarheid. Binnen kennisinstituten, bedrijven en universiteiten wordt gericht en ongericht (uit wetenschappelijke nieuwsgierigheid) gewerkt aan verfijning, vermindering en vervanging van dierproeven. Ook binnen het biomedisch onderzoek naar de werkzaamheid (effectiviteit) van geneesmiddelen worden continu onderzoeksmodellen ontwikkeld en toegepast. Centraal hierbij staat de voorspellende waarde voor de mens. Het klinkt eenvoudig: het model dat de mens het best nabootst, wint de race. Of ligt het complexer?

De beste voorspeller van de mens is... de mens

Het is belangrijk om vast te stellen dat het binnen het geneesmiddelenonderzoek draait om bewezen effectiviteit van een nieuw medicijn in de mens. Daarom vinden er verschillende ontwikkelingen plaats binnen het klinisch onderzoek: door vroege biomarkers te ontwikkelen op basis van mechanistische kennis en door steeds gevoeliger meetmethoden toe te passen worden de mogelijkheden om vroeg de effectiviteit van geneesmiddelen in de mens te onderzoeken, steeds verder vergroot. Humaan onderzoek biedt bij uitstek de mogelijkheid om verschillen en overeenkomsten tussen individuen te onderzoeken, waardoor meer inzicht wordt verkregen over het nut en noodzaak van stratificatie en personalized medicine. Echter het is om ethische en praktische redenen niet mogelijk om nieuwe potentiële medicijnen in een vroeg stadium in de mens te testen. Daarom gaat er een uitgebreid preklinisch traject aan vooraf, waar modellen voor de mens (eigenlijk: voor *specifieke processen* in de mens) worden gebruikt.

Diermodellen: ideaal door integrale fysiologie of black box?

Diermodellen worden veel gebruikt in het preklinisch effectiviteitsonderzoek. De muis is hierbij veruit het meest gebruikte proefdier. Belangrijke voordelen van muismodellen zijn de genetische overeenkomst met de mens (95%), mogelijkheden tot genetische manipulatie, snelheid (life span van 2 jaar ipv 75 jaar), induceerbare ziekteprocessen en decennialange ervaring. Toch staan de voorspellende waarde van deze modellen en de ethische aspecten van dit type onderzoek regelmatig ter discussie.

Voor sommige ziekteprocessen bestaan geen bruikbare diermodellen, omdat de relevante fysiologische en/of moleculaire processen in proefdieren te verschillend zijn van die van de mens. Het is echter helder dat diermodellen een essentiële rol spelen bij het ontwikkelen van nieuwe medicijnen. Daar waar geen bruikbare modellen bestaan, wordt vaak hard gewerkt aan het ontwikkelen van modellen met een hogere voorspellende waarde, door transgenese of door gebruik van andere diersoorten dan de muis. Het aantonen van voorspellende waarde van diermodellen is trouwens niet eenvoudig, o.a. door gebrek aan beschikbaarheid van goed gedocumenteerde, mechanistische data in de mens.

In vitro modellen: ideaal humaan representerend systeem of te reductionistisch?

Voorafgaand aan diermodellen worden binnen het geneesmiddelenonderzoek vaak *in vitro* methoden toegepast. Het grote verschil met diermodellen is dat *in vitro* modellen geen integrale fysiologie reflecteren: slechts een beperkt en geïsoleerd deel van biologische processen kan *in vitro* worden bestudeerd. Dat is natuurlijk een enorm nadeel als het doel is om voorspellend te zijn voor de gehele humane fysiologie. Echter, *in vitro* modellen bieden de mogelijkheid in

menselijke cellen (ziekte)processen te bestuderen. En ze kunnen in detail bestudeerd worden, wat vaak in de mens niet kan.

Klassieke 2D *in vitro* modellen worden dan ook vooral ingezet bij het screenen van mogelijk nieuwe geneesmiddelen op goed begrepen, relatief simpele, biologische processen, vooral tijdens de *drug discovery* fase van de geneesmiddelenontwikkeling. Om de toepassing van *in vitro* modellen te verbreden tot biologisch ingewikkelder vraagstellingen zijn complexere *in vitro* modellen ontwikkeld, vaak 3D en bestaande uit verschillende celtypen en soms extra technologie toegevoegd. Een voorbeeld hiervan is de [organ on a chip technologie](#), wat als containerbegrip gebruikt wordt voor een breed palet aan verschillende technologieën. Er worden door ontwikkelaars veel lonkende vergezichten geschetst, tot en met een volledig geïntegreerde menselijke fysiologie op een chip. Deze beloften moeten nog worden waargemaakt, maar het is duidelijk dat dit gebied snel aan kracht wint.

Eén doorbraaktechnologie?

Bij de introductie van nieuwe onderzoeksmodellen binnen de geneesmiddelen-ontwikkeling is een aantal aspecten van belang. Allereerst moet de vernieuwing natuurlijk aantoonbaar beter zijn dan het bestaande model (= een hogere voorspellende waarde). Daarnaast spelen kosten en praktische implementeerbaarheid een rol, en vaak ook regulatoire acceptatie.

Het perfecte onderzoeksmodel bestaat niet. Een model dat alles moet kunnen, kan uiteindelijk niets. De toegevoegde waarde van modellen ligt in de voorspellende waarde voor een specifieke onderzoeksvraag. Het is zeer onwaarschijnlijk dat één technologie (humaan, dier of *in vitro*) de gehele geneesmiddelenontwikkeling zal gaan domineren. Veel waarschijnlijker is dat alle 3 de technologieën van waarde blijven en hun eigen ontwikkeling hebben, afhankelijk van de fase (*drug discovery*, *drug development*, *preclinical safety*) en de precieze inhoudelijke vraagstellingen. Afhankelijk van de toegevoegde waarde aan het proces zullen de verhoudingen tussen de technologieën veranderen; TNO onderschrijft de zeer uitdagende ambitie van de Staatssecretaris van Economische Zaken, om in 2025 wereldleider op het gebied van proefdiervrije innovaties te zijn. Een gevaar voor de publieke acceptatie van innovaties is dat onderzoekers de waarde en de mogelijkheden van een specifiek model groter maken dan deze werkelijk is. Dit gebeurt zowel bij proefdiermodellen als bij *in vitro* modellen. Degelijk en ethisch verantwoord wetenschappelijk onderzoek is essentieel voordat de waarde van een nieuw model kan worden vastgesteld en in de praktijk kan worden toegepast.

Technologie zonder toepassing is geen innovatie

Er zijn veel actoren die bepalen of een (ver)nieuw(d) model toegevoegde waarde heeft: allereerst de toepassers (waaronder geneesmiddelenontwikkelaars), maar ook overheden (kaders op het gebied van ethiek, kosten, regeldruk), academia (aanbieden van nieuwe technologische mogelijkheden) en technologie aanbieders (techno start-ups, CRO's etc). TNO is van mening dat proefdiervrije innovaties essentieel zijn voor het biomedisch onderzoek, zowel uit wetenschappelijk als ethisch oogpunt. Er zijn veel interessante ontwikkelingen op het gebied van klinisch als *in vitro* onderzoek. De overheid kan deze ontwikkelingen stimuleren door gerichte en duurzame investeringen, én eenduidige wetgeving op het gebied van biomedisch onderzoek. Om de kans van slagen (=proefdiervrije methodologie die ook echt in de praktijk wordt gebruikt) te vergroten, zou geavanceerde *in vitro* technologie gekoppeld moeten worden aan mechanistisch onderzoek van menselijke ziekteprocessen. Biobanken met daarin goed gekarakteriseerd menselijk weefsels (ziek en gezond) kunnen een belangrijke rol spelen om ziektemechanismen te ontrafelen en hierdoor proefdiervrije modellen beter translationeel te maken. Ook bij deze lijn van onderzoek spelen belangrijke wetenschappelijke, wettelijke en ethische aspecten, zoals kwaliteitscontrole, logistiek, beveiliging van data en weefsels en, last but not least, privacy van donoren.

De rol van TNO is om 'beyond the hype' te kijken, door wetenschappelijke onderbouwing van nieuwe onderzoek aanpakken en – door de contacten met bedrijfsleven – het aanbod van innovaties te matchen met de industriële vraagstellingen en daarmee de implementatie in de praktijk.

Schriftelijke inbreng Rondetafelgesprek “ontwikkeling proefdiervrije onderzoeksmethoden”, vaste commissie voor Economische Zaken, 14 september 2017.

Dr. Jan van der Valk, 3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, Fac. Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht.

Stellingen

1. Stel als landelijke norm vast om voorafgaande proefdiervrije methoden te vermelden in de aanvraag voor een vergunning tot het doen van dierproeven.
2. Proefdiervrije methoden dienen vrij toegankelijk te zijn. Het patenteren van academisch intellectueel ‘eigendom’ dat verkregen is met gemeenschapsgeld, en het patenteren van methoden die (kunnen) leiden tot vervanging, vermindering of verfijning van dierproeven moet worden voorkomen.
3. Wil Nederland in 2025 zich inderdaad kunnen profileren als wereldleider proefdiervrije innovaties is een sterke centrale regie noodzakelijk.

Uitleg

Ad. 1. Huidige onderzoek met proefdiervrije modellen

In Utrecht wordt onderzoekers gevraagd om bij hun aanvragen voor een vergunning tot het doen van dierproeven, voorafgaande proefdiervrije methoden te vermelden in de aanvraag. Op deze manier wordt meer inzicht verkregen in de toepassing van proefdiervrije methoden en kan een betere afweging worden gemaakt of de 3V's zijn meegenomen in de opzet van het gehele onderzoek.

De Universiteit Utrecht heeft deze stap opgenomen omdat het gebruik van dierproefvrije methoden niet hoeft te worden geregistreerd. Het 3Rs-Centrum ULS heeft in samenwerking met de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht onderzoek gedaan naar de toepassing van deze methoden in laboratoria waar dierproeven worden uitgevoerd. De uitkomsten laten zien dat in veel gevallen onderzoek vooraf plaatsvindt met proefdiervrije modellen. Door deze voorafgaande studies worden veel proefdieren bespaard. De Universiteit legt de lat hoog en wil minder gebruik van proefdieren. Daartoe dus de specifieke vraag aan onderzoekers naar proefdiervrije onderzoeksmethoden.

Graag zien we deze ‘best practice’ uit Utrecht landelijk toegepast: Stel als landelijke norm vast om voorafgaande proefdiervrije methoden te vermelden in de aanvraag voor een vergunning tot het doen van dierproeven.

Context:

Hoe wordt het adagium van vervangen, verminderen en verfijnen in de praktijk geïmplementeerd? In Utrecht wordt al veel onderzocht met proefdiervrije modellen. De Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht heeft in haar Strategisch Plan 2017-2021 o.a. “*kennis en inzichten rond het duurzaam en verantwoord omgaan met dieren in de samenleving*” centraal gesteld via Sustainable Animal Stewardship (SAS). Binnen dit brede streven krijgt het welzijn van proefdieren en de 3V's bijzondere aandacht.

De UU waarborgt het welzijn via de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, dat nauw samenwerkt met het 3Rs-Centre Utrecht Life Sciences, het “alternatieven voor dierproeven” centrum bij de Faculteit Diergeneeskunde. Door constante afstemming worden alternatieven voor dierproeven (tegenwoordig 3V-methoden genoemd) waar mogelijk toegepast.

Ad. 2 Patenteren van academische onderzoeksresultaten

Bovenstaande is alleen goed mogelijk als de proefdiervrije methoden ook vrij toegankelijk zijn. Op dit moment worden veel nieuwe methoden ontwikkeld die mogelijk ook het proefdiergebruik terug kunnen dringen. Het ontwikkelen van deze methoden kost veel (gemeenschaps)geld.

Het patenteren van (wetenschappelijke) uitvindingen geeft de mogelijkheid het intellectuele eigendom te beschermen en de ontwikkelkosten terug te verdienen. Van de andere kant werpt het een belemmering op in het gebruik. Met name wanneer het niet direct om een eindproduct gaat, of om

een alternatief voor een dierproef, kan men zich afvragen of zo'n drempel wenselijk is. In veel gevallen moeten andere wetenschappers die onderzoek doen met gemeenschapsgeld hier (ook) een prijs voor betalen om deze methoden te gebruiken in hun onderzoek. We zien in enkele gevallen dat gebruik van deze methoden zo duur is, dat ander onderzoek daardoor wordt belemmerd.

In het geval van modellen die (kunnen) leiden tot vermindering of zelfs vervanging van dierproeven, is het onwenselijk dat een patent het gebruik hiervan belemmert. De Organisatie voor Economische Ontwikkeling (OESO/OECD) schrijft hierover in haar "Test Guidelines for the Testing of Chemicals":

*"The OECD presently will not develop Test Guidelines that require the use of a unique instrument or process owned by a patent. One reason for this is that the method should be readily available to all potential users: another is to avoid market monopoly of an OECD test method by a private company."*ⁱ

Eén van de voorwaarden voor het toepassen van proefdiervrije modellen is dus dat deze zo laagdrempelig mogelijk worden aangeboden.

Hoewel het patenteren van nieuwe methoden het intellectuele eigendom beschermt, kan deze dus ook een drempel opwerpen voor de toepassing daarvan.

Proefdiervrije methoden dienen vrij toegankelijk te zijn. Het patenteren van academisch intellectueel 'eigendom' dat verkregen is met gemeenschapsgeld, en het patenteren van methoden die (kunnen) leiden tot vervanging, vermindering of verfijning van dierproeven moet worden voorkomen.

Ad. 3 Agenderen en regisseren

De staatssecretaris van EZ heeft in zijn brief aan de Tweede Kamer dd. 6 juli 2017 aangegeven de regie op zich te nemen voor de transitie Proefdiervrije innovatie. Vanuit die rol heeft hij samen met de staatssecretaris van OCW aan het NCad, de KNAW en het RIVM de opdracht gegeven om samen met het veld een Agenda Proefdiervrije Innovatie op te stellen.

Er zijn vele partijen betrokken, waaronder ook CCD, ZonMW, Topsectoren, IvD Platform, Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde, Biotechnische vereniging, etc. Mede daardoor is het een complex proces. Het is daarom van groot belang dat de leden van de Commissie EZ van de TK in de komende jaren zich met regelmaat op de hoogte blijven stellen over de opzet van de agenda de voortgang in het uitwerken van de agenda en de ontwikkelingen in het veld die van invloed kunnen zijn op de agenda. Een bijzonder aandachtspunt is de coherentie tussen de agenda en de besteding van de beschikbare financiële middelen. Wil Nederland in 2025 zich inderdaad kunnen profileren als wereldleider proefdiervrije innovaties is een sterke centrale regie noodzakelijk.

ⁱ (1) OECD (2005). *Guidance Document No. 34 on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (3rd Version)*, 25 January 2005, 96pp. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.

Website

[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2005\)14](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2005)14)

MEMO

Aan: Vaste Kamercommissie voor Economische Zaken
Van: Dr. Ingrid Geesink, themacoördinator Ziekte en Gezondheid, Rathenau Instituut
Datum: 05/09/2017
Betreft: Schriftelijke inbreng van het Rathenau Instituut voor het rondetafelgesprek *Ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden* op 14 september 2017

Van aap naar beter: Een verkenning en dialoog over proeven met apen

Het kabinet ambieert om Nederland in 2025 internationaal koploper dierproefvrije innovatie te laten zijn. Verschillende initiatieven zijn al in gang gezet om die doelstelling te halen. Het Rathenau Instituut deed op verzoek van het ministerie van Onderwijs, Cultuur en Wetenschap verkennend onderzoek onder stakeholders naar het gebruik van apen als proefdier. Daaruit blijkt dat het alternatief voor proeven met apen niet bestaat. Belanghebbenden delen de toekomstvisie dat niet langer gezocht moet worden naar een model dat apen één op één vervangt. Onderzoek moet zich richten op andere manieren om de volksgezondheid te waarborgen; naar innovaties die proefdiervrij zijn. Over de snelheid waarmee dit kan worden bereikt, verschilt men wel van mening.

De aap is het meest omstreden van alle proefdieren vanwege de nauwe verwantschap met de mens en de maatschappelijke en politieke wens om leed bij deze dieren te voorkomen. De Nederlandse wet maakt daarom een extra uitzondering voor onderzoek met apen: proeven mogen alleen plaatsvinden als er geen alternatieven zijn, en geen dieren van een andere soort kunnen worden ingezet.

Door de Tweede Kamer is eerder de wens uitsproken om geheel te stoppen met proeven met apen, mits dit geen nadelige gevolgen heeft voor “het onderzoek dat strikt noodzakelijk is voor de bestrijding van levensbedreigende ziekten en uitbraken van infectieziekten, die de volksgezondheid bedreigen”.

Aan het Rathenau Instituut is een verkenning gevraagd naar:

- De stand van zaken op het gebied van alternatieven met apen, nu en in de nabije toekomst,
- Hoe zo snel mogelijk gekomen kan worden tot een plan voor afbouw naar nul bij het BPRC en andere Nederlandse onderzoekscentra, zonder dat dit gevolgen heeft voor de volksgezondheid.

Januari 2017 heeft het Rathenau Instituut de resultaten van deze verkenning gepubliceerd, die onder meer gebaseerd zijn op een systematische stakeholderdialoog, in het rapport ‘Van aap naar beter’.

Conclusies

1. Op dit moment wordt er voor verschillende typen onderzoek en verschillende doeleinden onderzoek aan apen gedaan. Een deel daarvan wordt gedaan in het kader van de bestrijding van levensbedreigende ziekten en uitbraken van infectieziekten.



Rathenau Instituut

2. Uit de stakeholderdialoog blijkt dat er brede consensus is dat de sterke focus op alternatieven niet helpt om het aantal dierproeven met apen te verminderen. Als het doen van dierproeven met apen niet wenselijk is, moet opnieuw de vraag centraal staan: welke kennis over gezondheid is er nodig en hoe kan deze zonder proefdieren ook worden verkregen?
3. Als het noodzakelijk is en wenselijk wordt gevonden om een faciliteit te behouden voor het doen van onderzoek in het kader van de bestrijding van levensbedreigende ziekten en uitbraken van infectieziekten, dan zullen de daarbij behorende financiële lasten geaccepteerd moeten worden.

Hoeveel en welk onderzoek met apen wordt er gedaan in Nederland?

In Nederland wordt op drie locaties onderzoek gedaan met apen. Naast het Biomedical Primate Research Centre (BPRC) in Rijswijk, wordt er ook onderzoek met apen gedaan aan het Erasmus Medisch Centrum te Rotterdam en aan het Herseninstituut te Amsterdam. De voorziening aan de Radboud Universiteit Nijmegen is eind 2016 gesloten.

Tabel 1: Aantal ingezette apen voor proeven per instelling in 2015

	Resusapen	Java-apen	Marmoset-apen	Totaal
BPRC Rijswijk	87	26	91	204
Erasmus MC Rotterdam		21		21
Herseninstituut Amsterdam	6			6
Radboud Universiteit Nijmegen	3			3
Totalen in Nederland	96	47	91	234

Bron: NVWA (2016) *Zo doende 2015*, BPRC (2016), *Proefdierkundig jaarverslag 2015*, interviews 2016

Het BPRC heeft als enige instelling een fokkolonie van circa 1500 apen waarvan elk jaar ongeveer 200 tot 250 dieren worden ingezet voor experimenten. Van de apen die in 2015 voor onderzoek werden gebruikt, werd 59% ingezet voor translationeel onderzoek gericht op onder meer de ontwikkeling van vaccins en infectieziektebestrijding, en daarnaast ook voor transplantatiegeneeskunde, MS, tuberculose, reuma en andere ziektes. 41% van de apen werd ingezet voor fundamenteel wetenschappelijk onderzoek, met name voor onderzoek naar de hersenen, het immuunsysteem en virale infecties.

Experimenten met apen voor wettelijk verplicht veiligheidsonderzoek naar nieuwe producten vinden nauwelijks plaats in Nederland. Het gebruik van apen voor het ontwikkelen en testen van cosmetica en recreatieve drugs of voor defensiedoeleinden is in Nederland verboden, evenals het gebruik van mensapen voor biomedisch onderzoek.

Zijn er alternatieven voor onderzoek met apen?

Er zijn meerdere alternatieve onderzoeksmethoden en technologische ontwikkelingen die bijdragen aan vermindering, verfijning en vervanging van onderzoek met apen. Dit heeft echter niet geleid tot volledige afbouw van het onderzoek met apen. Uit de interviews met belanghebbenden en de stakeholderdialoog die het Rathenau Instituut organiseerde, is gebleken dat er brede consensus is dat de huidige focus op alternatieven niet zal leiden tot het verdwijnen van onderzoek met apen. Zolang de mogelijkheid er in principe is, zullen apen ingezet worden voor wetenschappelijk onderzoek.

Om van kennis
verandering
interactie
debat
technologische
de wetenschap

Is het mogelijk om volledig te stoppen met het onderzoek met apen?

Op basis van de verkenning zien wij twee mogelijkheden voor verdere vermindering van onderzoek met apen:

- Optie 1: Alleen onderzoek met apen toestaan voor infectieziekte bestrijding met acute gezondheidsdreiging. Dit zal naar verwachting leiden tot een reductie van een derde tot de helft van al het onderzoek met apen in Nederland. Dit betekent waarschijnlijk dat de locaties in Amsterdam en Rotterdam gesloten worden en dat de huidige fokkolonie van het BPRC wordt afgebouwd. Verdere afbouw kan als we internationale afspraken maken welk onderzoek in Nederland wordt gedaan en wat in andere landen. Het BPRC is dan niet kostendekkend.
- Optie 2: Verdere versterking van de maatschappelijke toetsing en verantwoording van het wetenschappelijk onderzoek met apen. Sommige stakeholders benadrukken het belang van fundamenteel wetenschappelijk onderzoek met apen, zonder acute gezondheidsdreiging. Dit vraagt wel een verdere discussie en articulatie van wat maatschappelijk noodzakelijk en als ethisch verantwoord wordt gezien.

Wetenschappelijk onderzoek nodig om tot een proefdiervrije ontwikkeling van geneesmiddelen te komen

Geachte leden van de Tweede Kamer,

De ambitie van de staatssecretaris om een proefdiervrij onderzoeks- en geneesmiddelontwikkeling klimaat te bewerkstelligen in 2025 is een ambitieuze maar noodzakelijke stap om helder te krijgen welke technologie en wetenschappelijke ontwikkeling echt noodzakelijk zijn om tot een proefdiervrije wetenschap te komen. Immers: *Necessity is the mother of invention*.

Daarbij moet wel rekening gehouden worden met een aantal factoren binnen het wetenschappelijk onderzoek.

Zo heeft het financieren van de ontwikkeling van alternatieve technologieën als doel op zich vrij weinig opgeleverd, niet alleen in Nederland maar wereldwijd. Dit heeft een aantal oorzaken die welbekend zijn. De meest saillante argumenten zijn: er is een lange adem voor nodig en overstijgt de tijdsduur van de subsidies, na ontwikkeling vindt er geen validatie plaats omdat dit kostbaar en weinig innovatief werk is, dat wetenschappers niet aanspreekt, er is geen duidelijke afnemer van deze technologie, of de nieuwe technologie is te beperkt in reikwijdte ten opzichte van de dierproef. Hierdoor is er een woud van in de kiem gesmoorde alternatieven die met gemeenschapsgeld zijn ontwikkeld maar niet verder gebruikt worden.

Tegelijkertijd levert wetenschappelijk onderzoek wel degelijk veel mogelijkheden voor alternatieven. Een treffend voorbeeld hiervan is miniaturisatie van humane organen en weefsels in 'organ on a chip' systemen of organoiden om bijwerkingen van nieuwe geneesmiddelen in de mens kunnen voorspellen. Ze zijn niet à priori ontwikkeld om een dierproef te vervangen, maar komen voort uit fundamenteel onderzoek.

De alternatieven maken gebruik van menselijk weefsel en hebben daarom niet de beperking van proeven in dieren die vaak anders reageren dan mensen. Daarom levert het waarschijnlijk veel meer om vooral projecten te subsidiëren die proefdiervrije technologie ontwikkelen om fundamentele vraagstukken te beantwoorden.

Ontwikkelingen in proefdiervrije methoden floreren wanneer deze gedaan om fundamenteel onderzoek in menselijk weefsel te doen, en stagneren wanneer deze een doel op zich worden.

Maar ook als deze route voor de ontwikkeling van alternatieven gevolgd wordt, blijft de transitie naar een proefdiervrije onderzoekswereld een langzaam en moeilijk proces. Tot die tijd blijven dierproeven veelgebruikt in onderzoek en geneesmiddelontwikkeling, zonder dat in de meeste gevallen duidelijk is wat waarde is van dit onderzoek is. En welke diermodellen beter in staat zijn om bepaalde vraagstukken te beantwoorden dan andere.

Daarom is onderzoek naar het gebruik van proefdieren in het verleden zeer belangrijk, omdat de ervaring leert, dat dat in relatief korte tijd tot een vermindering van dierproeven kan leiden. Bij dit soort onderzoek worden eerdere resultaten van dierproeven bestudeerd en de meerwaarde vastgesteld en of de resultaten relevant zijn voor de mens.

Vaak kiest men voor dierproeven op basis van wetenschappelijk nooit bewezen aannames of traditie. Door aan te tonen dat die aannames niet kloppen kan een substantiële reductie van proefdier gebruik leiden. Zo heeft ons eigen retrospectief onderzoek bijgedragen aan een revisie van de manier waarop kopieën van biotechnologische geneesmiddelen (biosimilars) worden onderzocht op veiligheid, en het inzicht dat veiligheidsstudies in biotechnologische geneesmiddelen maar een beperkte meerwaarde hebben.

Binnen de wetenschap wordt veel gebruik gemaakt van ziektemodellen in dieren om ziekteprocessen in de mens beter te begrijpen of om de werkzaamheid van een experimenteel geneesmiddel te testen. Ook deze diermodellen worden veelvuldig gebruikt zonder dat de voorspellende waarde voor ziekte bij de mens bekend is. Wanneer de echte waarde van deze modellen objectief kan worden vastgesteld, kan veel overbodig proefdierwerk worden vermeden. Op dit moment is onze groep bezig met deze validatie met de bedoeling een register op te stellen van diermodellen van ziekte die zin hebben.

Dit register kan ook een goede basis geven voor het ontwikkelen van alternatieve technologieën omdat men de alternatieven kan toetsen aan een gevalideerd diermodel. Naast snelle resultaten en directe gevolgen in het proefdierbeleid is een bijkomstig voordeel ons onderzoek dat het relatief

goedkoop is omdat gebruik gemaakt wordt van bestaande data. Bovendien kan het dierexperimentele commissies van onderzoeksinstituten helpen om goed gebruik van dierproeven te bevorderen.

Om te weten waar kansen liggen voor nieuwe alternatieve methodes, is het noodzakelijk diermodellen door te lichten en te bepalen welke diermodellen voorspellende waarde hebben.

Met vriendelijke groet,

dr. ing. P.J.K. van Meer

Schriftelijke Inbreng Rondetafelgesprek implementatie Proefdiervrije Onderzoeksmethoden

Vaste kamer-commissie Economische Zaken

Tweede Kamer, 14 september 2017

Prof. Dr. Aldert H. Piersma

Reproductietoxicoloog

RIVM-Bilthoven, IRAS-Universiteit Utrecht

Innovatie van veiligheidsevaluatie van stoffen en welzijn van proefdieren gaan hand in hand.

De huidige methoden voor veiligheidsevaluatie van stoffen zijn gebaseerd op standaard dierproeven die in de 80er jaren zijn afgestemd. De wetenschap is nu zoveel verder dat we op een aantal terreinen serieus proefdiervrije methoden kunnen gaan toepassen. Die nieuwe methoden zijn beter toegesneden op risico's bij de mens en gebruiken niet de omweg van de dierproef voor humane risicoschatting.

De huidige kennis van biologie, chemie en toxicologie maakt een innovatieve benadering mogelijk.

Vanuit de integratie van moderne kennis in meerdere vakgebieden worden computermodellen ontwikkeld voor fysiologische processen in de mens en voor hun verstoring door blootstelling aan chemische stoffen. Proefdiervrije methoden leveren data voor de voorspelling van schadelijkheid van stoffen in deze modellen. Op deelgebieden werkt dit al, de uitdaging ligt in de uitbreiding daarvan naar alle gebieden van de gevaar- en risicoschatting van stoffen op weg naar 100% vervanging van dierproeven.

De transitie naar implementatie van proefdiervrije methoden vergt top-down regie en investering.

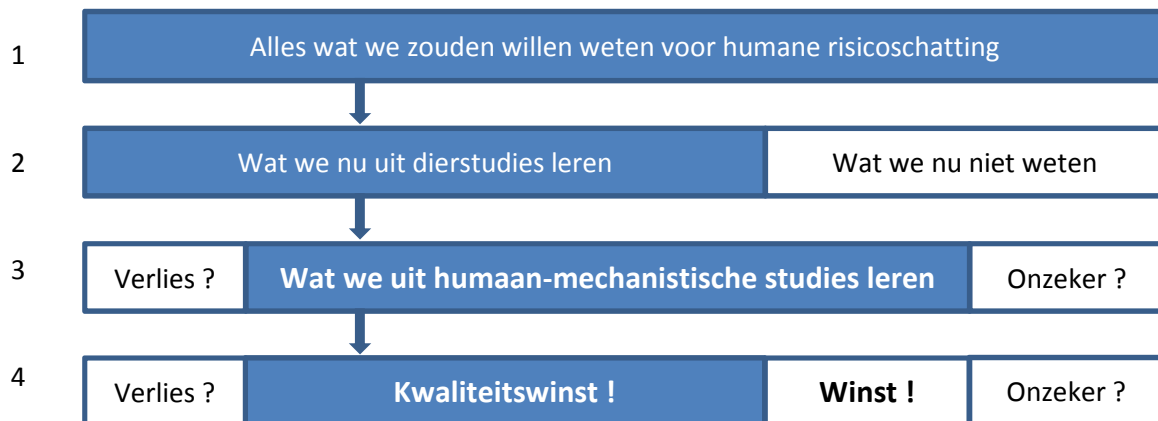
- Het klassieke uitgangspunt van 1 op 1 vervanging van dierproeven door alternatieve methoden is achterhaald, en vertraagt de vernieuwing.
- De klassieke validatie van alternatieve methoden, gebaseerd op voorspelling van effecten in het proefdier, is achterhaald en vertraagt de vernieuwing.
- Transitie betekent onder meer het denken in combinaties van proefdiervrije methoden die samen een integrale dekking geven van de mechanismen van humane toxiciteit.
- Transitie is weerbarstig, actoren in het vigerende systeem (toepassing, beleid en regelgeving) zijn veelal conservatief en beducht voor verandering.
- Top-down regie houdt in dat innovaties gericht worden op welke methoden vanuit de kennis van de biologie, chemie en toxicologie nodig zijn voor een goede risico-evaluatie (in plaats van de bottom-up ontwikkeling en promotie van individuele alternatieve methoden)
- Deze innovatie is technisch mogelijk, maar het tijdpad wordt in hoge mate bepaald door de investering die eraan gekoppeld wordt. Het gaat hierbij om honderden miljoenen euro's.
- De acceptatie en implementatie van innovaties in het internationale systeem voor de veiligheidsevaluatie van stoffen zijn in hoge mate afhankelijk van een stevige regie en coördinatie tussen alle betrokken partijen in wetenschap, politiek en beleid.

De transitie naar proefdiervrije risico-evaluatie is uiteindelijk een kwestie van vertrouwen in innovatieve methoden.

- De huidige proefdiervrije methoden geven een werkbaar maar toch beperkt beeld van gevaar en risico van stoffen (zie figuur).
- Er is onzekerheid over wat we missen in het huidige systeem van het meten van schadelijke effecten in dierstudies.
- De dierstudie was in de vorige eeuw de best denkbare en dus logische keuze, maar is in wezen een omweg die evenveel problemen oproept als ze oplost.

- Een innovatieve benadering richt zich op de mens en op moleculaire mechanismen waarlangs stoffen schade kunnen toebrengen, is directer, relevanter en daarom fundamenteel beter.
- Evenals elke bestaande methode heeft ook elke innovatieve benadering een onzekerheid in zich over wat we niet weten (zie figuur).
- De samenleving is zeer veiligheidsbewust, laat geen onzekerheid toe, en dat vergt een maatschappelijke discussie over relaties tussen innovatie, dierenwelzijn, veiligheid en acceptatie van onzekerheden.
- Het innovatieve proefdiervrije systeem zal bewezen, evident, principieel beter moeten zijn, zodat de noodzaak tot transitie voor alle betrokkenen vanzelfsprekend wordt.

Schematische vergelijking van 1. Idealiter gewenste informatie voor veiligheidsevaluatie; 2. De huidige beperkte kennisomvang uit dierstudies; 3. Een proefdiervrije benadering direct gericht op de mens, met informatie- en kwaliteitswinst maar mogelijk met andere beperkingen; 4. De winst- en verliesrekening; waarbij elke benadering een onbepaalde rest-onzekerheid in zich heeft.



Position paper Rondetafelgesprek ontwikkeling proefdiervrije onderzoeksmethoden

Vaste commissie Economische Zaken Tweede Kamer, 14 september 2017

Wim de Leeuw, Hoofd Instantie voor dierenwelzijn Utrecht

Aanbevelingen

1. Zorg voor een wettelijke regeling die het onderhouden en aanscherpen van kennis en bekwaamheden van betrokkenen bij dierproeven en vervangingsalternatieven garandeert.
2. Subsidieverstrekkers, ook de overheid, moeten als voorwaarde stellen dat de rapportages van het onderzoek dat door hen gefinancierd wordt voldoen aan de ARRIVE richtlijnen en dat ook negatieve en neutrale resultaten algemeen beschikbaar gemaakt worden.
3. Zorg dat een vast deel van het budget dat beschikbaar is voor de ontwikkeling en validatie van dierproefvrije methoden beschikbaar is voor het instellen en onderhouden van informatie bronnen en een kennisinfrastructuur, die een laagdrempelige beschikbaarheid van informatie over 3V methoden garandeert.
4. Zorg er voor dat er verder onderzoek gedaan wordt naar die ethische implicaties en er met betrokken partijen afspraken gemaakt worden die het makkelijker maken om nieuwe behandelingen eerder in mensen te testen.
5. Zorg er voor dat bestaande barrières die toegang tot (geanonimiseerde/gecodeerde) gegevens uit patiënten- en/of bevolkingsonderzoeken voor onderzoekers bemoeilijken in beeld gebracht worden en dat onderzocht wordt hoe deze geslecht kunnen worden.

Toelichting

Ad. 1. Een leven lang leren.

Hoe vreemd het misschien ook klinkt voor een beroepsgroep die per definitie bezig is met het vergaren van kennis, ook voor onderzoekers geldt dat blijvende bijscholing noodzakelijk is, vooral op het gebied van de methodologie en de mogelijkheden om 3V methoden toe te passen. Onder 3V methoden verstaan we, dierproefvrije modellen, methoden om het aantal proefdieren te verminderen en methoden verdere verfijning toe te passen. De Wet op de dierproeven (Wod) bepaalt dat personen die de opzet van dierproeven bepalen en/of betrokken zijn bij de uitvoering van dierproeven bevoegd en bekwaam moeten zijn. Daarnaast bepaalt de Wod dat een dierproef niet verricht mag worden als er een vervangingsalternatief voor is en dat het aantal dieren voor een project tot het minimum moet worden beperkt zonder dat de doelstellingen van het project in het gedrang komen. Er zijn vooralsnog geen wettelijke eisen gesteld voor het op peil houden en uitbreiden van kennis en bekwaamheden.

De Wod bepaalt eveneens dat de IvD's het personeel van een instelling adviseert over de 3V's. In verband hiermee zijn echter geen specifieke voorwaarden gesteld voor de samenstelling van de IvD en de wijze waarop de expertise op dit gebied wordt onderhouden.

Het is wenselijk dat, evenals dat voor diverse andere beroepen het geval is, er een verplichting tot nascholing is. Deze nascholing moet praktische handvatten bieden voor het toepassen van 3V innovaties, met ruime aandacht voor proefdiervrije methoden. De nascholing moet aansluiten bij de eigen onderzoekspraktijk, moet uitdagend en mag hier en daar ongemakkelijk zijn. Ook andere dan de biomedische deskundigheden zouden hierbij betrokken moeten worden. Dit alles scherpt onderzoekers en biedt ze meer aandacht voor andere benaderingen.

Ad. 2. Kwaliteit

Publiceren volgens de hoogste standaarden is een essentieel onderdeel van verantwoord en integer wetenschap bedrijven. Uit een publicatie moet volledig duidelijk worden waarom het onderzoek is

uitgevoerd, hoe het is opgezet, hoe het is verlopen en hoe de resultaten zijn geanalyseerd. Dit maakt een goede beoordeling en analyse van de resultaten mogelijk en verhoogt de dupliceerbaarheid en kwaliteit van onderzoek. Herhaaldelijk blijkt echter uit inventariserend onderzoek dat de kwaliteit van de publicaties in dit opzicht te kort schiet. Met het doel om de kwaliteit van publicaties te verbeteren en daarmee het onnodig gebruik van dieren te voorkomen zijn in 2010 zijn de ARRIVE guidelines¹ opgesteld. Ze zijn bedoeld voor onderzoekers en beoordelaars van publicaties. De ARRIVE guidelines zijn breed geaccepteerd, maar de implementatie door onderzoekers en wetenschappelijke tijdschriften is onvoldoende. VSNU, NFU en SGF hebben aangegeven via hun leden de navolging van de guidelines te stimuleren.

Ook negatieve en neutrale resultaten moeten, met in-achtneming van dezelfde kwaliteitscriteria, beschikbaar komen. Het aantal laagdrempelige mogelijkheden hiervoor neemt toe. Alleen op basis van rapportages die voldoen aan de gestelde kwaliteitscriteria kunnen onderzoekers verantwoorde beslissingen nemen om wel of geen proefdieren te gebruiken en als dierproeven onontkoombaar blijken, welk model dan het meest geschikte is met het oog op transleerbaarheid.

Ad. 3. Kennisinfrastructuur

Onderzoekers hebben vaak onvoldoende zicht op wat er al beschikbaar is op het gebied van (dierproef-ervangende) 3V methoden. Dit blijkt uit de dagelijkse praktijk van de Instantie voor Dierenwelzijn, maar ook uit een recente inventarisatie². Dit ligt niet zo zeer aan de onderzoekers als wel aan het feit dat die kennis grotendeels versnipperd is en niet altijd goed doorzoekbaar is. Bovendien is op dit moment een deel van die kennis niet algemeen beschikbaar. Onderzoekers, IvD's en beoordelaars moeten snel en eenvoudig toegang kunnen hebben tot goed doorzoekbare informatie over 3V methoden. Het door het NCad geadviseerde gegevenspakhuis³ kan hier een aanzienlijke bijdrage aan leveren. Daarnaast zijn er ook andere informatiebronnen nodig. Daarom is het nodig dat er niet alleen geïnvesteerd wordt in het ontwikkelen en valideren van dierproefvrije methoden en vermindering- en verfijningsmethoden, maar ook in de opzet en continuering van een kennisinfrastructuur waarmee de beschikbare informatie over 3V methoden laagdrempelig beschikbaar is en waar informatie uitgewisseld kan worden. Die kennis en informatie vormt immer de basis een bredere toepassing en verdergaande ontwikkeling van ontwikkelde innovatieve methoden.

Ad. 4 en 5. Dichter bij onszelf blijven

Een toename in de toepassing van dierproefvrije onderzoeksmethoden moet langs meerdere lijnen bereikt worden. Meer en eerder gebruik maken van de mens of het doeldier is er één van. Dit kan bijvoorbeeld door voor onderzoek t.b.v de mens meer gebruik te maken van humaan materiaal (cellen, weefsels en andersoortige monsters) via weefselbanken en het inrichten van een supply chain voor vers en vitaal humaan materiaal. Daarnaast bieden de verdere ontwikkeling en toepassing van organoids en organs-on-a-chip veelbelovende mogelijkheden.

Ook zijn er goede voorbeelden van onderzoekers die er in slagen om met minder dierproeven dan voorheen het geval was de stap naar de kliniek te maken. Dit vergt een gedegen vooronderzoek, een goede onderbouwing en een goed overleg met de beoordelende instanties, zoals de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO). Afhankelijk van de aard en opzet van het onderzoek kan deze benadering ook nieuwe ethische vraagstukken met zich meebrengen⁴.

Tot slot is het van belang dat onderzoekers onder voorwaarden makkelijker toegang kunnen krijgen tot (geanonimiseerde/gecodeerde) gegevens uit patiënten- en/of bevolkingsonderzoeken.

¹ <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>

² Van Luijk, J. The next steps towards responsible animal-based Research. Evaluation of strategies to improve scientific quality and responsible animal use in research. Thesis. 2017. ISBN: 978-94-6295-610-0

³ <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2015/11/1/ncad-advies-dataopslag> en <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-data-deel-2>

⁴ Niemansburg, S.L. The ethics of bringing Regenerative Medicine to patients: the example of orthopedics. PhD thesis. 2015. ISBN: 978-94-6295-139-6



Tweede Kamer

DER STATEN-GENERAAL

**Rondetafelgesprek Ontwikkeling van
proefdiervrije onderzoeksmethoden**
(inbreng genodigden)

Blok 2
non-gouvernementele
organisaties (NGO's)
(15.00 - 15.20 uur)

*Donderdag 14 september 2017
14.00 - 17.00 uur*

Position paper Proefdiervrij

Schriftelijke Inbreng Rondetafelgesprek ontwikkeling Proefdiervrije Onderzoeksmethoden

Vaste kamer-commissie Economische Zaken Tweede Kamer, 14 september 2017

Marja Zuidgeest, directeur Proefdiervrij

Proefdiervrij

Proefdiervrij zet zich in voor een toekomst zonder proefdieren. Dat doen wij met hart en ziel; in de wetenschap dat er steeds meer proefdiervrij onderzoek bijkomt dat dierproeven onnodig maakt. Wat wij zien is dat de wetenschap zich razendsnel ontwikkelt en in staat is om onderzoek te doen zonder proefdieren. In een wereld waarin al zoveel mogelijk is kunnen wij maar moeilijk bevatten dat er nog steeds proefdieren gebruikt worden. Kortom, proefdiervrij onderzoek is een onmisbare bouwsteen voor een betere wereld voor mens en dier.

Strategie Proefdiervrij

Om haar doel te bereiken zet Proefdiervrij in op samenwerking met wetenschappers en technologen om samen kansen te benutten waar onderzoeksmodellen op basis van humane biologie mogelijk zijn.

Denktank Aanvullende financiering alternatieven voor dierproeven

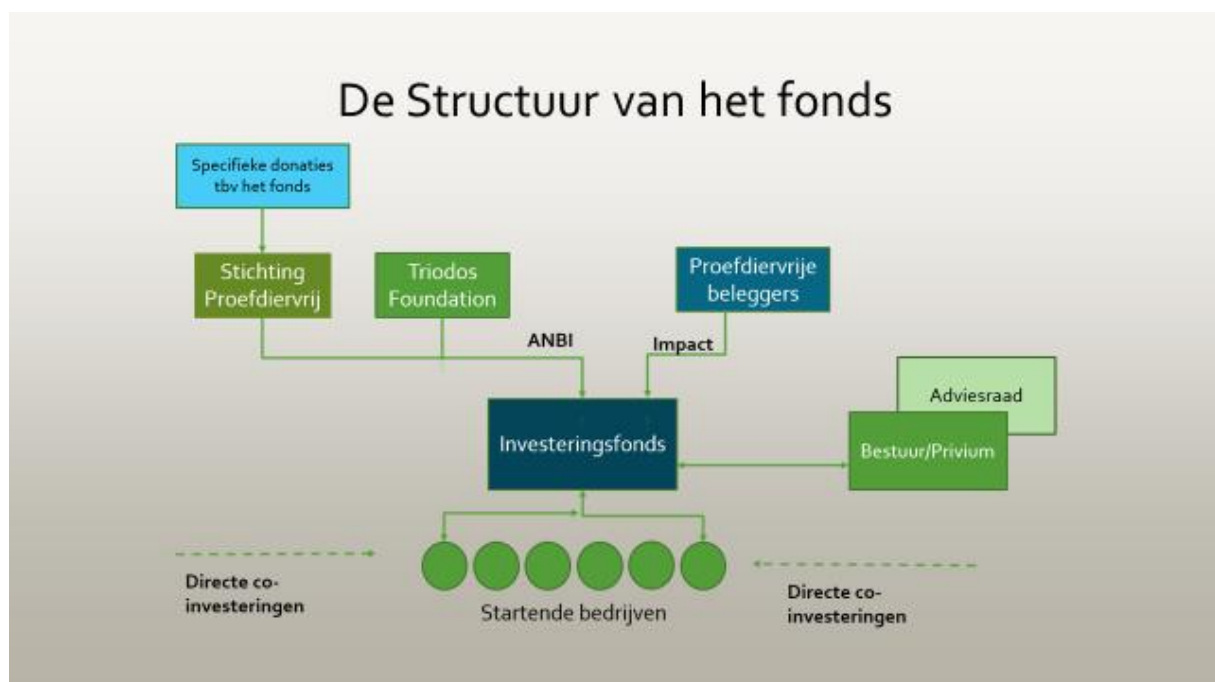
De denktank heeft in zijn advies onder meer aangegeven dat de valorisatie van proefdiervrije innovaties belemmerd wordt door de zogeheten `valley of death`. Resultaten uit publiek gefinancierd onderzoek worden onvoldoende opgepakt door private investeerders.

Staatssecretaris Van Dam heeft Proefdiervrij opdracht gegeven hiervoor een fonds op te zetten.

Proefdiervrij heeft deze opdracht van harte geaccepteerd omdat wij merken dat daar inderdaad een bottleneck zit.

Fund Humane4animals

Samen met de Triodos Foundation en Privium Fund Management heeft Proefdiervrij een model uitgewerkt voor dit fonds, genaamd Fund Humane4animals. Hieronder de beoogde structuur:



DE 3 V'S VAN DE DIERENBESCHERMING



Input RTG 14/9/2017 - afbouw dierproeven

Datum 16-8-2017

Versie 1.0

OP WEG NAAR ONDERZOEK ZONDER DIEREN: DE 3 V'S VAN DE DIERENBESCHERMING

De Dierenbescherming denkt dat het er bij proeven met dieren niet om gaat voor of tegen te zijn. De opdracht aan de samenleving is ervoor te zorgen dat ze er straks niet meer zijn. Dat vraagt allereerst om de politieke wil tot omdenken, om het oude los te laten en voor nieuwe richtingen te kiezen. Om de uitgesproken transitiedoelen te kunnen halen zijn nieuwe V's nodig.

Verruiming van denken en doen:

- ▶ Houd de focus ruim, duw dieren niet in het hokje wel of niet dichtbij de mens. Het is erg belangrijk dat het gebruik van apen stopt, maar vergeet niet dat het om nog heel veel andere dieren gaat. Het lijdend voorwerp is altijd een dier;
- ▶ Realiseer in laboratoria, onderwijsinstellingen en kweekstations positief dierenwelzijn, zorg dat dieren het ook leuk kunnen hebben. In vergelijking met de veehouderij bijvoorbeeld, is de proefdierhouderij hier veel te weinig mee bezig. Waarom kan een gezond schaap waarin een nieuwe hartklep wordt getest niet gewoon in de wei staan?

Versnelling van denken en doen:

- ▶ Besteed nu vooral tijd en geld aan innoveren zonder dieren en benut de kansen die andere wetenschapsterreinen en het bedrijfsleven bieden om sneller af te bouwen;
- ▶ Leid jonge onderzoekers nu op in dierproefvrij werken en zorg dat ze makkelijk aan eerdere onderzoeksresultaten kunnen komen om onnodig herhalen te voorkomen;
- ▶ Maak dat consumenten bewust kunnen nadenken over hun (schijn)veiligheid. Wees open over het feit dat een aap, of een rat, geen mens is en dat onderzoek zonder dieren juist daardoor vaak meer betrouwbaar is.

Verantwoording voor denken en doen:

- ▶ Zorg dat de Rijksoverheid een sterke regie neemt op de transitie naar een Nederland zonder dierproeven. Dit is nodig in dit complexe veld waarin belangen van de burger, de wetenschap en industrie – misschien meer nog dan in de veehouderij - zo nauw verbonden zijn aan het gebruik van dieren;
- ▶ Zorg dat wetenschappelijk publiceren niet langer een doel op zichzelf is en laat ook negatieve uitkomsten waardevolle data zijn. Geef altijd voorrang aan onderzoek waarvoor geen dieren nodig zijn;
- ▶ Zorg voor verheldering. De wet spreekt niet voor zich en daar heeft de praktijk last van. Vervanging van dierproeven moet niet in één adem met verfijning/vermindering worden genoemd. Geef DEC's meer handvatten om objectief vast te stellen of een onderzoek echt niet zonder dieren kan;
- ▶ Zorg voor toegankelijk taalgebruik om de samenleving meer te betrekken. Spreek niet over diermodellen, maar over muizen, zebrevinken, of apen. 'Ongerief' is geen spreektaal, heb het over hoeveel pijn of stress dieren concreet zullen hebben.



Tweede Kamer

DER STATEN-GENERAAL

Rondetafelgesprek Ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden (inbreng genodigden)

Blok 3 **Blok 3: Implementatie van** **proefdiervrije onderzoeksmethoden (15.30 - 16.15 uur)**

*Donderdag 14 september 2017
14.00 - 17.00 uur*



De vaste commissie voor Economische Zaken van de Tweede Kamer
Rondetafelgesprek over de ontwikkeling van proefdiervrije
onderzoeksmethoden op 14-09-2017

Standpunten implementatie van proefdiervrije onderzoeksmethoden

Theo Vermeire, senior wetenschappelijk medewerker RIVM, toxicoloog,
voorzitter SCHEER (Scientific Committee on Health, Environmental and
Emerging Risks)

Voor een succesvolle implementatie van proefdiervrije onderzoeksmethoden moet de aandacht gericht zijn op dierenwelzijn, veiligheid, en innovatie van methoden.

De verwachting is dat wetenschappelijke innovaties geleidelijk aan standaard onderzoeksmethoden opleveren die proefdiervrij en efficiënter zijn zonder dat de veiligheid van stoffen en producten voor mens en milieu in het geding komt. Wetenschappelijk zijn al een aantal flinke stappen gezet: resultaten van proefdiervrije methoden leveren data voor bepaalde aspecten en inzicht in schadelijke eigenschappen van stoffen. Op eenvoudige deelgebieden van de toxicologie werkt dit al, bijvoorbeeld voor irritatie en overgevoeligheid, de uitdaging ligt in de uitbreiding daarvan naar alle gebieden van de gevaarsbeoordeling en risicoschatting van stoffen.

Er liggen grote uitdagingen in de implementatie van proefdiervrije methoden.

1. Wetenschappelijke uitdagingen

Wetenschappelijke uitdagingen liggen er in de ontwikkeling van nieuwe teststrategieën gebaseerd op systemische biologie, toxiciteitsmechanismen en chemische structuurinformatie. Uitgangspunt hier dient te zijn: welke innovatieve proefdiervrije methoden hebben we of kunnen we op korte termijn ontwikkelen om de veiligheid van stoffen en producten te testen. Een dierproef wordt vervangen door een aantal proefdiervrije methoden die samen een beeld moeten geven van de schadelijkheid van een stof. De nieuwe methoden moeten voldoende gestandaardiseerd zijn en liefst beter dan de klassieke benadering. Met de nieuwe teststrategieën zullen ook effecten onderzocht moeten worden die tot nu toe minder goed in beeld kwamen in dierexperimenteel onderzoek zoals bepaalde typen hormoonverstoring en effecten op de ontwikkeling van het zenuwstelsel en het immuunsysteem. De onzekerheden door extrapolatie van proefdier naar mens vervallen. Daarvoor komt in de plaats onzekerheid in de vertaling van in-vitro-systemen naar de mens. De validatie van innovaties zal anders en sneller moeten dan tot nu toe gebruikelijk. Er zal veel aandacht nodig zijn voor de reproduceerbaarheid van teststrategieën.

A. van Leeuwenhoeklaan 9
3721 MA Bilthoven
Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl
KvK Utrecht 30276683
T 030 274 91 11
F 030 274 29 71
info@rivm.nl

Standpunten implementatie van proefdiervrije onderzoeksmethoden

2. Wettelijke-juridische uitdagingen

Implementatie vereist ook acceptatie van methoden en uitkomsten door alle belanghebbende partijen op internationaal (bijvoorbeeld EU, OESO) niveau en een zoveel mogelijk geharmoniseerde doorvoering in wet- en regelgeving. Acceptatie van nieuwe methoden betekent ook acceptatie van maatregelen over het gebruik van stoffen op grond van zowel positieve als negatieve uitkomsten van deze nieuwe methoden.

Er zijn positieve en negatieve consequenties te verwachten voor marktpartijen bijvoorbeeld wanneer meer eindpunten onderzocht kunnen worden dan nu het geval is of wanneer nieuwe criteria moeten worden geformuleerd voor indeling van stoffen. De juridische basis van de nieuwe beslissingscriteria en daarmee de impact op veiligheid en markt moet helder zijn en zoveel mogelijk internationaal geharmoniseerd.

3. Socio-economische uitdagingen

De maatschappelijke acceptatie van proefdiervrije onderzoeksmethoden is op het eerste gezicht groot. Toch vergt dit een brede maatschappelijke discussie over het evenwicht tussen dierenwelzijn, veiligheid en innovatie. De nieuwe methoden van gevaar- en risicoschatting moeten niet alleen voldoende informatie leveren over de veiligheid voor de mens. Die veiligheid moet ook zo ervaren moet worden door de maatschappij. In die discussie moet een goed beeld worden verkregen van de onzekerheden in de traditionele aanpak en die in de innovatieve benaderingen en dus van de baten (verhoogd dierenwelzijn, onderzoek met humane cellen) versus de kosten (investeringen in ontwikkeling en implementatie, winst van implementatie versus onzekerheden in de innovatieve aanpak). Bij de betrokken partijen, bijvoorbeeld wetenschappers en beleidsmakers, kunnen weerstanden tegen verandering aanwezig zijn, onder andere vanwege gevestigde belangen.

Gezien de uitdagingen kunnen een aantal aanbevelingen voor succesvolle implementatie van proefdiervrije methoden gegeven worden.

- Nodig is een stevige nationale en internationale regie en coördinatie op alle betrokken partijen in wetenschap, politiek en beleid op methodiekontwikkeling, validatie, implementatie gebaseerd op up-to-date kennis van de biologie, chemie en toxicologie en relevant voor een goede risico-evaluatie en classificatie van stoffen en producten.
- Nodig is internationale acceptatie van de nieuwe teststrategieën en van de verkregen uitkomsten op basis van snellere validatiemechanismen gebaseerd op afspraken over interpretatie en bewijskracht van gegevens en prestatie-eisen voor nieuwe methoden.
- Het tijdspad van wettelijke verankering moet zoveel mogelijke synchroon lopen met de beschikbaarheid van internationaal geaccepteerde methoden.
- Een dialoog met belanghebbenden om de nieuwe aanpak en dus ook de uitkomsten, bijvoorbeeld t.a.v. maatregelen van gebruik, te accepteren en niet alsnog over te gaan tot dierproeven bijvoorbeeld wanneer beperkingen t.a.v. gebruik worden voorgesteld.
- Een maatschappelijke discussie over de nieuwe aanpak en haar voor- en nadelen is essentieel om acceptatie hiervan mogelijk te maken, het vertrouwen te winnen en de ervaren veiligheid van het gebruik van stoffen te vergroten.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
www.ncadierproevenbeleid.nl

Contactpersoon

T0900 2800028
NCad@minez.nl

Onze referentie
NCad-2017-171

Datum: 5 september 2017

Onderwerp: schriftelijke bijdrage NCad voor rondetafelgesprek over de ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden

Geachte leden van de vaste commissie voor Economische Zaken,

Ter voorbereiding en verdieping en van het rondetafelgesprek over proefdiervrije onderzoeksmethoden, ontvangt u hierbij een bijdrage van het Nationaal Comité advies dierproevenbeleid (NCad)¹.

In antwoord op zijn verzoek om een 'afbouwschema voor dierproeven' heeft het NCad eind 2016 het advies '*Transitie naar proefdiervrij onderzoek*ⁱⁱ' aangeboden aan de staatssecretaris van EZ en samengevat in een toegankelijke whiteboard animatieⁱⁱⁱ. Dit advies en de activiteiten die naar aanleiding daarvan tot nu toe hebben plaatsgevonden leiden tot een aantal actiepunten die naar de mening van het NCad essentieel zijn voor de ontwikkeling van proefdiervrije innovaties;

1. *Voorlopers in innovatieve gezondheid, levenswetenschappen en 3V's behouden en stimuleren;*
2. *Vanuit een gezamenlijke ambitie streven naar proefdiervrije, innovatieve, excellente wetenschap;*
3. *Samenwerking van alle betrokken partijen in binnen- en buitenland;*
4. *Daadkrachtige regie op de transitie.*

1. Voorlopers in innovatieve gezondheid, levenswetenschappen en 3V's behouden en stimuleren

'In 2025 Wereldleider proefdiervrije innovaties', dat is de ambitie die Staatssecretaris Van Dam voor ons land uitsprak. In haar advies heeft het NCad aangegeven dat het op het vlak van regulatorisch veiligheidsonderzoek, dat wil zeggen het wettelijk voorgeschreven onderzoek voor de toelating van stoffen en geneesmiddelen, mogelijk moet zijn in 2025 afscheid te nemen van dierproeven, zoals voor cosmetica nu reeds het geval is. In overige domeinen van fundamenteel, toegepast en toepassingsgericht onderzoek kunnen ook zeker stappen gemaakt worden, maar die verschillen sterk per domein. Daarom heeft het NCad geadviseerd per domein streefbeelden voor dierproefvrije innovaties op te stellen. Dit advies heeft in de publieke beeldvorming echter aan nuance verloren en is daardoor te vaak ten onrechte opgevat als een totaalverbod op alle dierproeven per 2025.

De weerstand tegen dierproeven -op grond van wetenschappelijke, ethische of economische argumenten- staat veelal op gespannen voet met de behoefte aan kennis en aan de ontwikkeling van nieuwe, veiligere en betere geneesmiddelen, behandelmethoden en producten, zeker ook met betrekking tot ingrijpende of chronische aandoeningen. In ons land vindt dergelijk onderzoek en ontwikkeling

plaats in een kwalitatief hoogstaand wetenschappelijk onderzoekstelsel waarin proefdieren nog altijd een belangrijke rol hebben en dat sterk gereguleerd is door wet- en regelgeving die de intrinsieke waarde van het dier en het 3V-principe centraal stelt. Bij het vormgeven van beleid dient het risico in acht genomen te worden dat kwalitatief goed onderzoek verplaatst wordt naar het verre buitenland, waar proefdieren welzijns veelal minder goed beschermd wordt.

Datum
5 september 2017
Onze referentie
NCad-2017-171

Daarom is het gewenst om het Nederlandse beleid vooral te richten op het behoud van en verder stimuleren van de internationale voorbeeldpositie en de voorlopers op het gebied van de 3V's. Het NCad en het RIVM benaderen instellingen en onderzoekers in het buitenland die zich graag verbinden aan het Nederlandse initiatief. Zodoende is een start gemaakt met het uitbreiden van een netwerk van innovatieve wetenschappers.

2. Vanuit een gezamenlijke ambitie streven naar proefdiervrije, innovatieve, excellente wetenschap

Het NCad pleit ervoor dat afscheid wordt genomen van bestaande denkwijzen en praktijken, met name in het regulatoire veiligheidsonderzoek. Ook in wetenschappelijke kringen dringt het besef steeds meer door dat met dierproeven kennis wordt vergaard over toxiciteit en veiligheid, die suboptimaal is als het gaat over de bescherming van de mens. Resultaten uit de traditionele dierproeven worden onterecht als 100% vertaalbaar naar de mens beschouwd en data uit alternatieve of innovatieve proefdiervrije methoden als risicovol. Om verbetering van de gezondheidszorg en de wetenschappelijke kwaliteit te kunnen realiseren zijn robuuste, betrouwbare, en voor de mens meer voorspellende innovatieve onderzoeksmodellen dan dierproeven, noodzakelijk.

Om de politieke ambities waar te maken en –nationaal en internationaal– de beweging richting proefdiervrij onderzoek te versnellen is in het regulatoire risicobeoordelingsveld één-op-één vervanging van afzonderlijke dierproeven door 3V-methoden geen realistische optie.

Het NCad spreekt in haar advies *'Transitie naar proefdiervrij onderzoek'* over een *stelsel in verandering* waarbij dierproeven niet langer gezien worden als de gouden standaard. Deze verandering vergt een grote inspanning van alle betrokken actoren: wetenschap, industrie, samenleving én overheid om tot een andere risicobenadering te komen, die uiteindelijk mens en dier dient. Openheid en transparantie over de risico's en beperkingen van onderzoeksmodellen draagt bij aan een minder polariserend en meer constructief maatschappelijk debat over dierproeven en de mogelijkheden voor afbouw daarvan. Ook eerlijke communicatie over risico's, verwachtingen en de mogelijkheid van succes én falen van kansrijke innovaties dient daarin een plek te krijgen.

In een aantal velden van het fundamentele en toegepaste onderzoek zijn nieuwe wetenschappelijke ontwikkelingen en behandelmethoden nu nog afhankelijk van dierproeven. Ook in deze velden is een kritische houding ten aanzien van het voortgaan op eerder ingeslagen wegen noodzakelijk. Ook hier geldt dat voor de mens meer voorspellende innovatieve onderzoeksmodellen ingezet zouden moeten worden. In deze velden adviseert het NCad om per onderzoeksdomein streefbeeld voor proefdiervrije innovatie op te stellen om de mogelijkheden van en trends in proefdiervrije innovaties in kaart te brengen en optimaal te benutten.

In de context van kennisdeling en het beschikbaar maken van bruikbare gegevens, dienen bovendien *open data* en het publiceren van negatieve en onverwachte onderzoeksresultaten gestimuleerd te worden.

3. Samenwerking van alle betrokken partijen in binnen- en buitenland

Het NCad geeft in haar advies de complexiteit van het speelveld aan, waarbij veel (internationale) partijen betrokken zijn. De stakeholders hebben elk verschillende belangen bij dierproeven, maar delen ook waarden, zoals 'goede gezondheidszorg', 'bescherming van mens, dier en milieu', 'goede wetenschap' en 'vermindering dierenleed'. Al deze waarden zijn gebaat bij een focus op proefdiervrije innovaties. Om die innovaties te stimuleren is het van belang dat optimaal gebruik wordt gemaakt van kennis, door intensieve multidisciplinaire en cross-sectorale samenwerking.

Datum
5 september 2017
Onze referentie
NCad-2017-171

Ondanks de inzet van ZonMw, zijn dierproefvrije innovaties nog onvoldoende verankerd in het innovatiebeleid. Het zijn nog teveel afzonderlijke bewegingen in gescheiden werelden. Daardoor wordt de potentie van technische innovaties, die met een heel ander doel en binnen een heel andere onderzoekdiscipline zijn ontwikkeld, voor proefdiervrij onderzoek binnen het biomedisch onderzoek vaak niet onderkend. Hier valt dus winst te behalen.

Een van de punten die uit de evaluatie van het topsectorenbeleid naar voren kwam, was de noodzaak verbinding te zoeken met maatschappelijke vraagstukken en -ontwikkelingen. Het NCad adviseert de transitie naar proefdiervrij onderzoek integraal onderdeel te maken van het topsectorenbeleid en om dit als herkenbaar onderwerp op te nemen in de Nationale Wetenschapsagenda. Ook de koppeling naar de Europese onderzoeksagenda's, zoals Horizon2020, is daarbij van groot belang.

Dit brengt ook de noodzaak met zich mee dat het onderwerp proefdiervrije innovaties meer wordt gezien als een interdepartementale gezamenlijke opgave, waarbij het mes aan meerdere kanten snijdt;

- Betere wetenschap ten behoeve van de maatschappij;
- Vervanging, Vermindering en Verfijning van proefdiergebruik;
- Versterking van de kenniseconomie.

4. Daadkrachtige regie voeren op de transitie

Om succesvol stappen te zetten is het naar de overtuiging van het NCad noodzakelijk dat er een stevige regie gevoerd wordt op de implementatie van haar advies. Het gebruik van proefdieren raakt immers de verantwoordelijkheid van niet alleen de departementen van EZ en VWS, maar ook die van IM en DEF en OCW voor wat betreft toelatingskaders, gebruik, en kennis en innovatiebeleid. Ook in de EU raakt dit onderwerp aan de verantwoordelijkheid van vele directoraten-generaal. Mondiaal is eveneens sprake van een zeer breed veld. Om tot snellere ontwikkeling, acceptatie en implementatie te komen van proefdiervrije innovaties zal een interdepartementaal gebundelde inspanning nodig zijn, die ook structureel van aard is. Het NCad bepleit dat EZ daarop de regie voert. Het proefdiergebruik kan in ons land niet in isolement worden gereduceerd of afgebouwd, omdat de regelgeving rondom dierproeven op interdepartementaal, Europees en mondiaal niveau tot stand komt. Bovendien opereren zowel kennisinstellingen als het bedrijfsleven in internationale consortia en afzetmarkten. Dit vereist een stevige en gecoördineerde lobby en coalitievorming op Europees en zelfs mondiaal niveau. Politiek, departementen en vertegenwoordigers van de wetenschap, patiëntenorganisaties en dierenbeschermingsorganisaties moeten een actieve rol spelen in het uitdragen van de mogelijkheden.

In haar advies bepleit het NCad daarbij langs de volgende lijnen tot een uitwerking te komen.

Volgens het NCad kunnen in het *wettelijk voorgeschreven* (veiligheids-)onderzoek dierproeven binnen afzienbare tijd worden uitgefaseerd. Het RIVM werkt momenteel aan een plan van aanpak voor de gecoördineerde en interdepartementale inzet die nodig is om de benodigde aanpassing van nationale, Europese en mondiale wettelijke kaders te realiseren.

In veel *fundamenteel wetenschappelijke* en *toegepaste* onderzoeksdomeinen lijkt afbouw van het proefdiergebruik lastiger en verschillen de mogelijkheden per onderzoeksdomein. Om ook in deze domeinen een beweging in te zetten richting proefdiervrije innovaties, zullen de komende maanden, onder coördinatie van de KNAW en het NCad, de eerste *streefbeelden voor proefdiervrije innovatie* worden opgesteld, te beginnen met een pilot voor het fundamenteel wetenschappelijke domein van het hersenonderzoek. Ook voor het toegepaste onderzoek en voor het domein van dierproeven voor onderwijs en training stelt het NCad voor met pilots aan de gang te gaan die daarna een breder vervolg kunnen krijgen.

Bij de dierproeven die desondanks voorlopig noodzakelijk blijven, verdient het principe van de 3V's –en met name de V's van vermindering en verfijning- onverminderd aandacht, om een optimaal proefdierenwelzijn te waarborgen. Elk streefbeeld wordt opgesteld door experts vanuit het betreffende domein, in samenwerking met creatieve 'anders-denkers' en blijft eigendom en verantwoordelijkheid van het werkveld binnen dat domein. Streefbeelden geven richting aan de innovatie, maar zijn voldoende flexibel om experimenteren mogelijk te maken. Een systeem in transitie is immers geen lineair proces, het is een langdurig proces van richting geven, experimenteren, evalueren en bijsturen, vallen en opstaan.

Hoogachtend,
Herman Koëter,
Voorzitter Nationaal Comité advies dierproevenbeleid (NCad)



ⁱ Het NCad is in december 2014 door de staatssecretaris van EZ ingesteld als onafhankelijk adviesorgaan en heeft sindsdien negen beleids-adviesrapporten uitgebracht en twee technische Codes of Practice (*beste praktijken*) ten behoeve van het dierexperimentele werkveld. In haar werk benadert het NCad de onderwerpen van de haar gestelde adviesvragen vanuit meerdere invalshoeken: technisch wetenschappelijk, ethisch en maatschappelijk, waarbij zoveel mogelijk kennis en ervaring uit binnen- en buitenland wordt gebruikt. Ook worden experts uit binnen- en buitenland geconsulteerd, evenals maatschappelijke groeperingen. De intrinsieke waarde van het dier en het 3V-principe van de Vervanging, Vermindering en Verfijning van dierproeven staan centraal.

ⁱⁱ <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/12/15/ncad-advies-transitie-naar-proefdiervrij-onderzoek>

ⁱⁱⁱ <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/actueel/nieuws/16/12/15/white-board-animatie-transitie-proefdiervrij-onderzoek>

Datum
5 september 2017
Onze referentie
NCad-2017-171

Conservatisme leidt tot moeizame acceptatie proefdier vrije innovaties

Er worden meer proefdieren gebruikt dan nodig. Goede alternatieven zijn steeds meer voorhanden, maar acceptatie en toepassing gaat moeizaam. Waarom? Risicoaversie en conservatisme, zo concludeert Marie-Jeanne Schiffelers.¹

Jaarlijks worden in Europa zo'n 11,5 miljoen proefdieren gebruikt voor biomedische doeleinden. Vanuit de stakeholdergroepen wetenschappers, beleidsmakers en de industrie rijzen steeds meer vragen over het nut van proefdierengebruik. Zo blijken resultaten behaald met proefdierenonderzoek lang niet altijd te vertalen naar mensen. Het is daarom van belang de transitie richting 3V modellen (verfijnings-, verminderings- en vervangings- modellen) te stimuleren. Het aantal beschikbare zogenaamde 3V-modellen neemt toe. Zo kunnen steeds meer experimenten gedaan worden op bijvoorbeeld celkweken of aan de hand van computersimulaties. Dat leidt ertoe dat er soms geen dieren meer nodig zijn (vervangen). In andere gevallen worden minder proefdieren gebruikt (verminderen) en als er alsnog proefdieren worden gebruikt kan het lijden van de proefdieren verlicht worden (verfijnen).

Er zijn in veel gevallen goede alternatieven voor dierproeven beschikbaar maar de acceptatie ervan verloopt moeizaam. In juni 2016 promoveerde Marie-Jeanne Schiffelers (senior adviseur en onderzoeker bij het departement Bestuurs- en Organisationswetenschappen van de Universiteit Utrecht) op de vraag waarom deze acceptatie zo moeizaam verloopt en hoe dit proces eventueel versneld zou kunnen worden. Hierbij lag de focus op het proefdiergebruik voor de beoordeling van stoffen, producten en medicijnen op veiligheid en werkzaamheid. Dit is goed voor ongeveer een kwart van het totale proefdierengebruik.²

Conservatisme

De moeizame acceptatie wordt veroorzaakt door factoren op drie verschillende niveaus (macro, meso en micro). Zo is in onze samenleving (macroniveau) steeds meer sprake van risicoaversie. Vanuit de maatschappij en daarmee vanuit de politiek klinkt een luide roep om veiligheid. Wetten en regels die mens en milieu moeten beschermen zijn dientengevolge streng en worden steeds verder aangescherpt (mesoniveau). Hierbij is vaak onvoldoende oog voor de effecten van deze aanscherpingen op bijvoorbeeld de inzet van proefdieren. Ook leidt het tot angst om oude werkwijzen te veranderen. Producenten en beoordelaars van producten zijn daardoor vaak terughoudend in het toepassen van 3V-modellen en innovaties blijven daardoor onnodig lang hangen in de kraamkamers waar ze ontwikkeld en getest zijn (microniveau).

Kortom door de risicoaversie verloopt de transitie naar alternatieven erg moeizaam. De angst voor eventuele gevolgen als er iets misgaat door invoering van alternatieven voor proefdieren voert de boventoon. Zelfs als de alternatieven wetenschappelijk gezien de voorkeur verdienen, bijvoorbeeld omdat ze een betere voorspellende waarde hebben. Een beleidsmaker vanuit de Europese Commissie die Schiffelers in het kader van haar promotieonderzoek interviewde verwoordde het treffend als volgt: "het is beter om tien keer niet te veranderen dan negen keer een verbetering door te voeren en één keer een verslechtering." Dit conservatisme trof Schiffelers aan bij wetenschappers, de overheid, de controlerende autoriteiten en de tijdschriften die studies publiceren.

¹ Zie ook: <http://www.nporadio1.nl/wetenschap-techniek/191-waarom-we-toekunnen-met-minder-proefdieren-veel-minder-proefdieren>
https://www.ntr.nl/De-Kennis-van-Nu-Radio/139/detail/De-Kennis-van-Nu-/RBX_NTR_618523

² Zie: <https://dSPACE.library.uu.nl/handle/1874/334103>

Schijnzekerheid

Proefdiergebruik en veiligheid worden nu nog te vaak aan elkaar gekoppeld. Dit is onterecht en creëert een 'schijnzekerheid'. In veel gevallen blijkt het proefdiermodel een black box te zijn waarvan de precieze werking veel te raden overlaat. Ook het vertalen van de effecten bij het proefdier naar de mens is door talloze onzekerheden omgeven. Innovatieve testmethoden ondervangen een deel van deze problemen doordat ze beter reproduceerbaar zijn dan het diermodel en/of een grotere voorspellende waarde hebben.

Oplossingsrichtingen

De centrale vraag is dan ook hoe de moeizame acceptatie van deze innovatieve testmodellen op gang geholpen kan worden. Hiervoor is het transitie denken, dat Schiffelers in haar promotieonderzoek gehanteerd heeft en dat inmiddels ook een prominente plek heeft gekregen in het Nederlandse beleid rondom proefdiergebruik en proefdiervrij innovaties, erg behulpzaam. Dit transitie denken maakt onderscheid tussen het eerder genoemde macro-, meso- en micro niveau waarin niet alleen factoren te vinden zijn die de moeizame acceptatie veroorzaken maar waarin ook de mogelijke oplossingsrichtingen liggen.

Zo is het bijvoorbeeld op het microniveau van groot belang dat toekomstige gebruikers nauw betrokken zijn bij de ontwikkeling van de innovatieve testmodellen en bij de discussies over de inzet ervan. Verder is bewustwording van en een open discussie over de betrekkelijke waarde van dierproeven en de potentiële waarde van alternatieven belangrijk. Op het mesoniveau is het onder meer belangrijk dat er duidelijk (Europees) beleid komt. Het ontbreekt op dit moment aan een heldere Europese ambitie voor de invoer van alternatieven of een tijdspad daarvoor zoals dat voor Nederland eind 2016 wel is geformuleerd voor Nederland in opdracht van ex-staatsecretaris Van Dam.

Op het macroniveau is het van belang de discussie te voeren over ogenschijnlijk botsende waarden en belangen op het vlak van veiligheid enerzijds en innovatie anderzijds. Door dit gesprek te blijven voeren kan duidelijk worden dat veel van deze belangen congruent in plaats van conflicterend zijn.

Tot slot vraagt de transitie naar proefdiervrij innovaties commitment van en samenwerking (coöperatie) en communicatie tussen de betrokken stakeholders en een goede coördinatie van het proces. De zogeheten 4C's.

Dr. M.J.W.A (Marie-Jeanne) Schiffelers | Senior Consultant | USBO Advies | Universiteit Utrecht | Faculteit Recht, Economie, Bestuur en Organisatie | Departement Bestuurs- en Organisationswetenschap (USBO) | Bijlhouwerstraat 6, 3511 ZC Utrecht | ☎ 030-2539178/8101 | ✉ [m.j.w.a.schiffelers@uu.nl]

Blok 3: Implementatie van proefdiervrije onderzoeksmethoden

Menk Prinsen, Toxicoloog, Triskelion BV

Sinds 1982 werkzaam op het gebied van *in vitro* oogirritatie ter vervanging van de Draize test met konijnen. (Mede)ontwikkelaar van de *in vitro* test met geïsoleerde ogen afkomstig van slachtkippen (OECD testrichtlijn 438).

Introductie

Met de sterke opkomst van de chemische industrie in de 20ste eeuw werd duidelijk dat de omstandigheden op de werkplek nadelige effecten op veiligheid en gezondheid van de mens kon hebben. Een van de vele risico's bij het omgaan met (gevaarlijke) stoffen is het in de ogen krijgen van het product. Al in 1944 publiceerde de Amerikaan John Draize een artikel met daarin een beschrijving van onderzoeksmethoden voor het vaststellen van toxiciteit en irritatie van stoffen die op huid en slijmvliezen worden toegediend, waaronder de oogirritatie test bij konijnen en de LD50 (Lethale Dosis) test.

In 1961 schreef de Amerikaanse toelatingsautoriteit de "Food and Drug Administration" (FDA) deze test met konijnen (de zogenaamde Draize test) voor om stoffen te testen op hun oogirriterende eigenschappen. Internationaal adopteerde de OESO (Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling) de Draize test in 1981, gevolgd door de Europese Unie in 1984. Sindsdien zijn de OECD/EC richtlijnen verschillende keren aangepast, maar de praktische uitvoering van de test bleef onveranderd tot pas in 2012 lokale en systemische pijnverlichting voor de konijnen werd geïntroduceerd.

Vervanging Draize konijnen oogirritatietest

Begin 80-er jaren van de vorige eeuw is men al begonnen met het onderzoek ter vervanging van de Draize test, toen algemeen beschouwd als één van de meest pijnlijke veiligheidstesten. Deze toxiciteitstest werd als een redelijk simpele test beschouwd, want met een éénmalige toediening en het meten van "slechts" lokale effecten. De verwachting was dat de vervanging door een proefdiervrij alternatief 5-7 jaar zou duren. Pas in 2009 werden twee alternatieve methoden officieel erkend, maar alleen voor de identificatie van de categorie "ernstig oogirriterende" stoffen, en later in 2013 voor de identificatie van de categorie "niet-irriterende" stoffen. De overige categorie "irriterende" stoffen dient nog steeds met de Draize konijnen test geïdentificeerd te worden. Gedeeltelijke implementatie van proefdiervrije onderzoeksmethoden voor deze Draize test heeft dus nu al meer dan 30 jaar geduurd.

Oorzaken

Er zijn diverse redenen voor dit langdurige proces van validatie, acceptatie en implementatie van de proefdiervrije alternatieven. Voor het grootste gedeelte heeft dit te maken met de aard van deze specifieke test met konijnen.

De blootstelling en behandeling van de konijnen is zeer onrealistisch t.o.v. de mogelijke blootstelling bij de mens. De betrouwbaarheid van de *in vivo* (konijnen) data voor validatie van de alternatieven, met name in de categorie irriterende stoffen, is bijna nihil. Dit feit is altijd terzijde geschoven door de instanties die betrokken zijn bij de beoordeling van deze proefdiervrije alternatieven. Voor nadere details adviseer ik om de navolgende publicaties te lezen (zie bijlagen).

1. M.K. Prinsen. The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology In Vitro* 20 (2006) 78-81.
2. M.K. Prinsen, C.F.M. Hendriksen, C.A.M. Krul, R.A. Woutersen (2017). The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 85 (2017) 132-149.

Noemenswaardig is het feit dat de Household en Personal Care industrie (Procter & Gamble, Unilever, Henkel etc.) al jaren deze alternatieven voor oogirritatie gebruikt voor het testen van hun producten. Deze producten vallen over het algemeen in de categorie "irriterend", juist die categorie waarvoor de alternatieven niet zijn toegelaten.

Stellingname

Bij de implementatie van proefdiervrije alternatieven (daaronder versta ik het complete proces van introductie, validatie en acceptatie) zou ik de volgende stellingen willen deponeren:

1. Dier experimentele data moeten niet langer als de "gouden Standaard" worden beschouwd.
2. De tekortkomingen van het dierexperiment dienen in kaart gebracht te worden en de implicaties daarvan voor de implementatie van proefdiervrije alternatieven.
3. Vooraf moet met alle belanghebbende partijen een inventaris gemaakt worden van de factoren die een (regulatoire) acceptatie beïnvloeden.
4. De selectie van kandidaat proefdiervrije methode dient kritischer te worden gemaakt dan in het verleden. De methode moet een directe relatie hebben met de humane situatie en niet per se met de diertest.
5. Een 100% risicovrije (toxvrije) samenleving is "wishful thinking".

Discussion

The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage?

M.K. Prinsen *

TNO Quality of Life, Toxicology and Applied Pharmacology, P.O. Box 360, 3700 AJ, Zeist, Utrechtseweg 48, 3704 HE, The Netherlands

Received 20 June 2005; accepted 20 June 2005

Available online 1 August 2005

Keywords: Draize Eye Test; Validation; In vitro assay

1. Variability of the Draize Test

No other animal test like the Draize Eye Irritation Test has been as controversial to replacement by in vitro methods, while initially it was believed to be one of the 'simplest' animal tests to be replaced. Since the early 1980s numerous alternatives have been developed, with some being submitted to validation, but without finding a single test or set of tests for replacing the animal test. Why is this? For many of the alternatives, it soon became clear that the chosen test system had not enough relevance with respect to eye irritation as was hoped for. For instance, a test system measuring decreased sperm mobility/motility provides some information on cytotoxicity in general, but not specifically on toxicity to corneal or conjunctival tissue. The fact that the toxicity measured by the test system has to be translated to specific (rabbit) ocular toxicity is the basis for most of the problems encountered. Furthermore, the variability of the Draize Eye Test, especially in the middle range of irritancy adds to this problem. The factors contributing to this variability are meanwhile well-known and recognized by the scientific world. The variability is mainly caused by the subjective scoring by different observers and interlaboratory variability.

2. Exposure conditions in the Draize Test

What is not highlighted in the discussions so far, however, is surprisingly enough the conduct and course of the test itself, although several investigators have discussed the unrealistic exposure conditions of the Draize Eye Test, i.e., instillation in the conjunctival cul-de-sac of the rabbits eye, compared to potential human exposure (Freeberg et al., 1986; Roggeband et al., 2000).

For most routine acute and repeat toxicity tests, standard exposure times and/or delivery of dosage (orally, intravenously, etc.) are well-defined. In the dermal irritation test, for example, the entire dosage is held by a patch onto the skin for an exact period of time. In the eye irritation test, however, neither of these well-defined conditions exists. For liquids, pastes and solids, it is impossible to estimate how much and for how long the test substance stays in contact with the eye. For aqueous, non-viscous formulations the standard instillation of 0.1 ml in the conjunctival cul-de-sac of the rabbit and the holding of the eye-lids for 1 s, results in a rapid removal of the material within seconds/minutes through blinking with the nictitating membrane (third eye-lid) and grooming by the rabbit.

This contrasts with the situation for sticky pastes for example, which cannot be removed that easily. The most dramatic variation in contact time and dosage occurs with solids. Even if applied as a 0.1 ml equivalent (the content of the cul-de-sac), the actual amount of a powder/solid that stays in contact with the eye is unpredictable. More importantly, the contact time may vary from a couple of minutes to 24 h, because rinsing the eye is

* Tel.: +31 30 69 44 558; fax: +31 30 69 60 264.

E-mail address: prinsen@voeding.tno.nl

not allowed before the 24-h reading (only recently changed to 1 h for solids in the 2002 update of OECD guideline no. 405).

3. Testing of solids and variability

From ethical and scientific points of view, it is unbelievable that this situation still exists. Having carried out the test since 1981, it became increasingly difficult for me to adhere to this non-rinsing practice. Unintentionally, I discovered that the problem could be solved by manipulation of the eye-lids of the rabbit at the 1 h observation time point in such a way that any remnants of the test material present could be removed without rinsing. This process was always recorded in our reports, but never resulted in any comment on this deviation from the guideline. It is striking how few reports on eye irritation even mention the presence of remnants of powders/solids in the eye at the 1-h and/or 24-h observation time points, whereas it should be a common finding. The enclosure of solid materials up to 24 h in the conjunctival cul-de-sac, sometimes in combination with mechanical damage, can have a devastating effect on the eye. In the case of poorly water-soluble solids with distinct cytotoxic properties, the entrapped solid can rapidly cause a considerable and increasing degree of swelling of the conjunctivae, making it even more difficult for the animal to remove the material. If, at the 1-h observation, the lower eye-lid is not pulled away far enough by the observer, it can stay unnoticed that a bulk of test material lays deeply hidden in the conjunctival cul-de-sac.

Often, this forced continuous exposure for the next 24 h results in a complete closure of the eye-lids by the abundant production of colloidal discharge which often forms a sealing crust. Upon opening these sealed eye-lids, purulent discharge, and other inflammatory debris are released. The degree of swelling of the conjunctivae can be sufficiently severe such that removal of any remains of the test substance is hardly possible anymore. In the majority of these cases, the eye is permanently damaged or can only be saved by applying special care, such as regular daily cleaning and rinsing of the eye and eye-lids, often including cutting off the eye-lashes to prevent further sealing. In general, keeping the eye-lids open is essential for the recovery process, otherwise the enclosed inflammatory exudate will further damage the cornea. If no further extensive remedial treatment is given to the animal, the described exposure conditions can easily cause an initial opacity score of 1 or 2 to develop into a score of 3 or 4. Also, the eye can become vulnerable to microbiological infection (the so-called secondary inflammatory process), causing initial mild to moderate effects during the first days after exposure developing into more severe and prolonged effects during the 21 day observation period.

Without doubt such events will have occurred in other laboratories in the past, and probably will continue to occur, even with application of the present 1-h rinsing protocol for solids now in place. The events described here are of course not typical for all solids. Many of the solids are inert and form an unharmed bulk which can easily be removed by the animal or the observer, or they are well water-soluble and have already disappeared at the 1-h observation time point. However, the overall problem makes the Draize Eye Test highly variable, even *before* the actual scoring of effects takes place. Therefore, even if the scoring could be made more objective and less variable, the scores recorded will still represent a large variation. To my knowledge, this important source of variability has never been discussed, while its implication for any validation of alternative in vitro methods is very important.

4. Draize Test results and validation

Does this mean that we cannot use the data from the Draize Eye Test for validation purposes at all? It seems logical to assume that non-irritating or severely irritating hydrophilic liquids and non-irritating solids produce reliable reactions in the Draize Eye Test. Extremely variable results, however, will be obtained with sticky pastes and solids in the moderate to severe range of irritancy and with hydrophobic solutions. Such data will be unsuitable for the use as benchmarking data in the validation of in vitro methods. Apart from that, the kind of entrapment of solids in the rabbit eye has little relevance, because it is highly unlikely to occur in humans, accidentally or intentionally. For that reason, the low-volume eye test (LVET) has been developed by the Procter and Gamble company (Griffith et al., 1980). In this test, one-tenth of the original volume of 0.1 ml is administered directly onto the cornea of the rabbit and this is believed to mimic human exposure more realistically.

From a safety standpoint, it is understandable that the Draize Eye Test is still required by regulatory agencies, mostly because of the perceived higher sensitivity of the rabbit eye compared to the human eye. However, this perception has more to do with these exaggerated exposure conditions rather than with specific ocular tissue sensitivity. In that light, it is praiseworthy that, several years ago, European regulatory agencies took the initiative to accept in vitro screening of severe eye irritants by using isolated eyes or corneas, or the Hen's-egg chorioallantoic membrane (HET-CAM assay).

Recently, the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) of the United States of America initiated a programme to officially adopt these alternatives

into the US-guidelines for the screening of severe eye irritants. In this programme, the methods and the data available are evaluated by a panel composed of national and international experts. Although there was a general awareness amongst the panel members concerning the variability of the Draize Eye Test, the general attitude was still to attempt to fit in the *in vitro* methods with the Draize Eye Test, rather than to address the validity of the latter test. All emphasis is again on the statistical evaluation of the *in vivo* and *in vitro* data. It is true that the nature and quality of the *in vivo* and *in vitro* data was examined in more detail, but mostly with the intention of modifying/optimizing the *in vitro* assays, rather than questioning the relevance of the *in vivo* data. To some extent the flaws of the rabbit test were acknowledged, but this did not lead to any real changes to the conduct of the test itself, whereas *in vitro* methods are still judged against this “Gold Standard” and repeatedly forced to have their methodologies adapted to the rather unrealistic conditions of the Draize Eye Test.

To give an example, ICCVAM evaluated the data of the EC/HO validation study (Balls et al., 1995) in which four candidates (Isolated Chicken Eye test, Isolated Rabbit Eye test, HET-CAM assay, and Bovine Corneal Opacity and Permeability test) selected by ICCVAM participated. Twenty-two out of the 59 substances examined in this study were severe irritants and, for the purpose of selecting *in vitro* methods for screening severe irritants, the data of these compounds (tested by four labs per method) were useful. For the Isolated Chicken Eye test (ICE), the ICCVAM panel concluded that it could identify severe irritants but with a high false-negative rate, especially for solids. Of the 22 compounds, the ICE identified 13 as severely irritating, 4 as irritating and 5 as non, or borderline, irritating. The latter five compounds were all solids. Remarkably, most of the *in vitro* methods participating in the EC/HO study also did not identify these compounds as severe irritants. Instead of questioning the *in vivo* exposure conditions of solids, ICCVAM considered this to be a deficiency of the *in vitro* method. Therefore, ICCVAM recommended that the test method needed to be optimized with respect to the exposure conditions for solids. Considering the fact that we have to deal with *in vivo* exposures to solids ranging from a couple of minutes up to 24 h, then standardization of the Draize Eye Test would be an appropriate recommendation.

5. How to proceed?

All suggestions for optimization/modification—how ever well intended they may seem to be—are driven by the thought that they are needed because there is not sufficient correlation with the *in vivo* “Gold Standard”

test. The fact that these are totally uncontrolled and non-standardized conditions in the *in vivo* test, which cannot be modeled accurately by any of the *in vitro* tests, seems to be ignored or of no concern to regulatory bodies or to validation bodies like ICCVAM and EC-VAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods). Until the problems with the Draize Test discussed in this paper are solved and taken account of, all efforts to validate *in vitro* tests as complete replacements for the *in vivo* test will be doomed to fail.

Since the first international (pilot) validation (Commission of the European Communities, 1991) of alternatives for eye irritation was started in 1988, numerous validations using optimized/modified/standardized *in vitro* protocols have been carried out without any substantial success. We seem to be caught in a vicious circle and, by now, after almost 18 years of validation, I think it is time to conclude that further attempts will be futile, if we keep on using “old” *in vivo* data or new data generated by the current protocol for comparison. In fact, since the very first validation, most of the *in vitro* tests have been used in practice for decision making by many companies and have been accepted in Europe for screening of severe irritants. Having carried out the Draize Eye Test since 1981 and applied an *in vitro/ex vivo* screen prior to any *in vivo* testing since 1992, my recommendation would be a multi-way approach, as follows:

- (a) Immediate implementation in the guidelines (legislation) of the most current *in vitro* methods in the testing strategy for screening of severe irritants, following current EC practice (CA, 2002). Many contract or company laboratories already have extensive experience with the existing *in vitro* alternatives. Moreover, severe irritancy is not based on the *in vitro* screen alone but often confirmed by other tests, such as skin irritation/corrosion (*in vivo* and *in vitro*) and acute dermal toxicity. Also indications of the possible (severe) irritating properties of a compound are often known by the manufacturer. Furthermore, most new substances will be tested in a battery of acute toxicity tests, covering skin and eye irritation, oral, dermal and inhalatory toxicity and skin sensitization, which require a tiered decision-making process by the investigator with respect to dose and test concentration selection. For that purpose, it is always useful to know as early as possible if one is dealing with an irritating (reactive) compound or not.
- (b) Internationally, the Draize Eye Test should be re-evaluated taking a more realistic procedure like the LVET into consideration. The exposure conditions should be standardized for liquids and solids, i.e., a fixed exposure time, amount and mode of instillation (directly onto the cornea instead of in

the conjunctival cul-de-sac). In the EC guidelines there is the provision that substances causing eye irritation may also be examined for the effect of rinsing after a fixed exposure time, but in practice this possibility seems not to be followed. For exceptional circumstances, like ocular therapeutics or pesticides, the non-rinsing protocol could be maintained because in daily practice rinsing the eyes after (accidental) exposure to pesticides by the user may not always be possible.

- (c) Together with the immediate implementation of in vitro methods and standardization of the Draize Eye Test, the possibilities for a more mechanistically-based development and optimization of in vitro methods should be an ongoing process. The parallel testing mentioned under point (a) would also offer the unique possibility to further validate the in vitro methods for the non-severe irritating category of compounds, and to test any new (mechanistically-based) modification both in vitro and in vivo.

References

- Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H., Spielmann, H., 1995. The EC/HO international validation study on alternatives to the draize eye irritation test. *Toxicology in Vitro* 9 (6), 871–929.
- Commission of the European Communities, 1991. Collaborative study on the evaluation of alternative methods to the eye irritation test. EC Document XI/632/91, V/E/1/131/91.
- CA, 2002. Competent Authority meeting of the European Communities. Agreement on the use of positive results obtained in non validated in vitro eye irritation tests.
- Freeberg, F.E., Nixon, G.A., Reer, P.J., Weaver, J.E., Bruce, R.D., Griffith, J.F., Sanders, L.W., 1986. Human and rabbit eye responses to chemical insult. *Fundamental and Applied Toxicology* 7, 626–634.
- Griffith, J.F., Nixon, G.A., Bruce, R.D., Reer, P.J., Bannan, E.A., 1980. Dose–response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. *Toxicology and Applied Pharmacology* 55, 501–513.
- Roggeband, R., York, M., Pericoi, M., Braun, W., 2000. Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes of undiluted model liquid detergent products. *Food and Chemical Toxicology* 38 (8), 727–734.



The Isolated Chicken Eye test to replace the Draize test in rabbits



Menk K. Prinsen ^{a,*}, Coenraad F.M. Hendriksen ^b, Cyrille A.M. Krul ^{c,d},
Ruud A. Woutersen ^{d,e}

^a Triskelion B.V., P.O. Box 844, 3700 AJ Zeist, The Netherlands

^b Utrecht University/Institute for Translational Vaccinology, P.O. Box 450, 3720 AL Bilthoven, The Netherlands

^c University of Applied Sciences Utrecht, Institute for Life Sciences & Chemistry, P.O. Box 12011, 2501 AA Utrecht, The Netherlands

^d TNO Innovation for Life, P.O. Box 360, 3700 AJ Zeist, The Netherlands

^e Wageningen University Research Centre, Department Toxicology, Wageningen, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2016

Accepted 27 January 2017

Available online 10 February 2017

Keywords:

Isolated Chicken Eye test

ICE

Chicken Enucleated Eye test

CEET

Alternative testing method

Eye irritation *in vitro*

Draize test

ABSTRACT

In 1944, Draize et al., published a paper entitled “Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes”. The Organization for Economic Co-operation and Development published their first guideline on eye irritation in 1981, using rabbits. In the early eighties the development of alternative non-animal tests to replace the Draize eye test started. The first attempts to validate alternative tests for eye irritation were considered to be relatively simple by comparing *in vitro* and *in vivo* irritation index scores. In the early nineteen-eighties, we introduced the use of isolated eyes as an alternative test for the Draize eye irritation test. What was expected to be a process of several years, however, turned out to be a decades spanning process still not fully completed. For a large part, this can be attributed to the nature of the *in vivo* test in rabbits, which is more complicated and compromised than originally believed. This paper describes, most chronologically, the development, performance, validation and application of the Isolated Eye Test and, in broader perspective, the international validation and acceptance of this alternative test by regulatory authorities and agencies.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Before industrialization, eye defects were mainly caused by physical trauma or by diseases caused by malnutrition, bacterial infection or parasites. In the twentieth century, when (chemical) industrialization strongly developed, it became apparent that conditions at the workplace could have distinct adverse effects on health and safety of employees. Acute and long-term exposure to a variety of industrial chemicals were responsible for a range of diseases, varying from relatively mild, non-life threatening phenomena, such as dermatitis, to incurable, lethal conditions such as cancer. After World War II, the chemical industry rapidly increased and workers became organized and more concerned with the potential risks they could encounter in the workplace. Consequently,

the need for identifying health hazards and worker's protection became an important issue in most industrial countries. Moreover, people could afford more luxury products and the household and personal care industry became more and more innovative using new technologies and (chemical) ingredients. Therefore, an even larger population of people needed to be safeguarded from potential hazardous substances.

To establish the potential risk of exposure of the eyes to compounds, the Food and Drug Administration of the United States (US-FDA) adopted the Draize eye irritation test using rabbits already in 1961.

At first sight, this test is simple and straightforward and provides a useful tool for regulators. However, the controversial character of this type of animal testing became known to the general public – on 15 April 1980, Henry Spira, a Belgian-American advocate, member and founder of the Animal Rights International group bought a full-page advertisement in the New York Times, with the header: “How many rabbits does Revlon blind for beauty's sake?” – and the need to develop alternative non-animal tests became apparent. Within a year after Spira's advertisement, Revlon had

* Corresponding author. Triskelion B.V., P.O. Box 844, 3700 AJ Zeist, The Netherlands.

E-mail addresses: menk.prinsen@triskelion.nl (M.K. Prinsen), coenraad.hendriksen@intravacc.nl (C.F.M. Hendriksen), cyrille.krul@tno.nl (C.A.M. Krul), ruud.woutersen@tno.nl (R.A. Woutersen).

List of abbreviations

AZAN	Azocarmine & aniline	ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
BCOP	Bovine Corneal Opacity and (fluorescein) Penetration test	ICE	Isolated Chicken Eye test
CEET	Chicken Enucleated Eye test	IRAG	Interagency Regulatory Alternatives Group of the United States
CRO	Contract Research Organization	IRE	Isolated Rabbit Eye test
EC	European community	MMAS	Modified Maximum Average Score
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods	NEI	National Eye Institute, USA
EU	European Union	OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
EVG	Elastic Van Gieson	PAS	Periodic acid-Schiff
FDA	Food and Drug Administration	PM	Prediction Model
H&E	Haematoxylin & eosin	REET	Rabbit Enucleated Eye test
HET-CAM	Hen's Test - Chorioallantois Membrane	TG	Test Guideline
HO	British Home Office	TNO-CIVO	Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek – Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek
		UN-GHS	United Nations - Globally Harmonized System

donated \$750,000 to a fund to investigate alternatives to animal testing, followed by substantial donations from Avon, Bristol Meyers, Estée Lauder, Max Factor, Chanel, and Mary Kay Cosmetics. These donations led to the creation of the Centre for Alternatives to Animal Testing (<http://caat.jhsph.edu>).

The attempts to validate alternative tests for eye irritation in the early nineteen-eighties were considered to be relatively simple by comparing *in vitro* and *in vivo* irritation index scores. What was expected to be a process of several years, however, turned out to be a decades spanning process still not fully completed.

For a large part, this can be attributed to the nature of the *in vivo* test in rabbits, which is more complicated and compromised than originally believed.

This paper describes, most chronologically, the development, performance, validation and application of the Isolated Eye Test and, in broader perspective, the international validation and acceptance of this alternative test by regulatory authorities and agencies.

A considerable part of the paper deals with the *in vivo* Draize rabbit eye test itself, because its performance and the use of its results as the golden standard to compare the *in vitro* test, are considered to be the main obstacle for replacing one of the most controversial experimental animal tests within safety testing today.

Since the introduction of the alternative test with isolated eyes, two different isolated eye models exist for the same test, each having two different abbreviations, namely the Rabbit Enucleated Eye Test or the Isolated Rabbit Eye test (REET or IRE) and the Chicken Enucleated Eye Test or the Isolated Chicken Eye test (CEET or ICE).

2. The Draize eye irritation test

On 2 November 1944 a manuscript, entitled “Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes” was received for publication by the Journal of Pharmacology and Experimental Therapy. The authors of this article were John H. Draize, Geoffrey Woodard and Herbert O. Calvery from the Division of Pharmacology, Food and Drug Administration, Federal Security Agency, Washington, D.C., USA. It is more than likely that the authors never expected the kind of impact this publication would have on animal experimentation worldwide. Almost seventy years later the name Draize is still inextricably attached to two of the three most disputed toxicity

tests commonly used to determine acute toxicity, i.e. the Draize eye irritation test, the Draize skin irritation test and the LD50 (lethal dose) test. The latter two tests fortunately have already been replaced by *in vitro* tests (skin irritation) or by test methods using much less animals and causing less discomfort (LD50).

The Draize eye irritation test was first adopted by the US-FDA as part of the safety evaluation of foods, drugs and cosmetics (US-Federal Register, 1961). At that time already, it was recognized that the subjective grading of ocular reactions posed a considerable problem. In order to standardize the scoring and to provide guidance to the observers, an illustrated guide was issued (FDA, 1964). Internationally, the OECD published their first guideline on eye irritation in 1981, which was subsequently adopted by the European Union (EC, 1984).

Since then several revisions of the guideline have followed, mostly not affecting the actual exposure procedure, but providing guidance for refinement and reduction of animal use and discomfort (Table 1). Examples are the exemption of testing skin corrosives and substances with pH lower than 2.0 or higher than 11.5, the use of well-validated alternatives as a screen for severe irritancy, and a tiered approach of testing (i.e. starting with one animal and continue only if non-severe irritancy is observed).

The design of the eye irritation test is actually quite simple and straightforward: a rabbit is placed on a worktable and restrained either manually or in a fixation-box. Next, the lower eye-lid is pulled out and the test substance is instilled in the conjunctival cul-de-sac formed; the upper and lower eye lids are then closed and subsequently held together for at least one second before releasing the animal. The other eye remains untreated and serves as a control.

The animal is returned to its cage and is free to remove the material. The control and test eyes are examined (without optical aid) at approximately one hour, and at approximately 24, 48, and 72 h after treatment. Ocular reactions of the test eye are judged using a scoring scale (Table 2). Residual eye effects are recorded at regular intervals, if necessary up to about 3 weeks after treatment, in order to allow the evaluation of the reversibility or irreversibility of the effects elicited. Liquids are tested in a volume of 0.1 mL and solids (ground to a fine powder) in an amount of 0.1 g or a volume of 0.1 mL. In general, 0.1 mL is the amount the conjunctival cul-de-sac can hold when the lower eye-lid is pulled out.

Despite the existence of many national guidelines on eye irritation, the exposure procedure and the scoring system for ocular

Table 1
OECD test guideline no. 405 and its revisions (procedures, interpretation results, ethics and 3 R's).

OECD TG 405	Procedure	Guidance on interpretation of results	Ethical considerations	Three R's
1981	- 0.1 mL or 0.1 g substance; - wash out only after 24 h	- Extrapolation of the results of eye irritation studies in animals to man is valid only to a limited degree. The albino rabbit is more sensitive than man to ocular irritants or corrosives in most cases. - Similar results in tests on other animal species can give more weight to extrapolation from animal studies to man. - Care should be taken in the interpretation of data to exclude irritation resulting from secondary infection.	Local anaesthetics proposed	- Three instead of six rabbits No testing of: - Strongly acidic or alkaline substances - Corrosive or severe skin irritants
1987	- 0.1 mL or 0.1 g substance; - wash out only after 24 h	Identical to 1981 Guidance	Addition of: - Animals showing severe and enduring signs of distress and pain may need to be humanely killed.	Addition of: - severe eye irritants identified in well-validated alternative studies
2002	- 0.1 mL or 0.1 g substance; - wash out after 1 h (solids)	Similar to 1981 and 1987 Guidance	Addition of: - End points for humane sacrifice - Tiered testing	Addition of: - Weight-of-the-evidence analysis on the existing relevant data - Conduct of validated and accepted <i>in vitro</i> tests; - One rabbit first
2012	- 0.1 mL or 0.1 g substance; - wash out after 1 h (solids)	Similar to 1981, 1987 and 2002 Guidance	Addition of: - Extensive directions for the use of topical anaesthetics and systemic analgesics	Addition of: - ICE test (OECD 438) - BCOP test (OECD 437)

lesions are basically identical. However, the classification systems differ considerably (Tables 3 and 4). In general, four classifications are assigned on the basis of the ocular lesions, viz. not irritating (not classified), mildly irritating, irritating and severely irritating. The

EU recognizes three classifications, i.e. not classified, irritating and severely irritating (risk of serious damage to the eye). The existence of these different classification and labelling systems is not favourable for the validation of alternative test methods. Therefore,

Table 2
Draize scheme for grading of ocular lesions in the rabbit.

Tissue	Lesion	Score
Cornea Opacity-degree of density (area most dense taken for reading)	No opacity	0
	Scattered or diffuse areas, details of iris clearly visible	1 ^a
	Easily discernible translucent area, details of iris slightly obscured	2
	Opalescent areas, no details of iris visible, size of pupil barely discernible	3
	Opaque, iris invisible	4
Iris	Normal	0
	Folds above normal, congestion, swelling, circumcorneal injection (any or all of these or combination of any thereof); iris still reacting to light (sluggish reaction is positive)	1 ^a
Conjunctivae - Redness	No reaction to light, haemorrhage, gross destruction (any or all of these)	2
	Vessels normal	0
	Vessels definitely injected above normal	1
	More diffuse, deeper crimson red, individual vessels not easily discernible	2 ^a
Conjunctivae - Swelling	Diffuse beefy red	3
	No swelling	0
	Any swelling above normal (including nictitating membrane)	1
	Swelling with lids about half closed	2 ^a
	Swelling with lids about half closed to completely closed	3

^a Lowest score considered positive according to US-EPA.

Table 3
European Union (1993^a) classification system for eye irritation/corrosion.

Eye effects	R36 (Irritating to eyes)		R41 (Risk of serious damage to eyes) ^d	
	3 animals ^b	6 animals ^c	3 animals ^a	6 animals ^b
Corneal opacity	≥2.0, but <3.0	≥2.0, but <3.0	≥3.0	≥3.0
Iris lesion	≥1.0, but <2.0	≥1.0, but ≤1.5	≥2.0	>1.5
Conjunctiva redness	≥2.5	≥2.5		
Conjunctiva chemosis	≥2.0	≥2.0		

^a Official Journal of the European Communities, L 110 A, Volume 36, 4 May 1993.

^b The classification is assigned if the mean tissue effect (averaged over the 24 h, 48 h and 72 h time points) exceeds the threshold value in at least two of the three animals.

^c The classification is assigned if the mean tissue effect (averaged over the three time points and over the six animals) exceeds the threshold value.

^d R41 is also assigned if, in at least one animal, one of the eye effects has not reversed at the end of the observation period.

Table 4
US-EPA (1998^a) classification system for eye irritation.

Toxicity categories	Category I	Category II	Category III	Category IV
Eye effects	Corrosive (irreversible destruction of ocular tissue) or corneal involvement or irritation persisting for more than 21 days	Corneal involvement or irritation clearing in 8–21 days	Corneal involvement or irritation clearing in 7 days or less	Minimal effects clearing in less than 24 h

^a Health Effects Test Guideline OPPTS870.1000, EPA 712-C-98-189, August 1998.

the implementation of the classification system of the United Nations Globally Harmonized System (UN-GHS; Table 5) in 2007 is considered to be an improvement, although there is still a difference with the system the EU applies. The UN-GHS system subdivides the irritating category (Category 2) into mild irritant (Category 2B) and irritant (Category 2A), whereas the EU only uses the category irritant (Category 2).

2.1. Awareness of alternatives for animal testing

The publication of Russell and Burch in 1959 entitled: “The Principles of Humane Experimental Technique” stood at the basis of most initiatives relating to the use and development of alternatives for animal experiments. In their publication they postulated the famous and often cited three R’s: Reduction, Refinement and Replacement of animal experiments. Nowadays, the 3Rs have become a mantra for scientists and regulators in research areas involving animal experimentation. The initiatives concerning the Draize eye test mainly involved reduction of the number of animals from six to three per test and replacement by the implementation of non-animal alternatives. Certain aspects of the Draize eye test causing considerable pain and discomfort to the animal were dealt with only at a much later stage, i.e. reduction of the time for a wash-out of the test substance from 24 h to 1 h after instillation in 2002, and the use of systemic pain relief and topical sedation in 2012 updates of the OECD guideline 405 (Table 1).

In the early nineteen-eighties, the Netherlands Society of Toxicology (NVT) started a working group named Critical Evaluation of Toxicity Testing and in Europe, the European Research Group for Alternatives in Toxicity Testing (ERGATT) was founded to stimulate innovative toxicological research and to act as a counterpart to the John Hopkins Centre of Alternatives to Animal Testing in the USA which was founded in 1981.

For eye irritation, the policy was to select one of the most promising existing alternative methods and to focus on further development, standardization and validation in order to develop a method that would be acceptable for regulatory purposes. In addition, recommendations for a tiered approach to eye irritation testing were made, viz. testing skin irritation first, and starting the eye irritation test with one rabbit.

Because the cornea is such a highly relevant target tissue in eye irritation, it was taken as the basic principle for the development of a relevant and practical *in vitro* alternative to the animal test that had been in use as the sole test for the screening of eye irritation worldwide since the early forties of the twentieth century.

2.2. Isolated eye test method (rabbit)

In 1981, Burton published a method using isolated rabbit eyes for the *in vitro* assessment of severe eye irritants. Previously, he had discovered that the measurement of corneal thickness (swelling) by slit-lamp examination provided an objective assessment of eye irritation in the *in vivo* rabbit eye irritation test (Burton, 1972). He had examined 100 different cosmetic formulations in 600 rabbits and found not only a close relationship between the total corneal Draize score and the recorded corneal swelling, but also a relationship between corneal swelling and the conjunctival effects scored subjectively. Around that time another article on the usefulness of slit-lamp examination in the rabbit eye irritation test, including corneal thickness, was published (McDonald et al., 1973).

Between 1972 and 1981, Burton did not publish further on this subject, but it is assumed that he played with the idea of replacing the live rabbit by isolated rabbit eyes only. In his 1981 publication no further considerations for using isolated eyes were given, but a possible clue may be found in the literature reference he used for the design of the superfusion apparatus (used for maintaining the

Table 5
GHS (2007^a) classification system for eye irritation/corrosion.

Eye effects	Category 2A ^b	Category 1 ^c
Corneal opacity	≥1.0	≥3.0
Iris lesion	≥1.0	>1.5
Conjunctiva redness	≥2.0	
Conjunctiva chemosis	≥2.0	

^a Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (UN-GHS) UN, New York and Geneva, 2007.

^b All effects have to be reversible within 21 days of treatment. Subcategory of 2B: mildly irritating to the eyes, i.e. eye effects reversible within 7 days of treatment.

^c Category 1 is also applicable if, in at least one animal, an eye effect has not reversed, or is not expected to reverse, within 21 days of treatment.

isolated eyes in good condition), which he had modified from the one described by Mishima and Kudo in 1967. Remarkably, Burton had already referred to publications by Mishima in his 1972 article, and surely have thought about the possibility of using isolated rabbit eyes in a superfusion apparatus at that time. It remains unclear why he did not pursue the use of isolated rabbit eyes sooner.

The idea of using isolated rabbit eyes was very appealing from a scientific point of view. After all one uses an *ex vivo* eye for an eye *in vivo* and, moreover, the parameters measured (corneal swelling, corneal opacity and epithelial cytotoxicity by fluorescein dye) are directly comparable to the parameters measured *in vivo* (both in rabbit and in human). Therefore, Koëter and Prinsen proposed to introduce an *in vitro* eye irritation test (with isolated rabbit eyes) as a possible contribution to the reduction of experimental animal use (Koëter and Prinsen, 1985). The test method was evaluated by investigating the effects of several substances from the publication of Burton et al. (1981). The test method was further validated with 34 substances that had been investigated in the *in vivo* eye irritation test in rabbits as part of the standard toxicity testing (Koëter and Prinsen, 1985).

During the same period, several other investigators explored the use of isolated rabbit eyes as an alternative for the *in vivo* test (York et al., 1982; Price and Andrews, 1985; Jacobs and Martens, 1988, 1990).

The research and publications on isolated rabbit eyes resulted in the inclusion of this test method in the first EC Collaborative Study on the Evaluation of Alternative Methods to the Eye Irritation Test (EC, 1991). In this study, five *in vitro* cell toxicity tests, the Rabbit Enucleated Eye Test (REET) and the Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) were selected to undergo validation by testing 21 chemicals of different classes in at least 3 different laboratories. It was concluded that: i) The Isolated Rabbit Eye test did not misclassify many non-irritants and also had the capability to discriminate between moderate and severe effects, although irritating (R36) chemicals were underrepresented. ii) The REET produced results which were consistent across all three laboratories and generally correctly predicted the *in vivo* grade. The protocol and the method for calculating final irritancy grades (in validation studies later on called "Prediction Model") needed harmonization before a wider interlaboratory study could be conducted. iii) The REET is nearest to the human situation and has the advantage that all types of chemicals can be investigated without the need for testing dilutions, therefore the study showed that the REET is easier to interpret than the other assays in the trial.

The REET results showed an overall correlation of 82% with the *in vivo* results, using a general classification scheme for the grading of *in vivo* and *in vitro* eye irritation (i.e. not, slight, moderate or severe irritant). Four compounds, overpredicted (slight or moderate instead of non-irritant) by the REET, were all moderate to severe irritants in the *in vivo* skin irritation test. A common physico-chemical characteristic of these compounds was their hydrophobicity. A general observation in the *in vivo* rabbit eye test was that hydrophobic compounds stayed in contact with the cornea (eye) for a relatively short period of time, because they mixed poorly with the tear film on the cornea and because the nictitating membrane (third eye-lid) acted as a wiper, and rapidly removed the compound from the eye. This was in distinct contrast to the skin irritation test where the compound was kept in contact with the skin with the aid of a patch and fixative tapes for at least 4 h. The presence of a third eye-lid is an example of a condition very specific to the *in vivo* rabbit eye test influencing the exposure and cause a problem with respect to the validation of alternative methods. Alternative methods are not able to mimic the presence of a third eye-lid, which is also an irrelevant condition with respect to humans. On the basis of the results with the 34 compounds, the REET was

considered to be a sensitive and useful test system for the identification of eye irritants. Negative *in vitro* results should be confirmed only in case of expected regular eye contact and in a maximum of three rabbits. At that time six rabbits was the usual number in the Draize eye test in order to comply with the US guidelines, although the first OECD guideline on eye irritation (OECD, 1981) recommended the use of 3 rabbits, which could mean a considerable reduction in the use of rabbits for eye irritation testing.

The rapporteurs, however, considered the trial to be too limited to make firm conclusions and it was recommended to perform further interlaboratory trials with a larger number of laboratories and chemicals and according to the principles of GLP. An important remark in the EC report was the fact that toxicological profiles of the chemicals investigated were prepared by collecting and critically evaluating the literature data available, because it was not possible to repeat *in vivo* eye determinations for animal protection considerations. The limited availability, evaluation and appraisal of *in vivo* eye irritation data and the test method itself constitute the main cause of the exceptionally long, and not yet completed, acceptance of alternative methods to the Draize eye test. Until recently, the *in vivo* data were taken as the "Golden Standard", which in practice meant that the *in vitro* data had to almost exactly match the variable *in vivo* result.

2.3. The use of slaughterhouse animals

Although rabbits are available as eye-donor for the isolated eye test in contract research organisations (CROs) executing routine eye- and skin irritation studies, the scientific community considered this dependency on laboratory animals a serious shortcoming. The isolated eye test would still be associated with animal experimentation and organisations not using laboratory rabbits could have difficulties in obtaining rabbit eyes. Therefore, the use of slaughterhouse animals, such as the cow, pig or chicken, as eye-donor was investigated. Firstly, the possibility to obtain eyes from abattoirs was explored and, secondly, possible practical limitations of the type of eye in relation to the experimental set-up were identified. On the basis of these explorations, the cow and pig were rejected as suitable eye-donor, although the latter was expected to be the most suitable candidate on the basis of its physiological resemblance with the human eye. The rejection of the cow eye was based on the following observations: 1) the irregular supply and variable origin of cows and, related to that, 2) the insufficient quality of the cornea in too many cases. In the case of the pig eye, the collection of suitable eyes by the investigator at the process line of the slaughterhouse appeared difficult, but doable. The most important feature of the pig's eye, also applying to the cow's eye, was unfavourable for its use in the isolated eye test, namely its corneal thickness. The pig's cornea is relatively thick (600–700 µm; Faber et al., 2008) when compared to the cornea of the rabbit (ca 400 µm; Chan et al., 1983; Li et al., 1997), but quite comparable to the thickness of the human cornea (ca 530 µm; Doughty and Zaman, 2000; Fowler et al., 2004). The cow's cornea easily doubles that thickness (900–1100 µm; OECD TG 437). Although the pig eye is better comparable to the human eye, the isolated eye test has to produce matching results with the Draize rabbit eye test in order to be accepted as an alternative. Hence, an eye (cornea) that matches closest to the rabbit eye and not to that of the human eye was needed. The chicken provided such an eye, i.e. its dimensions and corneal thickness (ca 400 µm; Fowler et al., 2004) are similar to the rabbit cornea. Another point of concern was the baseline corneal thickness of the pig which was in the upper scale of the thickness measurement device and recording of increased thickness to its full extend after treatment with moderate to severe

irritants appeared not possible. Other possibilities for measuring the corneal thickness in the higher range were not available for the Haag-Streit microscope in use. Ultrasonic pachymetry instead of the mechanical (non-invasive) measurement device was an option but the procedure required touching the cornea with a probe. In case of irritating substances, touching the cornea could result in additional damage and was therefore considered unsuitable.

The epithelium of the cornea is the first barrier against (chemical) insult and as such its thickness (number of layers of epithelial cells) is of importance. One of the most used alternative tests for eye irritation is the BCOP, which uses excised and isolated corneas of the cow. Because of its corneal thickness (not used as a parameter in the BCOP), the exposure time needed to elicit an irritation response is 10 min (for liquids) or 4 h (for solids) in the BCOP. In the ICE and REET test, only a 10-second contact period is needed to elicit a relevant irritation response. A relevant response in this case means a response comparable to that observed in the *in vivo* rabbit test. Apart from a comparable thickness to the rabbit cornea and, to a certain extent to the human cornea, the chicken cornea has another feature, which might be an advantage to predict (human) eye irritation, i.e. a well-developed Bowman's membrane (Fowler et al., 2004). This membrane, which is in between the epithelium and stroma, is also well developed in the human cornea, but poorly developed in the rabbit cornea.

With respect to the availability of eyes, attaining chicken eyes appeared relatively easy by simply collecting heads just after the sedation of the animals at the process line, transporting them to the laboratory and enucleating them from the heads within 2 h after sacrifice. This time period is sufficient to guarantee corneas meeting the acceptance criteria for testing, i.e. no or very slight opacity, no or very slight fluorescein staining, and a corneal thickness in the normal range. The daily processing of thousands of chickens at the slaughterhouse guaranteed a constant supply of suitable eyes (corneas). Since 1981 we have visited the same slaughterhouse (Nijkerkerveen, The Netherlands) for our supply and only during a period of about 6 months in 2003 could eyes not be obtained because of an Avian flu break-out (H7N7 variant) in a large part of the Netherlands. Even then, eyes could be obtained from another slaughterhouse outside the affected region.

The use of chicken eyes was evaluated by testing the 21 reference chemicals previously tested in the first (pilot) EC validation study of the REET (EC, 1991) which were selected to be representative of currently used industrial chemicals of different chemical classes and ranging from non-irritant to severe irritant. Describing the criteria and scoring system of the *in vitro* corneal effects together with a Prediction Model (PM) for matching the EC scheme for classification and labelling of compounds (Table 3) was an important step forward. The development of the prediction scheme was primarily a theoretical exercise based on the range of physiological responses observed in the ICE (corneal swelling, opacity and fluorescein retention of damage epithelial cells). Because the corneal effects determined in the ICE have a direct relationship with the *in vivo* response (e.g. *in vitro* opacity for prediction of *in vivo* opacity), a PM could be established based on the magnitude/range of the effects and not by using an empirically-derived mathematical algorithm to translate an *in vitro* effect to an *in vivo* effect. For instance, in the HET-CAM assay lysis of blood vessels of the chorioallantois membrane is measured as time (seconds) of first occurrence (Luepke, 1985). The number of seconds recorded cannot be translated directly to an *in vivo* effect, which is considered a serious limitation of the method. A PM could be designed only after computer calculations of data obtained for a relevant number of compounds by using the *in vivo* MMAS (Modified Maximum Average Score) as the sole parameter for the *in vivo* test. The computer calculation was based on a mathematical formula or

conversion algorithm resulting in a single *in vitro* irritation index score comparable to the *in vivo* MMAS. Computer calculations were also needed with the BCOP assay, using a cornea, because the opacity is measured as a reduced light transmission value and the epithelial damage as the amount of fluorescein penetrated through the cornea, leading to an *In Vitro* Irritation Score (IVIS = mean opacity value + (15 × mean permeability OD490 value)).

The ICE followed a theoretical approach not using *in vitro* data to be compared to the *in vivo* MMAS. By knowing the ranges of the *in vitro* ICE responses (swelling, opacity and fluorescein retention), cut-off values were chosen to identify different categories of effect, viz. a non (Category I), slight (Category II), moderate (Category III) or severe (Category IV) effect. Thus after testing a compound, three categories were established, i.e. one for swelling, one for opacity and one for fluorescein retention.

The assignment of the final irritation classification to a non-irritant, (slight or moderate) irritant or severe irritant was obtained by the combination of these three categories. Again, a theoretical and weighted division of the different combinations possible was made for each final classification. For instance, at the low end of the ICE classification system the combination of I/I/I is a non-irritant and at the high end the combination of IV/IV/IV is a severe irritant. The combinations possible and respective irritation classifications are shown in Table 6.

Often the PM of other alternatives had to be revised after more compounds had been tested by the *in vitro* test or additional PM's were especially designed for certain categories of compounds. With the ICE, the criteria system for scoring the effects was never changed, while the classification system has been modified twice, i.e. once to accommodate the introduction of the UN-GHS classification system and secondly after adoption as an OECD guideline for non-irritants (OECD, 2013a).

The use of the *in vivo* MMAS in establishing the PM proved to be less ideal than thought. The EC and UN-GHS systems do not use the MMAS for determination of the irritation classification of a compound. Instead, the individual *in vivo* tissue scores are used. Evaluation of the use of the MMAS in the validation study of the European Commission and the British Home Office (EC/HO study) showed a poor correlation with these classification systems (Prinsen, 1999).

On the basis of the ICE study with 21 reference materials (Prinsen and Koëter, 1993) the conclusions were that: 1) although the ICE does not assess conjunctival damage, its sensitivity to predict ocular damage is not reduced, 2) the ICE correctly predicted the EC classifications of the 21 chemicals and 3) the ICE fitted in the previously updated EC B.5 and OECD 405 guidelines regarding acute eye irritation/corrosion now including recommendations to use alternatives for the prescreening or positive identification of strong eye irritants.

2.4. Isolated eye test method (chicken)

The use and suitability of eyes of slaughterhouse animals was first established by testing the same reference chemicals (Prinsen and Koëter, 1993) that had been tested in the EU Collaborative Study on the Evaluation of Alternative Methods to the Eye Irritation Test (EC, 1991). Although the *in vivo* data were obtained from literature this study was considered quite valuable because the *in vitro* data obtained with the slaughter eyes could be directly compared with the *in vitro* data obtained in the REET. Ideally, the *in vitro* test should be performed in parallel with the *in vivo* test, hence enabling a more direct comparison of the data.

Prinsen (1996) published the results of such a parallel testing of 44 compounds, which were considered to be a relevant cross-section of compounds (raw chemicals, finished products and

Table 6
ICE *in vitro* classification system.

General classification	UN-GHS classification ^a	Combinations of categories
Not irritating	Not classified	3 × I 2 × I, 1 × II
Slightly irritating	2B: <i>Mild irritant/causes eye irritation</i>	2 × II, 1 × I 3 × II 2 × II, 1 × III 1 × I, 1 × II, 1 × III
Moderately irritating	2A: <i>Irritant/causes eye irritation</i>	2 × III, 1 × I 2 × III, 1 × II 3 × III 1 × IV, 2 × I 1 × IV, 2 × II x IV, 2 × III 1 × IV, 1 × III, 1 × II
Severely irritating	1: <i>Irreversible effects on the eye/serious damage to the eye</i>	2 × IV, 1 × I 2 × IV, 1 × II 3 × IV

^a Globally harmonised system of classification and labelling of chemicals (UN-GHS). UN, New York and Geneva, 2007.

formulations) routinely produced by the (chemical) industry. Instead of only comparing single *in vivo* and *in vitro* irritation index scores, as was the common practice in validation, the individual components used for calculation of the index score were also analysed. This was a recommendation of the United States Inter-agency Regulatory Alternatives Group (IRAG) made during a workshop on eye irritation testing in Washington DC, in 1993 (Scala and Springer, 1997). Fourteen different *in vivo* scores were derived from each of the 44 *in vivo* tests, covering time scores (1-hr, 24 h, 1–72 h, days to recovery), index scores (MAS and total eye score), and individual tissue scores (cornea, area of cornea involved, iris, cornea and iris combined, conjunctival redness, conjunctival swelling, conjunctival discharge, conjunctival scores combined). The *in vivo* critical scores were compared to the critical scores of the ICE test, namely the scores for corneal swelling, corneal opacity, fluorescein retention of damaged corneal epithelium and an index score (combination of the three parameters). The overall correlations found for the *in vivo* scores with the ICE *in vitro* scores were 0.90 (index score), 0.91 (corneal swelling), 0.86 (corneal opacity) and 0.82 (fluorescein retention). The correlation between the *in vivo* conjunctival scores and the ICE scores were 0.92 (index score), 0.92 (corneal swelling), 0.93 (corneal opacity) and 0.86 (fluorescein retention). These correlations substantiated the conclusion made by Burton (1972) that a relationship exists between the *in vivo* conjunctival damage and the corneal scores of the isolated eye test. Moreover, in ophthalmology the term “ocular surface” was introduced to emphasize the potential interdependence of the epithelium of the cornea and the epithelium of the conjunctivae (Thoft and Friend, 1977; Wagoner, 1997). “Subsequent clinical and research insights provided compelling evidence of the functional relationships between these two adjacent cell populations” (Thoft and Friend, 1977). Furthermore, the proven relationship and high correlation between the critical scores of the ICE test and the Draize eye test demonstrated that the test is a relevant alternative to eye irritation, and that applying regulatory irritation classification systems is “just” a matter of choosing the appropriate threshold limits belonging to the different irritation classes. This was supported by the *in vivo* and *in vitro* EC classifications obtained for the 44 compounds. Overall, it was concluded that the ICE provided a practical prescreen for the Draize rabbit eye test and that only mild to moderate irritants in the ICE, generally showing the highest sensitivity to inter- and intra-laboratory variability, should be confirmed in the rabbit eye test. Eighteen years later, the OECD adopted this conclusion. Furthermore, the “parallel” testing showed the ICE test to be robust in the sense that the practical

aspects are not complicated and relatively easy to control, i.e. a saline drip is sufficient to maintain the eyes in good condition, and all compounds, regardless the physico-chemical properties, can be assayed.

The in-house repeatability of the ICE was assessed to be adequate during the Reference Standard Validation of *in vitro* tests sponsored by ECVAM (Brantom et al., 2000). Two reference compounds for the group of siloxanes (decamethylcyclopentasiloxane and cyclohexylamino-functional PDMS) and two for the group of surfactants (Triton X-500 5% and cetylpyridium bromide 6%), representing non-irritants, Category 2B and 2A, and Category 1 compounds, were tested five times each on different occasions.

The publication of the results for the first 44 compounds did not result in termination of the “parallel” testing program. The main reason for continuing the “parallel” testing was that it was considered unethical to perform any toxicity test on live animals without prior information on the reactivity of the test compound using a “relevant” biological structure such as the cornea. In those days, it was common practice to start different acute toxicity tests with a new compound almost simultaneously and, if different study directors were involved, often without consulting each other about the specific results of their studies, whereas the result of an acute irritation test would have influenced or helped their decision concerning the study design to be followed. It became apparent that the ICE fitted well in a tiered approach for acute toxicity testing. The results of the ICE provided not only information on eye irritation, but also gave information that could help to optimally design the other acute toxicity tests. If the ICE test showed severe irritancy, the *in vivo* eye irritation test was waived and the skin irritation test was initiated with one rabbit only. Important decisions for the conduct of the acute oral and dermal toxicity tests in rats could also be made on the basis of the outcome of the ICE. In most cases, these studies were started as a limit study with the highest dose level of 2000 mg/kg body weight. In case of severely irritating or corrosive compounds, the local effects on the stomach or skin could lead to severe suffering or even mortality of the animals. When the ICE test showed severe effects, dosing of high levels or high concentrations of corrosive compounds could be avoided. When the ICE showed no or negligible signs of irritation (cytotoxicity), the decision to perform the acute oral and dermal tests with the highest dose level or a high test concentration could be better justified.

It was not until 2001 that the OECD adopted the use of results of any other *in vitro* toxicity test on a compound in order to determine start levels to be used for the *in vivo* acute oral toxicity test in rats

(OECD, 2001).

For skin sensitization tests, this approach reduced the number of animals necessary for testing. At that time, the standard test for skin sensitization was the Guinea Pig Maximization test (GPMT), requiring up to 40 animals for the main test and 6–9 animals for the preliminary skin irritation test. The preliminary skin irritation test was needed to establish the appropriate (maximum tolerable) concentrations for the various phases of the study (i.e. the intradermal and topical induction and the topical challenge). Normally ranges covering concentrations from 1% up to 100% had to be investigated. When the ICE showed no or negligible irritancy, the range to be examined could be limited to only 100% and one lower concentration, which in practice meant that only 3 and not 6–9 animals were needed. At present, the GPMT is replaced by the Local Lymph Node Assay (LLNA; OECD, 2010a,b), and this guideline also mentions the use of results of any other *in vitro* toxicity test on a substance as an aid in dose selection.

In retrospect it can be concluded that the testing strategy was successful for the majority of compounds submitted for testing, i) identification of severe eye irritants without further *in vivo* testing.

ii) tiered testing of skin irritants/corrosives, iii) determination of acceptable (non-severe) dose levels of corrosive compounds in acute oral and dermal toxicity testing, and iv) reduction of the number of animals used in the preliminary irritation experiment of sensitization studies.

“Parallel” *in vivo* and *in vitro* eye irritation testing was continued with another 50 compounds, meaning that each compound was first tested in the ICE and, in case of non-severe irritancy, directly followed by an *in vivo* rabbit test, both in full compliance with the OECD principles of Good Laboratory Practice (GLP). These results were submitted to organizations dedicated to the validation of alternative non-animal tests, such as ECVAM and ICCVAM. Because the performance of the ICE was considered sufficiently established after the “parallel” testing of 94 compounds, another approach was introduced to make optimal use of the ICE at low extra costs. First a non-GLP ICE test with only one eye was carried out and depending on the outcome either a full GLP ICE test (in case of severe irritancy) or an *in vivo* rabbit eye test (in case of non-severe irritancy) was carried out. This procedure was followed until the ICE OECD guideline 438 was adopted to include the identification of non-irritants (OECD, 2002). From then on, only compounds identified by the ICE as irritating (Category 2) need to be tested in the *in vivo* eye irritation test in rabbits.

Based on the results of their microscopic examination of the corneas in the Low Volume Eye Test (LVET; Griffith et al., 1980; Griffith, 1987). Maurer et al. (2002) recommended to include histopathology of the treated corneas sampled at the end of the observation period. They suggested a direct correlation between the depth of injury in the cornea and possible recovery of eye lesions. Since measurement of recovery is not possible in the ICE (and in all other alternatives) it could be an important improvement of the method and helpful in the argumentation for absence or presence of microscopic lesions in the ICE that could predict (ir)reversibility. The outcome of this study (Schutte et al., 2009) was that, in general, the results of the ICE using the standard volume of 30 μ l or mg were in line with or more conservative than the LVET in terms of classification. The level of overprediction found in the ICE was expected and considered acceptable since the ICE was developed for prediction of the Draize eye test and not the LVET.

For industry, the ICE test was considered useful for several purposes, such as 1) EU/GHS classification and labelling of powder and liquid household cleaning products, 2) screening of candidate formulations, and 3) weight-of-evidence approach by determining the profile of new cleaning product formulations against benchmark products. A definite conclusion on the usefulness of

histopathology in the ICE could not be made, but the data showed that assessment of the histopathological lesions in the various parts of the cornea was possible, enabling the application of the “Depth-of-Injury” theory of Maurer et al. (2002). The question remained if this theory established on the basis of an inflammatory process in the rabbit’s eye (consisting of initial ocular injury and subsequent repair over days/weeks) correlated with the irritation process or damage in the ICE.

2.5. Optimizing histopathology in the Isolated Chicken Eye test

For the histopathological observations in the ICE, a quite basic and routine procedure of processing the eye/cornea is used. The eye is preserved in formalin at the end of the study, i.e. 4 h after the 10-second exposure, and further processed into a paraffin block from which slides of the longitudinal section of the corneal centre are prepared. This area was considered appropriate since the application of the test compound was made at the centre of the cornea and in general the slit-lamp observation showed confluent, homogeneous corneal effects. In case of non-homogenous effects, such as focal spots with more severe opacity not present in the central area, these parts were also examined. The choice of the staining appeared an important issue. In first instance, the most common staining by Haematoxylin & Eosin (H&E) was used, which was later replaced by the Periodic Acid-Schiff (PAS) staining, which provided a much better discrimination of the different layers of the cornea. The three major layers of the cornea, i.e. epithelium, stroma and endothelium were well visible with both stainings. The other structures, such as basement membrane and Bowman’s membrane (between epithelium and stroma) and Descemet’s membrane (between stroma and endothelium), were not that visible with H&E, whereas PAS provided much better results. The integrity of the membranes was considered to play a role in the injury and recovery process of the cornea, and the visibility of these membranes by microscope was considered important for an adequate histopathological assessment by the pathologist. Therefore, other staining methods specifically targeting collagen-rich membranes were tested on corneas treated with compounds representing a non-irritant, two irritants and a severe irritant (corrosive). The microscopic examination focused on the basement and Bowman’s membrane and not on Descemet’s membrane, because damage to this membrane adjacent to the endothelium was considered to result in severe, irreversible effects and not borderline effects. Of the five stainings selected, i.e. H&E, PAS, Trichrome, Azocarmine & Aniline (AZAN) and Elastic Van Gieson (EVG), PAS was clearly superior with respect to visibility of the membranes and the quality of the morphology of the various corneal structures. Moreover, the histopathological examinations provided interesting facts and insights. After severe corrosive damage to the cornea by sodium hydroxide, observed macroscopically through slit-lamp observation as maximum swelling and very severe opacity of the cornea, the basement and the Bowman’s membranes appeared undamaged while effects were seen in the underlying stroma. Does this mean that the functionality of the membranes was not compromised or is light microscopy not able to detect such damage of the membranes? This observation led to the conclusion that depth of injury is not the only factor determining the seriousness of corneal injury. Personal communications with an ophthalmologist of the University Medical Centre of Utrecht, specialized in the cornea, and publications (Wagoner, 1997; Terry and Khosla-Gupta, 2002; Rama et al., 2010) indicated that in the clinic, emphasis is put on corneal opacity and corneal stem cell survival after (chemical) injury (Table 7). With severe stem cell damage, recovery of the corneal damage by re-epithelialization of migrating stem cells from the corneal limbus is not possible. In that case, the recovery process

Table 7
Roper-Hall (1965) classification of chemical burns of the human eye.

Grade	Findings	Prognosis
I	Corneal epithelial damage; no limbal ischemia	Good
II	Cornea hazy but iris details seen; ischemia less than $\frac{1}{3}$ of limbus	Good
III	Total loss of corneal epithelium; stromal haze blurring iris details; ischemia at $\frac{1}{3}$ to $\frac{1}{2}$ of limbus	Guarded
IV	Cornea opaque, obscuring view of iris or pupil; ischemia at more than $\frac{1}{2}$ of limbus	Poor

will result in complete, irreversible conjunctivalization of the ocular surface. The stem cells are rather superficially located in the limbal region of the eye and as such involved in early contact with a topically applied compound. Therefore, the possibility of screening the viability of stem cells after chemical injury could be of value. However, explorations to stain stem cells of the chicken cornea by p63 immunostaining appeared unsuccessful.

Although the assessment of reversibility or irreversibility in the ICE is undoubtedly of value, especially for household and personal care companies, the EU/GHS classification and labelling of severe eye irritants does not make a distinction between these two categories; they are all classified as Category 1: “irreversible effects on the eye/serious damage to the eye”. The use of additional histopathology in the ICE over the past ten years has proven that it is mainly confirmative of the results already obtained by the slit-lamp observation and, in some instances, can be used to support decision making in borderline cases between irritating and severely irritating compounds. In general, the histopathology results provided no reason for altering the irritation classification.

In literature on the cornea, an interesting observation was that vacuolation of epithelial cells can occur in the human cornea after chemical insult, but it does not occur in the rabbit cornea (Grant, 1986). In the ICE, especially with detergent products, vacuolation of epithelial cells was regularly observed by the pathologist. ICE studies commissioned by the International Association for Soaps, Detergents and Maintenance Products (AISE) showed that vacuolation of epithelial cells, and in particular its location in the epithelial layer (top, mid or bottom region), may be reason for an upgrade of the classification to Category 1 in case of borderline severe corneal effects (Cazelle et al., 2014).

2.6. Other alternatives

In the early nineteen-nineties another alternative method using corneas was developed, namely the bovine corneal opacity test (BCOP; Gautheron et al., 1992). They used bovine corneas, not *in situ*, but excised from the eye-ball and clamped inside a chamber. At first sight the method appears quite similar to the Isolated Chicken Eye (ICE) test, i.e. using corneas and measuring opacity and fluorescein penetration, but the differences are remarkable. Corneal opacity is measured quantitatively as the amount of light transmission through the cornea. Permeability is measured quantitatively as the amount of sodium fluorescein dye that passes across the full thickness of the cornea, as detected in the medium in the posterior chamber (OECD, 2013a). An empirically-derived formula is used to calculate an *in vitro* irritancy score (IVIS = mean opacity value + (15 × mean permeability OD490 value)).

Other alternatives using reconstructed (human) corneal tissue, the so-called 3D models, such as the SkinEthic Human Corneal Epithelium test and the EpiOcular™ test were developed in the late 20th early 21st century and were also validated in several studies. A drawback of these corneal models is that only the epithelial layer of the cornea is reconstituted which might pose a problem in discriminating irritating from moderately/severely irritating substances.

At present, only the ICE and the BCOP tests are officially adopted

by the OECD for Identifying.

i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage (OECD, 2009a,b) and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (OECD, 2013a). The Fluorescein Leakage test has been adopted by the OECD for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (OECD, 2012), but with specific limitations, i.e. only applicable to water soluble chemicals and excluding strong acids and bases, cell fixatives and highly volatile chemicals.

The BCOP, the ICE test and 7 other test systems were considered to be the most promising alternatives to be further validated and in 1992 the British Home Office (HO) and the Directorate General XI of the European Commission (EC) commissioned a validation study on alternatives to the Draize eye irritation test, to be known as the EC/HO validation study. The first priority was given to evaluate the possibility of identification of substances severely irritating to the eye, while also evaluating the methods for predicting the irritants and non-irritants (Balls et al., 1995). The methods selected, their principle, expression of results together with the pros and cons are presented in Table 8.

2.7. International validation of the ICE (EC/HO study)

With the introduction of alternative methods for the Draize Eye Test in the mid-eighties, a certain wild-growth of alternative methods occurred and internationally (mostly) in Western Europe clusters of specific methods could be seen. Roughly, the IRE/ICE was developed and practiced mainly by the UK and the Netherlands, the Bovine and Corneal Opacity and Permeability test (BCOP) by France, the Hen's Egg Test Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) by Germany and the Neutral Red Uptake test (NRU) by several European countries. With the increasing interest in these methods and the need for regulatory acceptance it became apparent that a formal validation of the alternative methods was needed.

A first (pilot) validation of several alternative methods, including HET-CAM, REET and NRU was commissioned by the EU in 1987 (the Collaborative study on the evaluation of alternative methods to the eye irritation test, 1991), which was the basis of one of the largest validation programs held in the early nineties, known as the EC/HO study. In this comprehensive study, organized by the European Commission (EC) and the British Home Office (HO), nine methods including the ICE (Table 6) were each carried out by four laboratories testing 60 chemicals which represented different chemical classes and irritation potential (Balls et al., 1995).

The chemicals were selected from the ECETOC database and were considered to have reliable *in vivo* eye irritation data. Basically that meant; the tests having been performed under GLP conditions and in compliance with OECD TG 405 (OECD, 1981). No other assessment with respect to the quality of the individual data was made. The outcome of the study was quite disappointing; none of the methods were capable of identifying the eye irritation potential of the compounds (maximum overall correlation ranged from 0.34 to 0.55). Breaking up the compounds into different categories such as liquids, solids, surfactants, non-irritants, severe irritants etc. did not improve the correlation significantly, although the group of surfactants showed the best results across all methods.

One of the reasons for this disappointing result was considered

Table 8
Alternative *In vitro* tests for eye irritation considered most promising (based on EC/HO study).

Alternative	Principle	Expression of results	Pro's	Con's
Red blood cell haemolysis test	Leakage of haemoglobin (H) from red blood cells and denaturation (D)	H ₅₀ and D values equivalent to MMAS ^a	<ul style="list-style-type: none"> - relatively simple set-up - relatively simple performance 	<ul style="list-style-type: none"> - single index score - no direct relation with ocular tissue - no reversibility - testing of non-soluble substances
Neutral red uptake test	Inhibition of neutral red uptake (NRU) into mouse 3T3 cells	NRU ₅₀ values equivalent to MMAS	<ul style="list-style-type: none"> - relatively simple set-up - relatively simple performance 	<ul style="list-style-type: none"> - single index score - no direct relation with ocular tissue - no reversibility - extreme PH, non-soluble substances
Fluorescein leakage test	Fluorescein leakage (FL) by damage to the tight junctions of Madin-Darby canine kidney cells	FL ₂₀ score equivalent to MMAS	<ul style="list-style-type: none"> - relatively simple set-up - relatively simple performance 	<ul style="list-style-type: none"> - single index score - no direct relation with ocular tissue - no reversibility - viscous materials, extreme PH, non-soluble substances
EYTEX method	Turbidity of reagent	EYTEX Draize equivalent (EDE) score equivalent to MMAS	<ul style="list-style-type: none"> - relatively simple set-up - relatively simple performance 	<ul style="list-style-type: none"> - single index score - no direct relation with ocular tissue - no reversibility - testing of solids, coloured samples, surfactants, water-solubles - interference/inhibition with matrix
HET-CAM method	Haemorrhage, lysis and coagulation in the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs	Reaction time for occurrence of haemorrhages, lysis and coagulation within 5 min combined into a Q score equivalent to MMAS	<ul style="list-style-type: none"> - relatively simple set-up - relatively simple performance 	<ul style="list-style-type: none"> - single index score - no direct relation with ocular tissue - limited testing of solids and sticky materials - use of live embryo - subjective scoring - no reversibility
Silicon microphysiometer test	Reduction in the metabolic acidification rate of L929 fibroblasts	MRD ₅ values equivalent to MMAS	<ul style="list-style-type: none"> - assesses functional cell changes 	<ul style="list-style-type: none"> - single index score - no direct relation with ocular tissue - very limited testing of substances (37–48%) - laborious - complex and expensive system
Bovine corneal opacity/permeability test	Changes in opacity and in permeability of isolated bovine corneas	<i>In vitro</i> irritation score (IVIS) equivalent to MMAS	<ul style="list-style-type: none"> - highly standardized - "human" parameters - ocular tissue - eyes relatively easy attainable - objective scoring 	<ul style="list-style-type: none"> - single index score - no direct observation (black box) - cornea excised - thick cornea compared to rabbit/human - laborious - no reversibility - no conjunctival damage - testing of solids, coloured substances
Isolated chicken eye test Isolated rabbit eye test	Corneal swelling, corneal opacity and fluorescein staining of damaged epithelial cells of the cornea	Degree of severity (categories) for each endpoint separately and combination of the three categories into regulatory classification	<ul style="list-style-type: none"> - eyes easy attainable - relatively simple set-up - relatively simple performance - ocular tissue - "human" parameters - slit-lamp microscopical assessment - objective scoring - corneal swelling - direct translation to human ocular damage - all substances can be assayed neat 	<ul style="list-style-type: none"> - no reversibility - no conjunctival damage - subjective scoring opacity, fluorescein retention - experienced observer
Draize rabbit eye test	Corneal opacity, iritis and conjunctival damage of one eye treated in the conjunctival sac	Degree of severity for each endpoint separately and classification on the basis of the most affected tissue (degree and/or persistency)	<ul style="list-style-type: none"> - simple set-up - simple performance - rabbits easily attainable - large eye - <i>in vivo</i> response including recovery 	<ul style="list-style-type: none"> - unrealistic exposure area (inside eye-lid) - undefined exposure time (seconds to 24 h) - subjective scoring - experienced observer - animal behaviour influencing eye effects - unrealistic assessment of recovery (no aftercare)

^a MMAS = Modified maximum average score.

to be the use of the MMAS as the sole parameter derived from the *in vivo* data. This score, ranging from 0 to 110, is an average of the maximum individual tissue scores of the animals recorded for a compound. By using certain cut-off values for the MMAS, a compound is classified as a non-irritant (score 0–25), irritant (score 25–59) or severe irritant (score >59). Assessment of the entire

process of ocular inflammation by a single index instead of using the *in vivo* data to its full potential appeared rather inadequate. For instance, the classification system used in the EC does not use a single irritation index score, but is based on individual tissue scores (i.e. for cornea, iris and conjunctivae separately) and/or the (ir) reversibility of these effects within 21 days (Table 3). In 1998, the

OECD published a proposal for the harmonization of hazard classification based on eye irritation/corrosion, which is comparable to the EC classification system, because it also uses the individual tissue scores separately (Table 5). However, slightly lower thresholds were used for classification as an irritant (Category 2) or severe irritant (Category 1), and additionally recovery of eye effects within 7 days were used to discriminate between a mild irritant (2B) and an irritant (2A). Because the MMAS is not used for regulatory classification, the impact of the EC and proposed OECD classification criteria on the irritating potential of the compounds tested in the EC/HO study was investigated. First of all, it was established that applying the two classification systems to the EC/HO compounds resulted in classifications that were comparable between the two systems, i.e. R36 compounds were also Category 2A/2B compounds, and R41 compounds were also Category 1 compounds. Subsequently, it was demonstrated that the MMAS cut-offs of 25 and 59 belonging to, respectively, irritant and severe irritant, were not appropriate for classification according to these two regulatory systems. Eight compounds with an MMAS lower than 59 were in fact severe irritants (R41/Category 1) and 4 compounds with a MMAS higher than 59 and 3 compounds with a MMAS lower than 25 were irritants (R36/Category 2). One of the reasons was that an MMAS could be lower than 59 during the study while ocular effects persisted until day 21 which according to the classification system is reason for R41/Category 1 classification. The recommendation was that validation of alternatives would benefit from the use of classifications based on the proposed OECD harmonized system (later on adopted as the EU-CLP and UN/GHS classification systems). After this publication on the role of the MMAS in 1999, it was not until 2004 that a new initiative was undertaken to (re-)validate four of the alternative methods which were considered the most promising in the EC/HO study, especially for the screening of severe irritants.

2.8. International validation of the ICE (ICCVAM study)

The validation was an initiative of ICCVAM and NICEATM (National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) of the USA in collaboration with ECVAM of the EC and the methods selected were the ICE, the HET–CAM, the IRE (formerly called REET) test and the BCOP. An independent Expert Panel was established for each alternative method to determine the validation status of these methods. After a public request for data on the four methods in 2004, a public meeting was held in January 2005 at the National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA to assess the current validation status of the *in vitro* test methods proposed for identifying compounds that may cause serious eye damage and to develop recommendations for further validation. During that meeting, the ICE method was presented. The attitude of the Panel members towards the validation procedure in general was rather disappointing. The focus was on the belief that the poor correlation with the Draize Eye Test was due to shortcomings in the practical performance of the *in vitro* methods which should be improved, rather than critically addressing the validity and shortcomings of the Draize eye test itself and its consequences for the validation of *in vitro* alternatives. Emphasis was again put on the statistical evaluation of the *in vivo* and *in vitro* data (Prinsen, 2005).

Another public request for *in vitro* data was made by ICCVAM in February 2005. ICCVAM received data of in total 174 compounds, i.e. previously tested by i) Prinsen and Koeter (1993; 21 compounds).

ii) Prinsen (1996, 2005, dataset of 94 compounds), and iii) Balls et al. (1995; 59 compounds), which were compiled in a background review document (ICCVAM, 2006a). This time the MMAS was no longer used for reanalysis of the accuracy and reliability of the ICE,

but regulatory classification criteria (UN-GHS, EC and EPA) were applied as was recommended previously (Prinsen, 1999). ICCVAM and its Ocular Toxicity Working Group summarized the Expert Panel evaluation, the revised analyses, the public comments, and the comments of the Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods in a final Test Method Evaluation Report (ICCVAM, 2006b).

The conclusion was that "there are sufficient data to substantiate the use of the BCOP or the ICE test methods, with certain limitations, as screening tests to identify compounds as ocular corrosives and severe irritants in a tiered-testing strategy, using a weight-of-evidence approach, for regulatory hazard classification purposes". The limitations of the ICE were the testing of alcohols based upon the false positive rate and of solids and surfactants based upon the false negative rates. The limitations for the BCOP were the testing of alcohols and ketones based upon the false positive rates and of solids based upon the false negative rate.

Although the acceptance as a screen for ocular corrosives and severe irritants was a success for the ICE, the way the data were used by ICCVAM for reanalyses and for adjustments in the experimental procedures of the ICE was debatable. It was acknowledged that the *in vivo* rabbit eye test was subject to variability, but the *in vivo* data were taken as absolutely accurate (the "Golden Standard") in predicting the eye irritation potential of a compound.

The *in vivo* irritation classifications were assigned if the study performance met the criteria set by ICCVAM. One of the criteria (assessment of full reversibility of any eye effect) was the reason that the database (ICCVAM, 2006a) contained many gaps compared to the original data submitted, whereas sufficient *in vivo* data were available for classification. For example, two compounds (2,2-dimethyl butanoic acid and p-fluoroaniline) identified in the EC/HO validation study as severe irritants (R41) on the basis of the individual *in vivo* data (ECETOC, 1998) were rejected with the remark "study criteria not met". The two compounds were correctly identified as R41 by the ICE and by most other *in vitro* methods participating in the validation study. The *in vivo* classification was based on sound scientific judgment, but ICCVAM decided to exclude the compounds, because a 21-day observation period was not completed. The OECD/EC guidelines (at the time of testing) specified that the observation period should be long enough to evaluate the reversibility or irreversibility of the lesions. The six rabbits treated with 2,2-dimethyl butanoic acid still showed slight to severe corneal opacity and neovascularization of the cornea at 14 days after treatment. It was considered evident that these lesions would not have cleared within a 21-day observation period. Thus, the 14-day observation period applied was in agreement with the guidelines and should not have been a reason for discarding the results by ICCVAM. The same applied for p-fluoroaniline, which caused moderate to severe corneal opacity and iritis score 2 (highest score possible; no reaction to light, haemorrhage, gross destruction). The test was terminated on day 3, which is also in agreement with the guidelines which state that animals may be humanely sacrificed if the severity of the effects is considered too high.

Similar cases occurred in the "parallel" data set of the 94 compounds provided by Prinsen (2005). These cases also mainly concerned *in vivo* eye irritation studies that were terminated earlier than 21 days after treatment because of the severity of eye effects or compounds lacking an *in vivo* eye irritation study because of proven skin corrosivity in the *in vivo* rabbit skin irritation test (10 compounds), that was performed immediately after the ICE had shown severe eye irritancy. In full agreement with the guidelines, the *in vivo* eye irritation test in rabbits was waived in these ten cases. The individual *in vivo* skin irritation data and the ICE data were provided to ICCVAM, but the 10 compounds remained excluded

from the analyses because of “classification assigned on the basis of skin corrosion assay” (SC). Remarkably, ICCVAM claimed to apply the criteria for classification according to the EC (1993) and UN (2007), whereas both guidelines unambiguously state “corrosive to skin” as one of the criteria for classifying a compound as severely eye irritating.

Another remarkable conclusion in the ICCVAM document was the underperformance of surfactants by the ICE. This conclusion was primarily based on the 6 surfactants examined in the EC/HO validation study. The correlation percentages for surfactants in the EC/HO study tested by the four participants that performed the ICE were 72, 82, 83 and 76%, compared to an overall mean correlation percentage of 54%. In general, the chemical class of surfactants was best predicted by each of the nine *in vitro* methods participating in the EC/HO study. The fact the ICE has been employed by P&G for more than ten years for their product development (Schutte et al., 2009), the majority of which contains surfactants covering the whole spectrum of eye irritancy, is in contrast with ICCVAM's conclusion. More recently, member companies of the International Association for Soaps, Detergents and Maintenance Products (AISE) increasingly use the ICE for their (surfactant-containing) products (Cazelle et al., 2014).

With respect to the ICE study performance the ICCVAM expert panel identified two major issues: 1) the variability in swelling percentages obtained by the four laboratories performing the ICE, and 2) the use of only one control eye per experiment.

2.8.1. Variability in swelling percentages (high CVs)

The variation in swelling percentage was caused by the use of different pachymeters with different slit width settings. This was already intensively discussed by the Management Team of the EC/HO study, but was considered of no concern because the *in vivo* MMAS was compared to the critical scores of the ICE (i.e. the max. mean swelling%, max. mean opacity score and mean fluorescein score) and not to the regulatory irritation classifications. ICCVAM overlooked this fact and decided to apply the TNO ICE system for categorizing effects to the other three participating labs as well. This was a valid approach for the opacity and the fluorescein scores because the scoring is exactly the same for the four labs, but it could not be used integrally for the swelling %. The misconception of the variability in corneal swelling by the ICCVAM expert panel led to incorrect conclusions and recommendations. For example, centering lights needed to be installed on the optical pachymeter to improve the determination of corneal thickness by ensuring consistent central corneal thickness measurements across laboratories. The purpose of these lights in human ophthalmology is to guide the patient's eye to a fixed point and thus perform the reading at the centre of the cornea. This is used because the subjects often (involuntarily) move their eyes making the (central) corneal thickness assessment difficult and variable. The chicken eye is isolated and fixed, so there is no movement at all. Therefore, the corneal thickness can be measured in a very accurate and reproducible way at the centre of the cornea without any additional aid.

2.8.2. Use of control eyes

ICCVAM decided to increase the number of negative control eyes from the usual one per experiment to three, because three was the accepted minimum of replicates in *in vitro* testing in general. The use of only one negative control eye has been employed and approved by all users of the isolated eye test (both with rabbit eyes and with chicken eyes) since the introduction of the method by Burton in 1981 and during the EC/HO study. The use of only one negative control eye is justified since the effects of the cornea treated with the test material are not assessed or evaluated in any way against the effects of the control eye. This is possible because,

prior to testing, the quality and suitability of each cornea can be accurately assessed and, moreover, each cornea provides its own pre-dose baseline thickness/opacity/fluorescein control values. Furthermore, all compounds (liquids, pastes and solids) are tested neat and, therefore, effects of solvents need not to be examined. The purpose of the negative control eye is only to demonstrate the appropriateness of the general conditions in the chambers of the superfusion apparatus, i.e. the saline drip onto the cornea and chamber temperature, necessary to maintain corneas in the proper condition during the 6-hour test period. All ICE experiments used for the ICCVAM BRD were performed with one negative control, representing 354 independent test runs or replicates. These negative controls never showed any unusual effect during the 6-hour test period and adequately demonstrated the appropriateness of using only one negative control for the purpose of monitoring the general conditions of the test system. Other alternatives like the BCOP need to use three or more control corneas because pre-dose corneal observations, to assess their suitability for testing, are not possible. The BCOP control values at each observation time point are needed for subtraction from the values of the test corneas.

Following a public request for comments on the draft ICCVAM Test Method Evaluation Report: “Evaluation of the Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants” (Federal Register, 2005a) and the “In Vitro Ocular Toxicity Draft Background Review Document (BRD)” on the ICE test method (Federal Register, 2005b), the discussion concentrated on the exclusion of the ICE data of skin corrosive compounds and other data gaps in the BRD. Concern was expressed on the decision to pool the data of the various ICE (validation) studies for analyses without analysing the individual studies separately. *In vivo* and *in vitro* data obtained in “parallel” are of a higher quality than ICE data compared to *in vivo* data obtained from literature, because in the latter case it is obtained by different observers, with different batches of the compound, under different laboratory conditions and often with only summarizing data reported. Furthermore, reservations were made about the handling of the *in vivo* data, i.e. that no lessons were learned from previous validation studies, which made clear that another approach for validation was needed. The disadvantages and shortcomings of the *in vivo* rabbit eye test and their implications on the test results should be addressed first before starting the validation process.

3. The Draize eye test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage?

Recognizing, understanding, and the correct appreciation of the *in vivo* test conditions and their effect on the results are crucial for the evaluation of the *in vitro* results obtained by the alternative test method. The *in vitro* test conditions can usually be fully controlled in contrast to the conditions of testing in the *in vivo* rabbit test. The *in vivo* results are used as the “Golden Standard” for all comparisons with the alternative tests. However, the shortcomings of this test should not be ignored, especially if one is aware of the nature and extend of these shortcomings. Up to now, in compliance of the rabbit test with the current guidelines was the criterion used in validation studies for the validity and acceptance of the *in vivo* data. Once that was established, the *in vivo* results are treated as the absolute truth without any room for interpretation or expert judgment. This means that a compound is classified as a non-irritant, an irritant or a severe irritant based on the *in vivo* test without any kind of nuance or deliberation. There is general agreement that the *in vivo* test in rabbits is far from perfect, but the implications of the inconsistencies of the *in vivo* test for the validation of the alternatives were never taken into account.

In fact, over the years an increasingly rigid attitude towards

questioning the value of the *in vivo* eye irritation data can be noted. This can be considered the root of the problems encountered since the very first validation took place in 1989.

There is a common believe and acknowledgement that the *in vivo* rabbit eye test produces variable results due to the fact that different labs and observers are involved and data had been obtained over a very long period of time. However, this is only a small part of the problem. There are more serious reasons to consider the *in vivo* data in a critical way.

There are several important issues that play a crucial role in the outcome of the *in vivo* test:

3.1. The kind of exposure

By instillation of the compound in the conjunctival cul-de-sac, closing the eye-lids for one second and then releasing the rabbit, the exposure is undefined. It can be anything from minutes (liquids) to 24 h (solids). No washing out of remnants from the conjunctival sac was allowed before 24 h after treatment. Only after modification of the OECD guideline in 2002 was a wash-out allowed after one hour. Especially with poorly soluble/dissolving powders the results can be devastating if the powder is present for one hour, let alone for up to 24 h. It should be noted that the ICCVAM validation was mainly with *in vivo* data obtained before 2002. Remarkably, Draize only mentions the testing of liquids, solutions and ointments and not the testing of solids. In fact, in his 14-page publication (Draize et al., 1944), only one sentence is dedicated to the actual test procedure for eye irritation testing. Overall, eye irritation was dealt with in a rather limited way when compared to his discussion on dermal toxicology and skin sensitization. One wonders what would have happened if Draize had extended his eye irritation investigations to the testing of solids.

These undefined exposure conditions are in contrast to the basic principles of toxicity testing. Moreover, this kind of exposure condition by placing such a large amount of compound in a retracted eye-lid will hardly occur in humans.

A well-defined and standardized exposure in toxicity testing is one of the pillars of hazard and risk assessment. For instance, in the acute skin irritation in rabbits, a semi-occlusive exposure of 0.5 mL–6.25 cm² of skin is applied for 4 h under a patch and fixative tape. These are standardized conditions and remarkably the skin irritation test in rabbits has been fully replaced by alternatives since 2010 (OECD, 2004; OECD, 2010a,b).

3.2. Behaviour of the animals

The behaviour of rabbits after treatment may also differ considerably. After treatment the animal is immediately released and is placed in its home cage where it can move freely. Usually, they start grooming and/or scratching. One rabbit out of a group of 3 treated may do this excessively, while on the other end of the behavioural spectrum another animal may freeze and not react at all. Again these variations in behaviour add considerably to the variability of the results.

3.3. Treatment of the eye post-exposure

When significant irritation occurs in an early stage, the treatment of the eye post-exposure highly determines the outcome for classification. The observation times after treatment are essentially the only moments that the animals are handled outside the cage. In case of a moderate eye irritant those time points are normally 1 h, 24 h, 48 h, 72 h, 7 days, 14 days and 21 days. In between, the animals are not handled except for a cage-side observation once a day. The enclosure of solid materials up to 24 h in the conjunctival cul-de-

sac, sometimes in combination with mechanical damage, can have a devastating effect on the eye. In the case of poorly water-soluble solids with distinct cytotoxic properties, the entrapped solid can rapidly cause a considerable and increasing swelling of the conjunctivae, making it very difficult for the animal to remove the material. If, at the 1-hour observation, the lower eye-lid is not pulled away far enough by the observer, a bulk of test material deeply hidden in the conjunctival cul-de-sac may remain unnoticed. In most cases this continuous exposure for the next 24 h results in a complete closure of the eye-lids by the abundant production of colloidal discharge which often forms a sealing crust. Upon opening the sealed eyelids, purulent discharge, and other inflammatory debris are released. If the animal (treated eye) is not receiving special care of the eye an otherwise irritating compound can easily become a severe one.

The swelling of the conjunctivae can be such that removal of the remains of the test compound is hardly possible. In the majority of these cases, the eye is permanently damaged or can only be saved by applying special care, such as regular daily cleaning and rinsing of the eye and eye-lids, often including cutting off the eye-lashes to prevent further sealing. This special care is not common practise in the Draize eye test nor is it mentioned in the guidelines, whereas it can certainly relieve the discomfort and pain experienced by the rabbit considerably. In general, keeping the eye-lids open is essential for the recovery process, otherwise the enclosed inflammatory exudate will further damage the cornea. If no further extensive remedial treatment is given to the animal, the exposure conditions described can lead to an opacity score of 3 or 4 instead of the initial score of 1 or 2. In these cases, recovery from these injuries has little or no relevance for man. As with the exposure conditions, these kind of circumstances are not representative for the human situation. After accidental exposure, one will seek “immediate” care in case of ocular damage, and the victim will usually receive medical treatment, if required. The unrealistic exposure conditions in the Draize eye test impelled P&G to develop the *in vivo* rabbit Low Volume Eye Test (LVET) for their products (Griffith, 1987). For instance, the testing of a dish wash detergent tab would result in dramatic ocular effects in the standard *in vivo* Draize eye test, because the tab is ground to a fine powder and instilled as a bulk in the conjunctival cul-de-sac of the rabbit and remains there for at least one hour (before 2002 up to 24 h). Nobody would consider this as real exposure circumstances, nor will it occur in real life. In the ICE, the exaggerated test conditions can be mimicked by leaving the powder on the cornea for up to 60 s instead of the standard 10 s, but what relevance does it have? The LVET was designed to mimic the possible human exposure, by exposure to a tenth of the usual amount directly onto the rabbit's cornea in the Draize eye test, and was extensively used for household care products. Now P&G uses the ICE for their purposes because the test also mimics the possible human exposure more closely. In general, it was astonishing that both ECVAM and ICCVAM urged that the ICE method needed to be modified in order to mimic the extreme exposure conditions of the *in vivo* Draize eye test, rather than modifying the exposure (to solids) in the *in vivo* Draize eye test.

Another phenomenon that occasionally occurred in the Draize eye test is the development of a secondary infection following the eye effects caused by the compound (initial infection). In the past, the hygiene standards in the laboratories were not as high as currently, and the treated eye could be infected by the scratching/grooming of the animal with its paws. In addition to the inflammation caused by a compound, the eye is more vulnerable to microbiological infection, causing initial mild to moderate effects during the first days after exposure developing into more severe and prolonged effects during the 21 days observation period. An

interesting example of such an event can be found in one of the compounds tested in the EC/HO study, which was also used in the ICCVAM validation of the ICE.

1-Naphthaleneacetic acid was tested in six rabbits of which one rabbit showed very unusual persisting and increasing effects after day 7, compared to the eye effects observed in the other five rabbits (ECETOC, 1998). The effects of the five rabbits followed a pattern which is normally expected for the initially slight to moderate eye effects, i.e. gradually decreasing in severity after day 3 followed by a complete recovery on day 14 or day 21. In the sixth rabbit, a similar pattern was observed until day 7, but thereafter the slight opacity observed increased to a moderate opacity on day 10 and finally a very severe opacity on days 14 and 21. This difference in the pattern of the eye effects is remarkable and most probably caused by a secondary infection in the eye of the animal. Based on the result in this rabbit, the compound was classified as Category 1, whereas the initial effects (24–72 h) in the 6 rabbits would lead to a Category 2(A) classification. The ICE test also classified the compound as Category 2.

It is remarkable that the OECD guideline 405 of 1981 already stated that “Care should be taken in the interpretation of data to exclude irritation resulting from secondary infection”. However, this issue was neither addressed in the EC/HO validation nor in the ICCVAM validation.

3.4. Observation/grading of eye effects

In the early days of validation of alternatives for eye irritation it was recognized that the variability could be high in the Draize eye test, and this was considered to be caused by subjective scoring by different observers and by interlaboratory variability (Weil and Scala, 1971; Lordo et al., 1999; Ohno et al., 1999). Unfortunately, the publications by Lordo and Ohno did not include the individual *in vivo* rabbit eye data which might have provided more insight in the underlying causes of the variation. Subjective scoring is indeed part of the problem but a large part of the variation presently ascribed to subjective scoring might in fact be caused by differences in animal behaviour, differences in exposure times, and absence (or presence) of post-treatment care. For instance in the study of Weil and Scala, in one laboratory ethanol 95% caused a combined score (all tissues combined) of 2, 9, 22, 15, 38 and 110 in the 6 rabbits at the 72-hour observation time point. A score of 110 is the maximum score possible. Amongst the 24 laboratories the median score for ethanol 95% ranged from 0 to 42. This cannot be explained by subjective scoring only. The subjective nature of the observation definitely plays a role with compounds causing effects near the thresholds for classification (not classified/irritant and irritant/severe irritant).

First of all there is the grading/scoring of the effects itself. The Atlas of eye effects of the FDA (1964) already gave rise to debate. For example the redness of the conjunctivae of the eye no. 6 of Plate 1 (Fig. 1) is stated to be score 2 (moderate redness: more diffuse, deeper crimson red, individual vessels not easily discernible; see also Table 2 of the Introduction). Based on the grading of eye effects of all compounds tested at TNO since 1981, it should be the maximum score of 3 (severe redness: diffuse beefy red), because a more intense redness cannot be observed. Eye no. 3 of Plate 1 is presented as a case of redness score 1 (slight redness: vessels definitely injected above normal), whereas this would be a good example of score 2 for redness. Eye no. 2 of Plate 1 is more representative of a redness score 1 than of a normal eye (redness: vessels normal). The other plates of the Atlas contain more examples of grading that are considered questionable and subject to debate.

Another issue concerning the subjective scoring is the decision the observer has to make in certain cases where the score of one

animal at one time point can make the difference between, for instance, not classified and irritant (Category 2). For EU-CLP and UN-GHS classification, the individual tissue scores of each animal is first averaged over the 24–72 h time points and next the average score of the two rabbits showing the highest score for a specific tissue determines classification or not. The threshold score for redness or for swelling of the conjunctivae is an overall average of 2.0 for classifying as a Category 2 compound. Table 9 shows a theoretical case where one of the 6 scores can make the difference between classifying or not. The score of 1.0 in Table 9 is assigned to animal 2 at the 72 h time point, but can theoretically be at any of the 6 different places.

3.5. Appreciation of the *in vivo* data

With the knowledge of the factors influencing the *in vivo* results the “black or white” approach applied by ICCVAM can hardly be defended. Weil and Scala (1971) even concluded that the eye irritation test in rabbits as published by the Federal agencies of the US should not be recommended as standard procedure in any new regulations. However, the Draize eye test has been used practically unchanged until now.

Balls and Fentem (1993), concluded: “It is very rare for any allowance to be made for the variability of the animal data, which are thus given a status which they do not deserve. They wrongly become the “true” values which the non-animal tests must struggle to reproduce. Also, insufficient allowance is made for the doubt which must be placed on values which fall within the barrier zones on both sides of category cut-off points. This is particular worrying when Cooper two-by-two way plots are used as a basis for establishing the sensitivity, specificity, predictivity and concordance of *in vitro* test data”. Bruner et al. (1996), concluded after computer simulations that even if the alternative methods were perfectly reproducibly (if their coefficients of variation were 0), the variability in the Draize scores alone would restrict the Pearson’s correlation coefficients to the range 0.65–0.80 when the Draize scores are between 0 and 40, which are typical for (mild) irritants.

4. ICE OECD test guideline 438

One of the conclusions in the ICCVAM test method evaluation report (ICCVAM, 2006b) was: “There are sufficient data to support the use of the ICE test method, in appropriate circumstances and with certain limitations, as a screening test to identify compounds as ocular corrosives and severe irritants (i.e., EPA Category 1, UN GHS Category 1, EU R41) in a tiered-testing strategy, as part of a weight-of-evidence approach. The identified limitations for this method are based on the false negative and false positive rates that are observed for certain chemical and physical classes. Based on the available database, the false negative rates for alcohols, surfactants and solids range from 33% (1/3) to 50% (1/2), 44% (4/9) to 57% (4/7), and 46% (6/13) to 70% (7/10), depending on the hazard classification system (EC, UN-GHS or EPA) used. Additionally, the false positive rates for alcohols range from 27% (3/11) to 50% (5/10)”. Two of the alcohols in the data base were ethanol and butanol. Both caused severe irritancy in the ICE (and BCOP) but were Category 2 according to the *in vivo* data of ECETOC (1998). As discussed previously the *in vivo* data of Weil and Scala for ethanol (and also for butanol) showed very high inter- and intra-laboratory variations, making the ICCVAM conclusion on performance of the ICE with respect to alcohols questionable. Also the surfactant examined in the study of Weil and Scala showed high inter- and intralaboratory variations.

In 2009, on the basis of the ICCVAM evaluation report the ICE and BCOP were adopted as an OECD Test Guideline (TG 438 and TG 437, respectively) for the screening of severe eye irritants. The false

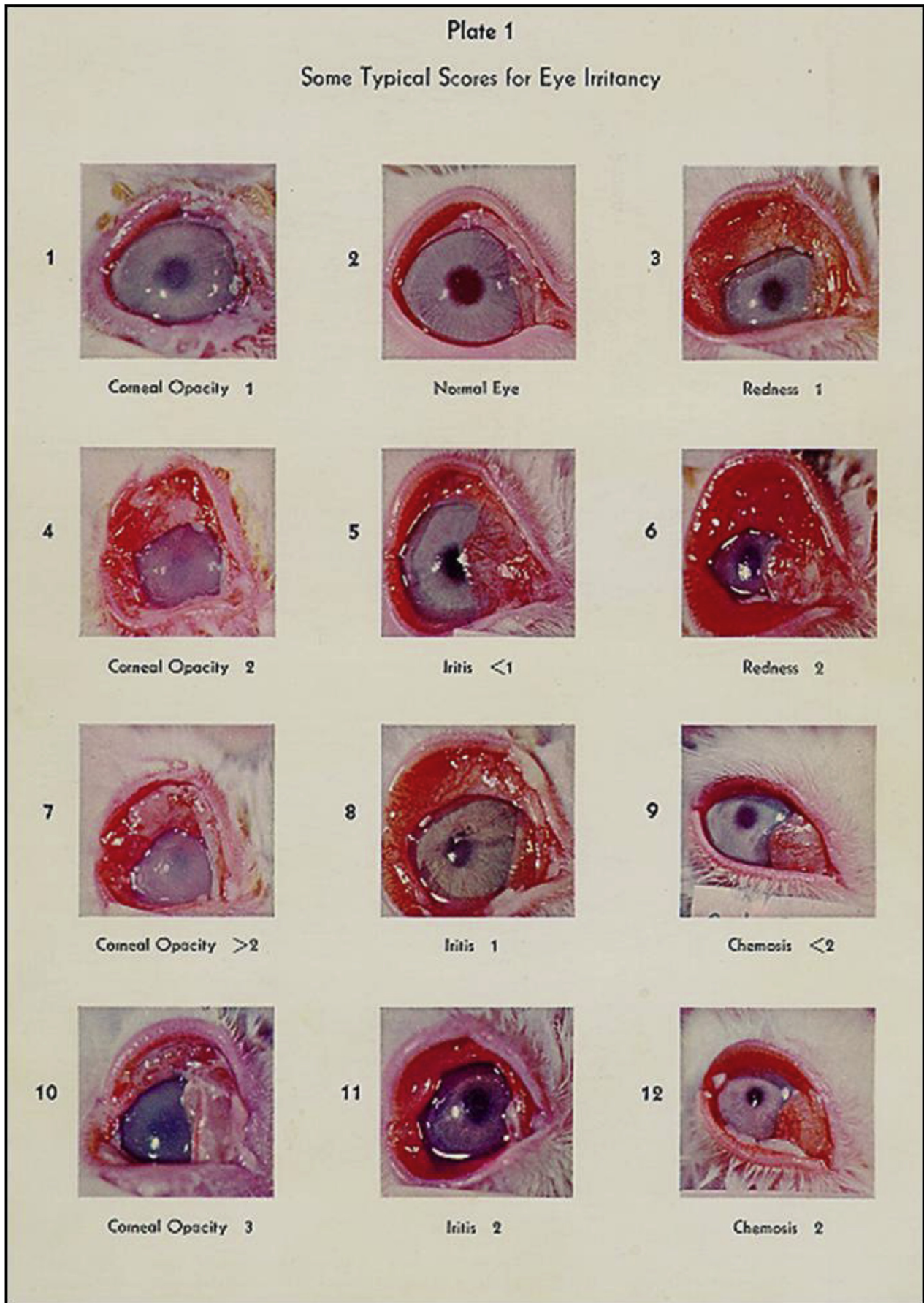


Fig. 1. FDA guidance on scoring of ocular lesions; Plate 1 (FDA, 1964).

Table 9

Examples of conjunctival scores (redness or swelling); Category 2 (first table) versus not classified (second table).

Time point 24 Hours	
Animal 1	2.0
Animal 2	2.0
Time point 48 Hours	
Animal 1	2.0
Animal 2	2.0
Time point 72 Hours	
Animal 1	2.0
Animal 2	2.0
Time point 4 Hours	
Animal 1	2.0
Animal 2	2.0
Time point 48 Hours	
Animal 1	2.0
Animal 2	2.0
Time point 72 Hours	
Animal 1	2.0
Animal 2	1.0

negative rates for identifying severe irritants, i.e. compounds identified by the ICE as not severely irritating, were not considered critical since these compounds are still to be tested in the *in vivo* rabbit eye test. In the OECD test guideline, the limitations with respect to the screening of surfactants, alcohols and solids were also mentioned. Specifically it was mentioned that: “*The current validation database did not allow for an adequate evaluation of some chemical or product classes (e.g. formulations). However, investigators could consider using this test method for testing all types of compounds (including formulations), whereby a positive result could be accepted as indicative of an ocular corrosive or severe irritant response. However, positive results obtained with alcohols should be interpreted cautiously due to risk of over-prediction*”. The specific mentioning of formulations is remarkable because the ICE is used more frequently for formulations than for pure compounds. Moreover, the Draize eye test also does not make any distinction between the testing of pure compounds and formulations. In general, one should realize that at that time the eye irritation potential of almost all, if not all, compounds had been determined for regulatory purposes in one single type of eye (test), i.e. the rabbit eye (test).

A follow-up evaluation of the usefulness and limitations of alternatives for identifying mild/moderate and non-irritant chemicals was made by NICEATM/ICCVAM, in collaboration with ECVAM and JaCVAM. In early 2011, a proposal for updating the BCOP TG 437 for the identification of chemicals not requiring a classification for eye irritation was submitted to the OECD by means of a Standard Project Submission Form (SPSF). The BCOP database comprised 196 compounds of which 89 were non-irritants, and these data were used to draft a Streamlined Summary Document (SSD). The BCOP was considered appropriate because the percentage of false negatives for non-irritants was 0%. However, the percentage of false positives was 69%. The ICE test was not proposed for such an update, because the review panel maintained the original recommendation to use the ICE only for classification of ocular corrosives and severe irritants. Specific objections against the use of the ICE for chemicals not requiring a classification was the fact that two compounds of the “parallel” dataset (coded TNO-28 and TNO-94) identified as non-irritants by the ICE turned out to be severe

irritants in the *in vivo* rabbit eye test. It was argued that the review panel had not studied the nature of the effects of these two false negative substances in detail. TNO-94 was an anti-fouling paint for the shipping industry, a specific type of product, which produced reversible irritating eye effects in two out of three rabbits. In the third rabbit an unusual effect occurred, i.e. adherence of the paint to the cornea which was reason to humanely sacrifice the animal on day 1. Anti-fouling paints are designed to be very durable which may explain the findings in this rabbit. Whether or not this peculiar effect is relevant for humans, excluding (anti-fouling) paints from ICE testing would have no major consequences for the applicability of the method for screening of non-irritants in general. TNO-28 caused no corneal or iris effects; only conjunctival effects were observed. The conjunctival effects observed with this compound were below the threshold for classification as an eye irritant. Eye effects had cleared completely in one rabbit after 72 h and in another rabbit after 7 days. The third rabbit showed increased conjunctival effects at 48 h after treatment and on day 14 moderate redness and slight swelling of the conjunctivae were still observed. Importantly, a white ocular discharge was also observed which was a sign of secondary infection. The fact that the same effects were observed at 21 days after treatment supported this assumption. One week later, the eye effects in this rabbit had cleared completely.

Overall, the ICE “parallel” data set provided by TNO showed a false negative rate for non-irritants of 6% and a false positive rate of 1%. Therefore, the OECD was asked to reconsider the applicability of the ICE for the purpose of identifying non-irritants. During an OECD expert meeting (6–7 December 2012, Paris), the limitations of the *in vivo* Draize rabbit eye irritation test and their implications for validation purposes were recognized and summarized in the document (OECD, 2013b) as follows:

1. “*The in vivo rabbit eye irritation/corrosion test has no standardized exposure regimen. Therefore, the duration of exposure of the test substance with the rabbit eyes remains unknown and can vary from a few minutes to several hours. In addition, for solids and sticky chemicals it is unclear how much of the compound (solid, paste or liquid) stays in contact with the eye;*
2. *The limited reproducibility of the Draize rabbit eye test method;*
3. *The subjectivity in the allocation of the rabbit ocular tissue scores;*
4. *The type of exposure which does not reflect a potential human accidental exposure;*
5. *The differences in physiology and sensitivity to tested chemicals between rabbit and human eyes”.*

The re-evaluation of the ICE ICCVAM dataset showed that individual *in vitro* and *in vivo* classifications of a number of compounds need further considerations. Discrepancies were found in the final *in vivo* and *in vitro* classifications for a number of compounds that had an impact on the final number of false negative compounds. After re-evaluation, the ICE test method had an overall accuracy of 82%, a false positive rate of 33%, and a false negative rate of 1% (instead of 6%) for non-irritants, when compared to the *in vivo* data classified according to the UN-GHS. If anti-fouling organic solvent containing paints were excluded from the database, the accuracy of the ICE test method was 83%, the false positive rate 33% and the false negative rate 0%.

In September 2013, the OECD TG 438 for the ICE was officially adopted including the identification of non-irritants (in general about 80% of the chemicals tested are non-irritants). This was a huge success for the ICE and for the 3Rs in general, but it still meant that compounds not identified by the ICE as non-irritant or severe irritant have to be tested in the *in vivo* rabbit eye test.

5. Lessons learned and considerations

- For eye irritation with a lack of human data, the combined *in vitro/in vivo* (parallel) testing instead of using *in vivo* rabbit eye irritation data from literature only provided an more relevant setting for i) developing and validating the alternative method, ii) introducing the method to industry and regulatory authorities, iii) getting insight in, and critically address the pros and cons of both the *in vitro* and *in vivo* test system.
- A meaningful validation of an *in vitro* alternative model in the middle range of irritancy (Category 2 classification) cannot be reached with the current *in vivo* rabbit eye irritation data set due to the large variability.
- The procedure to select or to accept models suitable as an *in vitro* alternative to eye irritation should be more critical than in the past. Alternatives should have a direct relation to (human) ocular irritancy and be developed on the basis of the mechanistic principles of (human) ocular inflammation, instead of matching Draize eye test results only.
- It should be realized that the existing *in vivo* rabbit eye irritation data does not reflect the inflammatory and recovery processes in humans. Therefore, the data of the Draize eye test are not suitable for the development of *in vitro* models for eye irritation focusing on discrimination between severe, but reversible or severe, but irreversible eye effects.
- The *in vivo* eye irritation test in rabbits should no longer be allowed, and should be completely replaced by alternative methods, for instance the ICE.
- The household and personal care industry that share their strategy to fulfil regulatory demands without the use of the *in vivo* animal test with other (chemical) industries and regulatory authorities, should be rewarded, e.g. by providing a 'safe harbour' to evaluate data derived from alternative methods (Schiffelers et al., 2014).

6. Conclusions

Alternatives to the Draize eye irritation test should preferably make use of *ex vivo* eyes, eye tissue, or eye tissue equivalents in order to measure, both qualitatively and quantitatively parameters similar or identical to those in the clinic. The appropriateness of the presently available alternatives, based on the above mentioned criteria and in order of suitability, is as follows:

1. Models using intact isolated eyes with slit-lamp microscope observations and histopathology, e.g. the ICE or IRE.
2. Models using excised corneas with light transmission and fluorescein measurements and histopathology, e.g. the BCOP (Bovine) or PCOP (Porcine).
3. 2D or 3D human corneal epithelium reconstruction models, which have as major disadvantage the lack of the different membranes of the cornea, corneal stroma and corneal endothelium.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found

online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.01.009>.

References

- Balls, M., Fentem, J.H., 1993. On Recognizing and Overcoming Barriers to the Acceptance of Alternative Methods. *Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences* 11, Part 11 a. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, New York.
- Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H., Spielmann, H., 1995. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. Vitro* 9, 871–929.
- Brantom, P.G., Cassidy, S., Eigler, D., Esdaile, D., Fentem, J.H., Liebsch, M., McPherson, J., Pfannenbecker, U., Prinsen, M.K., 2000. TNO BIBRA Report No. 2/3387/00. Preliminary Evaluation of the Application of Reference Standards in the Prevalidation and Validation of *in Vitro* Tests for Eye Irritation, vol. 2. December 2000.
- Bruner, L.H., Carr, G.J., Chamberlain, M., Curren, R.D., 1996. Validation of alternative methods for toxicity testing. *Toxicol. Vitro* 10 (4), 479–501.
- Burton, A.B.G., 1972. A method for the objective assessment of eye irritation. *Fd. Cosm. Toxicol.* 10, 209–217.
- Burton, A.B.G., York, M., Lawrence, R.S., 1981. The *in vitro* assessment of severe eye irritants. *Fd. Cosm. Toxicol.* 19, 471–480.
- Cazelle, E., Eskes, C., Hermann, M., Jones, P., McNamee, P., Prinsen, M., Taylor, H., Wijnands, M.V.W., 2014. Suitability of histopathology as an additional endpoint to the isolated chicken eye test for classification of non-extreme pH detergent and cleaning products. *Toxicol. Vitro* 28, 657–666.
- Chan, T., Payor, S., Holden, B.A., 1983. Corneal thickness profiles in rabbits using an ultrasonic pachometer. *Investigative Ophthalmol. Vis. Sci.* 24 (10), 1408–1410.
- Doughty, M.J., Zaman, M.L., 2000. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv. Ophthalmol.* 44 (5), 367–408.
- Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Methods for study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 377–390.
- EC, 1984. Directive 67/548 (6th adaptation); Annex V Part B: methods for the determination of toxicity B.5. Acute toxicity, eye irritation. *Official J. Eur. Community* 27 (L251), 109.
- EC, 1991. Collaborative Study on the Evaluation of Alternative Methods to the Eye Irritation Test. Document XI/632/91-V/E/1/131/91, part I and part II. European Commission, Brussels.
- EC, 1993. Commission directive 93/21/EEC of 27 April 1993 adapting to technical progress for the 18th time council directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. *Official J. Eur. Communities (L110A)*, 1–86.
- ECETOC, 1998. Eye Irritation – Reference Chemicals Data Bank. Technical Report No. 48(2). European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels.
- Faber, C., Scherfig, E., Prause, J.U., Sørensen, K.E., 2008. Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry *in vivo*. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 35, 39–43.
- FDA, 1964. Illustrated Guide for Grading Eye Irritation by Hazardous Substances. Washington, D.C. 20204, USA.
- Volume 70, No. 53, Monday, March 21 Federal Register notice 13513, 2005a. National Toxicology Program; National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM); Availability of Expert Panel Report on the Evaluation of the Current Validation Status of *in Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.
- Volume 70, No. 142, Tuesday, July 26 Federal Register notice 43149, 2005b. National Toxicology Program (NTP); NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM); Availability of Revised Analyses and Proposed Reference Substances for *in Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.
- Fowler, W.C., Chang, D.H., Roberts, B.C., Zarovnya, E.L., Proia, A.D., 2004. A new paradigm for corneal wound healing research: the white leghorn chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Curr. Eye Res.* 28 (No. 4), 241–250.
- Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D., Sina, J.F., 1992. Bovine corneal opacity and permeability test: an *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fund. Appl. Toxicol.* 18, 442–449.
- Grant, W.M., 1986. *Corneal Epithelial Vacuoles. Toxicology of the Eye*, third ed., vol. 1. Charles C. Thomas Publishers, Springfield, Illinois, USA, p. 9.
- Griffith, J.F., 1987. The low volume eye irritation test. *Soap Cosm. Chem. Spec.* 63 (4), 32–63.
- Griffith, J.F., Nixon, G.A., Bruce, R.D., Reer, P.J., Bannan, E.A., 1980. Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 501–513.
- ICCVAM, 2006a. Current Status of *in Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH. Publication No: 06–4513.
- ICCVAM, 2006b. *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives. NIH. Publication No: 07–4517.
- Jacobs, G., Martens, M., 1988. The enucleated eye test: a comparison of the use of ultrasonic and optic pachometers. *Toxicol. Vitro* 2 (4), 253–256.
- Jacobs, G., Martens, M., 1990. Quantification of eye irritation based upon *in vitro* changes of corneal thickness. *ATLA* 17, 255–262.

- Koëter, H.B.W.M., Prinsen, M.K., 1985. Comparison of in Vivo and in Vitro Eye Irritation Test Systems: a Study with 34 Substances. *Alternative Methods in Toxicology* 3, Chapter A9. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, New York.
- Li, H.F., Petroll, W.M., Møller-Pedersen, T., Maurer, J.K., Cavanagh, H.D., Jester, J.V., 1997. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr. Eye Res.* 16 (3), 214–221.
- Lordo, R.A., Feder, P.L., Gettings, S.D., 1999. Comparing and evaluating alternative (in vitro) tests on their ability to predict the Draize maximum average score. *Toxicol. Vitro* 13 (1), 45–72.
- Luepke, N., 1985. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd. Chem. Toxicol.* 23, 287–291.
- Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V., 2002. Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Regul. Toxic. Pharmacol.* 36, 106–117.
- McDonald, T.O., Baldwin, H.A., Beasley, C.H., 1973. Slit-lamp examination of experimental animal eyes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 24, 163–180.
- Mishima, S., Kudo, T., 1967. In vitro incubation of rabbit cornea. *Investig. Ophthalmol.* 6 (4), 329–339.
- OECD, 1981. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/corrosion. Adopted 12 May 1981. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2001. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 423: Acute Oral Toxicity (Acute Toxic Class method, Paris, France).
- OECD, 2002. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/corrosion. Adopted 24 April 2002. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2004. OECD guideline for testing of chemicals No. 431. In: *In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test*, Adopted 13 April 2004. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2009a. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, Adopted 7 September 2009. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2009b. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, Adopted 7 September 2009. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2010a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 429: Skin Sensitisation; Local Lymph Node Assay, Paris, France.
- OECD, 2010b. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 439: in Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method, Adopted 22 July 2010. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2012. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, Adopted 2 October 2012. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2013a. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Adopted 26 July 2013. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2013b. Draft Streamlined Summary Document (SSD) for the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. *ENV/JM/TG/RD(2013)19*.
- Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., Morikawa, Y., Yoshida, T., Fuji, A., Masuda, M., Ohno, T., Hayashi, M., Momma, J., Uchiyama, T., Chiba, K., Ikeda, N., Imanashi, Y., Itakagaki, H., 1999. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicol. Vitro* 13 (1), 73–98.
- Price, J.B., Andrews, I.J., 1985. The in vitro assessment of eye irritation using isolated eyes. *Fd. Cosm. Toxicol.* 23 (2), 313–315.
- Prinsen, M.K., 1996. The chicken enucleated eye test (CEET): a practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Fd. Chem. Toxicol.* 34 (3), 291–296.
- Prinsen, M.K., 1999. An evaluation of the OECD proposal for the harmonised classification of eye irritants and corrosives. Report of ECVAM workshop 34, eye irritation testing: the way forward, appendix 1. *ATLA* 27, 72–77.
- Prinsen, M.K., 2005. In Vitro and in Vivo Data for 94 Substances Tested in the Isolated Chicken Eye Test. Unpublished Data provided Directly to NICEATM by M.K. Prinsen. TNO Nutrition and Food Research Institute.
- Prinsen, M.K., Koëter, H.B.W.M., 1993. Justification of the Enucleated Eye Test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31 (1), 69–76.
- Rama, P., Matuska, S., Paganoni, G., Spinelli, A., De Luca, M., Pellegrini, G., 2010. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *New Eng. J. Med.* 363, 147–155.
- Roper-Hall, M.J., 1965. Thermal and chemical burns of the eye. *TransOphthalmol. Soc. U.K.* 85, 631–646.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. South Mimms, Potters Bar, Herts: Universities Federation for Animal Welfare.
- Scala, R.A., Springer, J., 1997. IRAG working group 6: guidelines for the evaluation of eye irritation alternative tests: criteria for data submission. *Fd. Chem. Toxicol.* 35, 13–22.
- Schiffelers, M.J., Blaauboer, B.J., Bakker, W.E., Hendriksen, C.F., Koëter, H.B., Krul, C., 2014. Regulatory acceptance and use of 3R models for pharmaceuticals and chemicals: expert opinions on the state of affairs and the way forward. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 41–48.
- Schutte, K., Prinsen, M.K., McNamee, P.M., Roggeband, R., 2009. The isolated chicken eye test as a suitable in vitro method for determining the eye irritation potential of household cleaning products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54 (3), 272–281.
- Terry, K.T., Khosla-Gupta, B.A., 2002. *Chemical and Thermal Injuries to the Ocular Surface. Ocular Surface Disease Medical and Surgical Management, Part III*. Springer-Verlag New York, Inc, pp. 100–112.
- Thoft, R.A., Friend, J., 1977. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Investigative Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 14–20.
- United Nations-Economic Commission for Europe (UN/ECE), 2007. *Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. UN, New York and Geneva. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.
- US-Federal Register, 1961. Title 21 Food and Drugs, Part 191 Hazardous Substances, § 191.12 Test for Eye Irritants.
- Wagoner, M.D., 1997. Chemical injuries of the eye: current concepts pathophysiology and therapy. *Surv. Ophthalmol.* 41 (4), 367–408.
- Weil, C.S., Scala, R.A., 1971. Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 19, 276–360.
- York, M., Lawrence, R.S., Gibson, G.B., 1982. An in vitro test for the assessment of eye irritancy in consumer products – preliminary findings. *Int. J. Cosmet. Sci.* 4, 223–234.



Tweede Kamer

DER STATEN-GENERAAL

**Rondetafelgesprek Ontwikkeling van
proefdiervrije onderzoeksmethoden**
(inbreng genodigden)

Blok 4
Dierproeven in het kader van
het beperken van gezondheids-
risico's (16.15 - 17.00 uur)

*Donderdag 14 september 2017
14.00 – 17.00 uur*

Geachte leden van de Tweede Kamer, dames en heren,

Een groot aantal Nederlandse patiëntenorganisaties – waaronder de Dutch Brain Council hebben in 2016 en 2017 zich tot de relevante beleidsministeries en de Tweede Kamer gewend om hun ernstige verontrusting kenbaar te maken over beleidsvoornemens vanuit overheid en politiek om te komen tot een ‘afbouwschema dierproeven in 2025’, in het bijzonder daar waar dit het onderzoek met non humane primaten betreft. De Dutch Brain Council is een platform van 25 hersengerelateerde patiëntenorganisaties die een spreekbuis wil zijn voor minimaal 4 miljoen mensen met een Hersenaandoening.

Naar aanleiding van deze brieven hebben nadere gesprekken plaatsgevonden met zowel het het ministerie van EZ als het ministerie van OC&W.

De genoemde patiëntenorganisaties hebben met waardering kennis genomen van zowel het NCad advies als het SCHEER rapport. Beide rapporten houden nadrukkelijk rekening met het nog noodzakelijke medische onderzoek naar ziektebeelden zowel op fundamenteel en toegepast niveau, die tot nu toe niet of onvoldoende behandeld kunnen worden. Waardoor – helaas – nog steeds onderzoek met proefdieren – inclusief non humane primaten – noodzakelijk zal blijven en waarschijnlijk ook tot na 2025.

Bijzonder positief aan het SCHEER rapport is dat het laat zien welke vooruitgang er de afgelopen 10 jaar is geboekt zowel rond het medisch onderzoek met non humane primaten, als op het terrein van het onderzoek naar proefdier vrije innovaties. Hiermee geeft dit rapport in aanvulling op het NCad advies ook de wegen aan waarlangs het onderzoek zich ook in de komende jaren kan en zou moeten ontwikkelen, daarbij ondersteund door een bijbehorend traject van validatie van alternatieven en wet- en regelgeving.

De genoemde patiëntenorganisaties constateren echter dat zo’n benadering ontbreekt in het rapport van het Rathenau Instituut ‘Van aap naar beter’. De conclusies van dit rapport staan haaks op het eerdere rapport van de KNAW ‘*Gebruik van niet-humane primaten (NHP) als proefdier. Nut en noodzaak?*’ uit 2014. Omdat beide rapporten afkomstig zijn van een KNAW instituut, verbazen wij ons over deze verschillen.

Daarbij komt dat onderstaande patiëntenorganisaties in onze brief aan de overheid van 16 september 2016 en in de mondelinge toelichting daarop bij het Rathenau Instituut, hebben aangegeven dat een afbouw van onderzoek met non humane primaten in Nederland vooralsnog ongewenst is. Deze brief staat weliswaar in de geraadpleegde bronnen op blz. 48, maar de conclusie in het voorwoord van het rapport op blz. 3 dat “eigenlijk iedereen achter de stelling stond dat het zo langzamerhand niet meer verantwoord is om apen te gebruiken voor onderzoek”, lijkt meer een standpunt op persoonlijke titel en wordt daarom zeker niet door ons gedeeld.

Vanzelfsprekend hebben wij begrip voor dat deel van de samenleving in Nederland en Europa dat problemen heeft met onderzoek met proefdieren en in het bijzonder met non humane primaten. Tegelijkertijd echter vertegenwoordigen wij als patiëntenorganisaties – circa 6 miljoen patiënten - ook een zeer groot deel van de burgers in Nederland en Europa die vooralsnog reikhalzend uitkijken naar een behandeling voor tot nu toe niet of nauwelijks te behandelen medische problematiek. In het bijzonder geldt dat voor de miljoenen burgers met

ernstige, nu nog niet te behandelen neurologische aandoeningen. Dit neemt overigens niet weg, dat wij ieder initiatief om het dierenwelzijn te verbeteren ondersteunen.

Vanzelfsprekend zijn wij ook niet voor het ondoordacht of onnodig gebruik van proefdieren in het medisch-wetenschappelijk onderzoek. Als daarvoor een even goed of beter alternatief beschikbaar zou komen, zijn wij de eersten die dat toe zouden juichen. Helaas moeten wij op dit moment constateren – daarbij gesteund door het NCad advies, het eerste KNAW rapport en het SCHEER rapport - dat hiervan op dit moment nog geen sprake is. Tot die tijd steunen wij het gebruik van de meest ‘state of the art’ werkwijzen in het proefdieronderzoek en de continue ontwikkeling en ondersteuning (met name in financiële zin) van de ontwikkeling van effectieve proefdiervrije innovaties.

Om nogmaals te benadrukken dat grote delen van de bevolking de roep om onderzoek naar tot nu toe niet of niet goed behandelbare ziekten ondersteunen, noemen wij de op grote schaal door de Nederlandse bevolking gedragen initiatieven, zoals het fietsen naar kanker voor Alpe d’H’zes, fietsen voor ALS naar de Mont Ventoux, de ALS Swim in Amsterdam, de ROPARUN, de zwemactiviteiten van Maarten van der Weijden, Spieren voor Spieren, enz. Kortom, een lange lijst van activiteiten waar Nederlandse burgers voor medisch-wetenschappelijk onderzoek op de been komen en aantonen onderzoek belangrijk te vinden.

Hen en ons kunt u niet teleurstellen, met dank voor uw aandacht.

De VSOP en de DBC zijn de penvoerders namens onderstaande organisaties.
namens onderstaande organisaties

C. Oosterwijk
Directeur VSOP

R. Scholten
Directeur Dutch Brain Council



Dutch **Brain Council**

Platform voor hersen-gerelateerde patiëntenorganisaties



VSOP

VOOR ZELDZAME EN GENETISCHE AANDOENINGEN



Oogvereniging



De Hart & Vaatgroep



Nederlandse
Federatie van
Kankerpatiënten
organisaties



SPIERZIEKTEN
NEDERLAND



**Nationale Vereniging
ReumaZorg Nederland**



**ALS
patients
connected**



Nierpatiënten Vereniging Nederland



DWARSLAESIE
ORGANISATIE
NEDERLAND



nederlandse
hypofyse
stichting

Het nut van proefdieren in het hersenonderzoek

Pieter Roelfsema

Directeur Nederlands Herseninstituut (KNAW)

In 1981 verloor Jens Naumann een oog door een ongeluk met een metaalsplinter. Een paar jaar later gebeurde een tweede ongeluk waarbij hij zijn andere oog verloor. Hij werd van de ene op de andere dag volledig blind. In 2002 liet hij zich opereren in Lissabon. Een neurochirurg plaatste elektroden op zijn hersenschors met als doel een camera aan te sluiten op de hersencellen, zodat Naumann weer iets zou kunnen zien. Naumann nam een paar weken eenvoudige patronen waar via de camera en was erg enthousiast. Maar daarna kwamen er complicaties. Eerst kreeg hij epileptische aanvallen, daarna bleek de aansluiting van de camera op zijn hersenen niet meer te werken en later kwam er ook nog een ontsteking rond het implantaat bij, waardoor het deels moest worden verwijderd¹. De prothese was vooraf niet getest in proefdieren en geen van de circa zestien in Lissabon geopereerde patiënten heeft baat gehad bij de prothese. De onderzoekslijn is daarna gestaakt.

Hersenonderzoek

Dit voorbeeld illustreert de behoefte aan gedegen proefdieronderzoek voor de ontwikkeling van nieuwe medische technologie. De meeste medische doorbraken zijn toe te schrijven aan onderzoek met proefdieren. In het hersenonderzoek bestuderen wetenschappers de werking van zenuwcellen om te begrijpen hoe gezonde hersenfuncties werken en ook hoe deze verstoord raken door ziekte. Zo is er veel geleerd over hoe we onze aandacht richten, hoe we dingen kunnen leren en wat er in onze hersenen gebeurt wanneer informatie doordringt in het bewustzijn. Dit soort kennis over hersenfuncties vormt de basis voor de bestrijding van hersenziekten zoals parkinson, alzheimer, huntington, depressie, schizofrenie, autisme, herseninfarcten en de gevolgen van bijvoorbeeld het zikavirus. Hersenonderzoek is van groot maatschappelijk belang omdat een kwart van de mensen in Nederland een hersenaandoening krijgt² en de kosten die gemoeid met hersenziekten enorm zijn (meer dan 10 miljard per jaar in Nederland)³. Hoewel ook onderzoek bij mensen wordt verricht en computermodellen en weefselkweken een belangrijke rol spelen in het onderzoek ontbreekt nog veel basale kennis waardoor proefdieronderzoek vooralsnog onontbeerlijk is.

Zorgvuldigheid

Als onderzoekers denken dat een dierproef nodig is, komen de drie v's in beeld: vervanging, verfijning en vermindering van dierproeven. Voorafgaand aan de proef moeten de onderzoekers aantonen dat het beoogde experiment van belang is, dat dezelfde informatie niet zonder een dierproef kan worden verkregen, dat ze niet meer dieren gebruiken dan nodig is en dat het ongerief voor de dieren zo klein mogelijk wordt gehouden. Dit wordt getoetst door de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD), de Dierexperimentencommissie (DEC) en de Centrale Commissie Dierproeven (CCD).

Waarom apen?

Voor sommige wetenschappelijke en medische vragen over de hersenen is onderzoek met apen noodzakelijk⁴. Dit geldt voor onderzoek naar complexere hersenfuncties die niet bestudeerd kunnen

¹ Zie voor een beschrijving <https://www.wired.com/2002/09/vision/> en ook het boek van Jens Naumann (2012), *Search for Paradise, A Patient's Account of the Artificial Vision Experiment*

² https://dutchbraincouncil.nl/Over_DBC/missie

³ <https://wetenschap.hersenstichting.nl/alles-over-hersenen/hersenaandoeningen/cijfers-over-patienten/cijfers-over-patienten>

⁴ Gebruik van niet-humane primaten (NHP) als proefdier nut en noodzaak? KNAW (2014)

Roelfsema, P. R. & Treue, S. Basic neuroscience research with nonhuman primates: A small but indispensable component of biomedical research. *Neuron* **82**, 1200–1204 (2014).

worden in bijvoorbeeld knaagdieren. Onderzoekers zijn zeer terughoudend met het gebruik van apen voor onderzoek, het gaat om 0.05% van de dierproeven in Nederland⁵. Onderzoek met apen heeft tot doorbraken geleid op het gebied van hersenprothesen voor patiënten met verlammingen en ook op het gebied van de diepe hersenstimulatie, een methode waarbij een elektrode wordt aangebracht in de hersenen om het trillen en de stijfheid van patiënten met de ziekte van Parkinson te verminderen (andere therapievormen zijn in ontwikkeling⁶). Met deze methode zijn meer dan 100.000 patiënten over de wereld behandeld. Diepe hersenstimulatie wordt nu ook toegepast in de psychiatrie als behandeling voor bijvoorbeeld ernstige dwangneurosen. In haar rapport "Van aap naar beter - Een verkenning en dialoog over proeven met apen" van begin dit jaar vroeg het Rathenau Instituut aandacht voor een aantal dilemma's in het onderzoek met apen. De meeste van deze vragen werden beantwoord door het recente rapport van de SCHEER-commissie van de EU "The need for non-human primates in biomedical research, production and testing of products and devices"⁷. Hierin wordt gesteld dat onderzoek met apen op een aantal wetenschappelijke gebieden, waaronder het hersenonderzoek, vooralsnog onmisbaar is.

Concluderend

Het aantal proefdieren dat nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe technologie is deels afhankelijk van de risicobereidheid van patiënten, artsen en de autoriteiten die nieuwe behandelingen beoordelen. Hoeveel informatie over de werking en veiligheid van een nieuwe behandeling moet zijn verkregen in dierproeven voordat hij in patiënten mag worden getest? Te hoge eisen leiden tot extra dierproeven en vertragen de introductie van nieuwe technologie in de kliniek. Te weinig preklinisch onderzoek kan leiden tot ongewenste medische risico's.

Hoe moet het nu verder met blinde patiënten zoals Jens Naumann? Er zijn ca. 40 miljoen blinden in de wereld en 76.000 in Nederland⁸. Proefdieronderzoek leverde inmiddels nieuwe behandelingsmogelijkheden op, zoals een prothese voor het netvlies van het oog. Ook is genterapie voor oogziekten in ontwikkeling. Bij een aanzienlijk percentage van de patiënten, zoals Naumann, zijn de ogen echter te zeer beschadigd voor therapie. Voor deze patiënten kunnen onderzoekers, dankzij de sterk verbeterde technologie, weer inzetten op de mogelijkheid om een camera op de hersenschors aan te sluiten. Het Nederlands Herseninstituut is een belangrijk onderzoekscentrum in de wereld waar onderzoek naar hersenschorsprothesen wordt gedaan om in de toekomst een veilige prothese voor blinde patiënten te ontwikkelen.

⁵ Zodoende 2015. Ter vergelijking met de voedselconsumptie: het gaat om ca. een aap in onderzoek per 1.000.000 dieren die in Nederland worden geconsumeerd

⁶ www.volkskrant.nl/wetenschap/nieuwe-parkinsontherapie-succesvol-bij-apen-klaar-om-op-mensen-getest-te-worden~a4514063

⁷ De publiekssamenvatting vindt u hier:

ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/docs/citizens_primates_en.pdf

⁸ <http://www.vision2020.nl/sitNL.html>

ONTWIKKELING VAN PROEFDIERVRIJE ONDERZOEKSMETHODEN

Blok 4: Dierproeven in het kader van het beperken van gezondheidsrisico's.

Robert Passier, hoogleraar en hoofd van de afdeling Applied Stem Cell Technologies aan de Universiteit Twente.

Humane stamcellen als veelbelovend alternatief voor het gebruik van proefdieren.

Stamcellen hebben de eigenschap dat ze kunnen vermeerderen en onder de juiste omstandigheden kunnen differentiëren naar functionele celtypes van het lichaam. Er zijn verschillende soorten stamcellen: zo kunnen we de zogenaamde *adulte* en *pluripotente* stamcellen onderscheiden. Adulte stamcellen kunnen we vinden in verschillende organen, zoals bijvoorbeeld in bloed, huid, darm, lever, hersenen, etc. Een belangrijk verschil tussen adulte en pluripotente stamcellen is het vermogen om te differentiëren naar verschillende celtypes van het lichaam. Adulte stamcellen van bijvoorbeeld de huid kunnen wél verschillende celtypes van de huid vormen, maar niet van andere organen, zoals bijvoorbeeld de hersenen. Echter, pluripotente stamcellen hebben de capaciteit om te differentiëren naar elk celtype van het lichaam. Pluripotente stamcellen vinden we dan ook tijdens de zeer vroege embryonale ontwikkeling, kort na de bevruchting van de eicel. In 1998 zijn voor het eerst humane embryonale pluripotente stamcellen geïsoleerd en in kweek gebracht. In 2007 zorgden een Japans team van wetenschappers onder leiding van Shinya Yamanaka voor een enorme doorbraak door in kweek gebrachte huidcellen van de mens om te zetten naar pluripotente stamcellen, de zogenaamde geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC). Deze iPSC hebben vergelijkbare eigenschappen met embryonale pluripotente stamcellen, maar hebben duidelijke voordelen op basis van ethische overwegingen en de mogelijkheid om patiënt-specifieke situaties na te bootsen in een kwekschaaltje (*in vitro*). De afgelopen 10 jaar zijn er enorme vooruitgangen geboekt, waardoor het eenvoudiger is geworden om van patiënten iPSC te genereren (uit bloedcellen of zelfs van cellen uit urine). Daarnaast zijn procedures om iPSC te differentiëren naar vele verschillende celtypes van het menselijk lichaam sterk verbeterd. In 2012, slechts 5 jaar na deze ontdekking, werd de nobelprijs uitgereikt aan Shinya Yamanaka, wat het belang van deze ontwikkelde technologie nog eens onderstreept. De afgelopen jaren hebben onderzoekers aangetoond dat humane stamcellen (zowel adulte als pluripotente) kunnen dienen als een *in vitro* testmodel voor het bestuderen van patiënt-specifieke ziekten en het testen van medicijnen en mogelijk een belangrijke rol kunnen spelen in de regeneratieve geneeskunde¹.

Een realistische transitie naar proefdiervrij door een kritische en multidisciplinaire benadering

Er zijn gebieden aan te duiden waar er goede mogelijkheden zijn om de transitie naar proefdiervrij onderzoek te maken. Het gebruik van humane hartspiercellen, afkomstig van humane pluripotente stamcellen, voor het testen van cardiotoxiciteit (schadelijke neveneffecten op hartspiercellen) zou mogelijk een goed alternatief kunnen zijn voor het gebruik van proefdieren, aangezien de neveneffecten van medicijnen in het algemeen een direct effect hebben op de hartspiercellen. Dit wordt ook door het CiPA (comprehensive *in vitro* proarrhythmia initiative)² van de FDA ondersteund, waarin het gebruik van deze humane stamcellen gebruikt dienen te worden voor het testen van de neveneffecten van medicijnen op hartspiercellen.

Aan de andere kant is het zeer lastig om bepaalde processen alleen *in vitro* te bestuderen. Het bestuderen van de embryonale ontwikkeling in proefdieren heeft bijvoorbeeld veel informatie opgeleverd, waardoor we veel te weten zijn gekomen over de morfologische veranderingen en processen, regulerende moleculaire netwerken en cellulaire interacties, die belangrijk zijn voor het verkrijgen van de noodzakelijk kennis om biologische processen tijdens de normale ontwikkeling en tijdens ziekten beter te begrijpen. Deze processen zijn soms (maar zeker niet altijd) vergelijkbaar tussen de verschillende diersoorten en de mens. Deze kennis gebruiken we bijvoorbeeld om humane pluripotente stamcellen te differentiëren naar de juiste celtypes door de stappen te volgen zoals deze ook plaatsvinden tijdens de embryonale ontwikkeling.

Ziekten of processen waarbij meerder organen en systemen een rol spelen, zijn op dit moment lastig te bestuderen zonder proefdieren te gebruiken. Bijvoorbeeld, regeneratie van hartweefsel voor herstel van functie na een hartinfarct is met de kennis van nu niet mogelijk zonder proefdieren. Echter, bij al deze complexe multifactoriële processen is het mogelijk om onderzoeksprojecten te initiëren die deelsegmenten van dit proces kunnen nabootsen. Met name geavanceerd gebruik van humane 3D systemen (zogenaamde organoïden of orgaan-op-chip modellen) in combinatie met een **multidisciplinaire aanpak** (e.g. samenwerking tussen biologen, technologen, klinici, chemici, farmacologen, mathematici, etc.) zijn veelbelovend en passen in de Nationale Wetenschapsagenda en het TOP sectoren beleid. Belangrijk om in dit kader te noemen dat het Human organ and disease models technologies (hDMT) consortium (<https://www.hdmt.technology>) is opgericht om de samenwerking van onderzoeksgroepen van verschillende universiteiten en instituten, die aan orgaan-op-chip modellen (proefdiervrije innovaties) werken, te stimuleren.

Het is van belang om ook het fundamentele onderzoek een belangrijke rol te geven. Het is namelijk niet altijd realistisch dat we binnen een korte periode van 3-5 jaar zien of het onderzoek tot een toepassing of product gaat leiden. Desalniettemin, deze inzichten zijn wel belangrijk om stappen te maken. Immers, het is moeilijk om te bouwen zonder een goed fundament!

In het kader van een multidisciplinaire samenwerking is het belangrijk om overheden, regulerende instanties, gezondheidsfondsen en bedrijven, en dierenwelzijns- en patiëntenorganisaties te betrekken bij het onderzoek om voor alle belanghebbenden een duidelijk en realistisch beeld te krijgen van de huidige stand van zaken en de verschillende mogelijkheden. Echter, **om de samenwerking tussen academische en private partners te vergroten, is een ander financieringsmodel gewenst.** Samenwerking door oprechte gezamenlijke interesse is meer waardevol dan de veelal verplichte in cash bijdrage, waardoor veel bedrijven afhaken.

1. *Passier, P. C. J. J. (2016). Waar het hart vol van is. Enschede: Universiteit Twente.*

2. *Cavero, I. & Holzgrefe, H. Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay, a novel in vitro/in silico paradigm to detect ventricular proarrhythmic liability: a visionary 21st century initiative. Expert Opin Drug Saf. 13, 745–758 (2014).*



Tweede Kamer

DER STATEN-GENERAAL

Rondetafelgesprek over Ontwikkeling van proefdiervrije onderzoeksmethoden Overige commentaren

C. Hendriksen, faculteit Diergeneeskunde UU

J. Knoester, Universiteit Groningen en M. Joëls, Universitair Medisch
Centrum Groningen

*Donderdag 14 september 2017
14.00 – 17.00 uur*

Bijdrage is gepubliceerd in het boek 'Hoe Zwaar is Licht' (pagina 140 – 142), samengesteld door Beatrice de Graaf en Alexander Rinnooy Kan (2016). Voor gebruik in de reader is toestemming verkregen van de Uitgever: uitgeverij Balans.

Kunnen nieuwe medicijnen ontwikkeld worden zonder proefdieren?

Coenraad F.M.Hendriksen, Emeritus hoogleraar alternatieven voor dierproeven, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht

Onderzoek naar aandoeningen bij de mens doen we al eeuwen. Vanaf het begin hebben studies in dieren daarvan deel uitgemaakt. Sterker nog, het dier was tot voor 60 jaar geleden een van de weinige modellen die we tot onze beschikking hadden. Dat het onderzoek met dieren wat opgeleverd heeft valt moeilijk te ontkennen. Het poliovaccin of een geneesmiddel als Tamoxifen tegen borstkanker zou er niet zijn geweest zonder dierproeven. Aan meer dan de helft van de Nobelprijzen voor de Geneeskunde heeft – geheel of gedeeltelijk – dierexperimenteel onderzoek ten grondslag gelegen.

Momenteel gebruiken we jaarlijks zo'n 550.000 dieren, het merendeel knaagdieren, voor uiteenlopende doeleinden als hart- en vaatziekten, het effect van klimaatveranderingen op vogeltrek, onderwijs of de diagnostiek van botulisme. Van alle dierproeven is circa 30 procent voor de ontwikkeling en controle van geneesmiddelen en vaccins. Zonder dierproeven had de wereld er anders uitgezien, dat is zeker.

Toch schuurt er iets. Veel experimenten zouden we niet op onszelf willen doen, waarom dan wel op dieren? Vanuit dat gevoel zijn de meeste Nederlanders voor een verbod op dierproeven, al worden de reacties genuanceerder wanneer we dieper ingaan op die vraag: geen dierproeven voor het zoveelste tabletje tegen hoofdpijn maar wel voor een medicijn tegen kanker.

De maatschappelijke bezwaren tegen dierproeven zijn verwoord in Europese en nationale wetgeving: de enige wetgeving op het gebied van bescherming van dieren die specifiek op maar één categorie dieren is gericht. Onze Wet op de dierproeven (Wod) verplicht iedere onderzoeker om een nieuw projectvoorstel te laten toetsen door een Dierexperimentencommissie en door de Centrale Commissie Dierproeven (CCD). Deze commissies beoordelen of het belang van het onderzoek opweegt tegen het ongerief voor de dieren en of het onderzoek ook niet zonder dieren kan. Wetgeving wordt wel eens gestolde ethiek genoemd.

Ook vanuit de onderzoekswereld zelf groeit de onvrede over het proefdiergebruik. Dierproeven zijn duur en tikken zwaar op de onderzoeksbudgetten. Daarnaast zorgt het papierwerk rondom een projectaanvraag ervoor dat een onderzoeker pas maanden na indiening met het onderzoek kan beginnen. Maar de achilleshiel van de dierproef is toch het feit dat het onderzoek een surrogaat is voor de mens. Resultaten van dierproeven moeten altijd met een kritische blik worden gezien; hoe vertaalbaar zijn die resultaten naar de mens. Waarom vallen 9 van de 10 ontwikkelde geneesmiddelen die door de dierstudies zijn gekomen alsnog af als ze in een klinische studie op de mens worden

getest? De tijd dat het adagium '*in vivo veritas*' gold, waarmee bedoeld werd dat de waarheid in de dierproeven lag, hebben we gehad.

Als dierproeven niet de gouden standaard zijn, wat dan? De oplossing wordt gezocht in de ontwikkeling van 3V-alternatieven: methoden die het proefdiergebruik kunnen Verfijnen (minder dieronvriendelijk), Verminderen en vooral Vervangen. Sinds de jaren zeventig vormt het 3V-principe wereldwijd het uitgangspunt van alle bestaande wetgeving op het gebied van dierproeven en heeft een significant effect gehad op het proefdiergebruik. Tussen 1980 en 2000 daalde het proefdiergebruik met 50 procent, vooral omdat er veel kritischer over werd nagedacht: is die dierstudie nu echt nodig of kunnen we niet met minder dieren werken? Vervangingsalternatieven, zoals *in vitro*-methoden (weefselkweek), werden populair, maar de resultaten waren vaak niet zodanig dat ze konden wedijveren met die van de dierstudies. Wel waren *in vitro*-methoden uitermate geschikt voor het screenen van grote aantallen stoffen op een mogelijke farmacologische werking en op neveneffecten. Farmaceutische bedrijven beschikken tegenwoordig over opstellingen met honderden gerobotiseerde *in vitro*-methoden die mogelijk interessante stoffen eruit pikken, voordat zij het bij dieren verder bestuderen. Per stof leidde dat tot een sterke daling in het proefdiergebruik, maar die werd deels weer teniet gedaan doordat door de snelle en effectieve selectie er meer stoffen beschikbaar kwamen voor bestudering in het dier.

Toch is er een reden optimistisch te zijn over de mogelijkheden voor de toekomst. De wetenschap maakt grote stappen op het gebied van *in vitro*-methoden, die ons veel relevante informatie geven en eveneens de potentie hebben om proefdieren te vervangen. Het gaat om innovatieve weefselkweekmethoden zoals het gebruik van stamcellen, vaak gekweekt in een 3D-structuur als miniorgaantjes (zogenaamde *organoid culturen*), of complexe celkweken zoals *organs-on-a-chip*, waarbij de verschillende celtypen van een orgaan met elkaar kunnen communiceren. Dat zal het mogelijk maken de effecten van potentiële geneesmiddelen op orgaanniveau te bestuderen. Maar het gaat om meer. Bij het geneesmiddelenonderzoek wordt het – onder strikte voorwaarden – steeds vaker mogelijk om met de meer relevante menselijke (stam)cellen te werken. Ook kunnen nu technologieën gebruikt worden die menselijke vrijwilligers kunnen blootstellen aan minieme doseringen van een mogelijk geneesmiddel en zo te leren over distributie in het lichaam. Dat alles is ook interessant voor '*personalised medicine*', waarbij de effectiviteit van geneesmiddelen wordt verbeterd door ze af te stemmen op patiëntengroepen. Verder kunnen bijvoorbeeld vaccins steeds beter gekarakteriseerd worden met analytische technieken als massaspectrometrie, vaak beter dan met een dierproef. En tenslotte zie je dat er in toenemende mate nagedacht wordt over andere onderzoeksstrategieën waarin niet de dierproeven maar de proefdiervrije methoden de standaard zijn.

Het onderzoek en daarmee ook de ontwikkeling van geneesmiddelen staat op een kantelpunt. Tot op heden waren de dierproeven daarin leidend, ondanks de beperkingen daarvan. De proefdiervrije methoden hebben nog beperkingen en onderzoek doen is vaak het kiezen tussen twee 'kwaden'. Maar de beperkingen van de proefdiervrije methoden zijn vroeg of laat op te lossen zoals het recente rapport *In Transitie* van de gezondheidsonderzoek financierende organisatie ZonMw dat laat zien. Ook het advies van het Nationale Comité advies dierproevenbeleid (NCad), in december 2016 uitgebracht aan de staatsecretaris van het ministerie Economische Zaken, wijst in die richting. Vòòr 2025 zouden we af moeten kunnen van proefdiergebruik voor het veiligheidsonderzoek op geneesmiddelen. Dat zal een uitdaging zijn, want zoals zo vaak zit het venijn in de staart. Zeker voor nieuwe geneesmiddelen geldt dat we ze één keer

in een complexer organisme dan een celkweek willen beoordelen voordat het medicijn aan mensen wordt toegediend. Op het gebied van complexiteit schieten de innovatieve methoden nog tekort. Daarnaast is het geneesmiddelenonderzoek onderhevig aan internationale wet- en regelgeving die voorschrijft onder welke voorwaarden een geneesmiddel op de markt mag komen. We zijn daardoor afhankelijk van andere landen die soms een andere ambitie hebben dan het terugdringen van het proefdiergebruik. Het antwoord op de vraag of nu nieuwe medicijnen zonder proefdieren ontwikkeld kunnen worden, is dus ontkennend. Maar een utopie is het zeker niet meer. Er zal eens een dag komen dat we ons afvragen waarom we in hemelsnaam ooit dieren hebben kunnen gebruiken voor geneesmiddelenontwikkeling.

Korte biosketch:

Coenraad Hendriksen studeerde diergeneeskunde aan de Universiteit van Utrecht. Na zijn afstuderen is hij als onderzoeker en proefdierdeskundige werkzaam geweest bij het RIVM en thans bij het Instituut voor Translationele Vaccinologie (Intravacc) te Bilthoven. Zijn onderzoek-interesses liggen vooral op het gebied van de alternatieven voor dierproeven, in het bijzonder binnen het vaccinonderzoek. Van 2000 tot 2016 is hij als bijzonder hoogleraar alternatieven voor dierproeven verbonden geweest aan de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht. Thans is hij emeritus hoogleraar bij de faculteit.

Aan Tweede Kamer der Staten-Generaal
T.a.v. voorzitter Vaste Commissie
voor Economische Zaken
Postbus 20018
2500 AE Den Haag

NAAM R.J.A.M. KRÜDERS
TELEFOON 06 – 24 47 23 49

BIJLAGE(N) -
KENMERK 17.347776/RvB

Datum 1 september 2017

Onderwerp Reactie rondetafelgesprek Ontwikkeling van proefdier vrije onderzoeksmethoden

Geachte heer Ziengs,

Op donderdag 14 september spreekt u in de setting van een Ronde Tafel over de ontwikkeling van proefdier vrije onderzoeksmethoden.

Tijdens deze Ronde Tafel gaat u op zoek naar antwoorden op de vragen hoe verdere afbouw van het gebruik van proefdieren (met name apen) door ontwikkeling van innovatieve onderzoeksmethoden gestalte kan krijgen en wat proefdier vrije innovatie betekent voor proefdieronderzoek in het algemeen.

Wij ondersteunen van harte de initiatieven die genomen worden om middels innovatieve methoden het proefdiergebruik terug te dringen en om in die innovaties een wereldpositie in te nemen in 2025.

Toch zouden wij graag de volgende overwegingen willen meegeven:

- Ook in de toekomst zal het onderzoek niet volledig zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden uitgevoerd. Hoewel proefdier vrije onderzoeksmethoden worden gezien als een belangrijke aanvulling, willen wij benadrukken dat met name in de medische biologie, host-microbe, neurobiologie, fysiologie, farmacie, immunologie en gedragsbiologie onderzoek aan complexe systemen essentieel blijft. Interacties tussen organen en tussen organismen en hun omgeving zijn zeer belangrijk voor ons begrip. Dit soort interacties zijn op dit moment nog niet goed in proefdier vrije systemen te onderzoeken.
- De gebruikte terminologie is vooralsnog niet eenduidig, en niet algemeen geaccepteerd, zoals ook in het NCad advies¹ wordt onderkend. Dit betreft onder meer de termen 'afbouw' en het centrale begrip 'proefdier vrij innoveren'.
- Het is verstandig goed onderscheid te maken tussen het werk aan populaties in het wild, productiedieren, en laboratoriumdieren.

¹ NCad advies, 'Transitie naar proefdier vrij onderzoek – Over mogelijkheden voor het uitfaseren van dierproeven en het stimuleren van proefdier vrije innovatie', 15 december 2016, publicatienummer 201609, p. 53-55-58.

- Om wereldwijd leidend te worden op het gebied van innovaties in proefdiergebruik binnen 7.5 jaar is een grote uitdaging. Dit zal een aanzienlijke investering vergen waarvoor binnen de huidige financieringsbronnen geen ruimte is.
- Wij nemen met enige zorg een trend waar waarbij proefdierwerk zich verplaatst naar andere landen waar minder stringente regelgeving is, soms met de talentvolle onderzoekers in het kielzog. Uiteraard moet men ergens beginnen met streven naar minder proefdiergebruik. Het is echter goed te realiseren dat verplaatsing voorlopig op wereldwijde schaal niet zal leiden tot vermindering van het totale proefdiergebruik, maar wel tot aantasting van het dierenwelzijn en zal leiden tot vertrek van goede onderzoekers uit Nederland.

Wij zouden u willen vragen dit mee te nemen in de discussie tijdens het Ronde Tafel gesprek en u bewust te zijn van het belang dat dit soort onderzoek dient, zeker voor wetenschap en gezondheid.

Wij wensen u een succesvolle bijeenkomst over de mogelijkheden die de proefdiervrije onderzoeksmethoden gaan bieden, maar vertrouw erop dat deze ontwikkeling niet ten koste zal gaan van het hoogwaardige proefdieronderzoek in Nederland. Wij zijn van harte bereid om een toelichting te geven.

Met vriendelijke groet,



Prof.dr. J. Knoester
Decaan Fac. Science & Engineering RUG



Prof.dr. M. Joëls
Decaan/Lid Raad van Bestuur UMCG



university of
groningen



umcg