



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

**RIVM opinie betreffende het rapport “Meeting the
Deadline of the 2013 EU Marketing Ban”**

RIVM rapport 340008001/2011



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

**RIVM opinie betreffende het rapport
"Meeting the Deadline of the 2013 EU
Marketing Ban"**

RIVM Briefrapport 340008001/2011

Colofon

© RIVM 2011

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

Laboratorium voor Gezondheidsbeschermingonderzoek;
Laboratorium voor Stoffen en Integrale Risicobeoordeling

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, in het kader van het project Beleidsadvisering Trendanalyse en Programmeringstudie.

Rapport in het kort

RIVM opinie betreffende het rapport "Meeting the Deadline of the 2013 EU Marketing Ban"

Op 15 juni 2011 heeft de Stichting "Een Dier Een Vriend" (EDEV) een brief gestuurd naar de Tweede Kamer om te pleiten tegen uitstel van het Europese handelsverbod in op dieren geteste (ingrediënten voor) cosmetica. Dit handelsverbod gaat maart 2013 in, maar er gaan binnen Europa stemmen op om het handelsverbod uit te stellen. De Stichting EDEV stelt dat uitstel van het handelsverbod niet nodig is omdat voldoende alternatieven voor dierproeven aanwezig zijn. Zij baseert zich hierbij onder meer op het rapport "Meeting the Deadline of the 2013 EU Marketing Ban - A Scientific Review of Non-Animal Tests for Cosmetics" van de "British Union for the Abolition of Vivisection" (BUAV). Dit rapport geeft aan dat voor alle toxicologische eindpunten waarvoor nu nog geen handelsverbod geldt adequate proefdiervrije methoden beschikbaar zijn voor het vaststellen van de veiligheid van cosmetica.

Deze mening is duidelijk een andere dan die van een groot aantal experts die op uitnodiging van de Europese Commissie per toxicologisch eindpunt de mogelijkheden voor proefdiervrije methoden voor veiligheidsonderzoek van cosmetica hebben verkend. Zij kwamen tot de conclusie dat de ontwikkeling van proefdiervrije methoden voor deze eindpunten nog minimaal 5-10 jaar nodig heeft (DG SANCO rapport).

Dit briefrapport bespreekt voor elk van de bovengenoemde eindpunten of en hoe de in het BUAV rapport voorgestelde testen gebruikt kunnen worden voor het vaststellen van de veiligheid van cosmetica.

Er is de laatste decennia internationaal veel vooruitgang geboekt bij het ontwikkelen van proefdiervrije alternatieve testen voor het vaststellen van de veiligheid van cosmetica. De acceptatie en implementatie van deze testen in internationale regelgeving voor regulatorisch vereiste kwantitatieve risicobeoordeling is echter veel minder ver gevorderd. De huidige stand van zaken geeft wel reden tot optimisme, maar het is nog te vroeg om regelgeving te implementeren op basis van de bestaande alternatieven. De komende 5-10 jaar wordt wel belangrijke vooruitgang verwacht op dit vlak. Het DG SANCO rapport bevat een realistische weergave van de huidige stand van zaken. Het RIVM is het dus niet eens met de conclusie van het BUAV rapport dat voor bovengenoemde eindpunten proefdiervrije methoden beschikbaar zijn voor het vaststellen van de veiligheid van cosmetica.

Trefwoorden: cosmetica, ingrediënten, handelsverbod, alternatieven voor dierproeven, toxicologie

Abstract

RIVM opinion on the report "Meeting the Deadline of the 2013 EU Marketing Ban"

June 15, 2011, the Foundation "An Animal A Friend" (EDEV) sent a letter to the House of Commons to argue against postponement of the EU trade ban on cosmetics (ingredients) tested on animals. This trade ban is due March 2013, but in Europe there is a growing body of opinion to postpone the trade ban. The Foundation EDEV argues that postponing the trade ban is unnecessary because sufficient alternatives to animal testing exist. This notion is based on the report "Meeting the deadline of the 2013 EU Marketing Ban - A Scientific Review of Non-Animal Tests for Cosmetics" of the "British Union for the Abolition of Vivisection" (BUAV). This report indicates that for all toxicological endpoints for which no trade ban exists, suitable non-animal methods for determining the safety of cosmetics are available.

This view clearly differs from that of a large number of experts that, upon invitation by the European Commission, have explored per toxicological endpoint the opportunities for non-animal methods for safety testing of cosmetics. They concluded that the development of non-animal methods for these endpoints needs at least 5-10 years (DG SANCO report).

The present report discusses for each for of the above-mentioned endpoints if and how the tests proposed in the BUAV report can be used to determine the safety of cosmetics.

Over the past decades, much progress has been made internationally in developing non-animal alternative tests for determining the safety of cosmetics. The acceptance and implementation of these tests in international guidelines for regulatory quantitative risk assessment is much less advanced. The current situation gives some cause for optimism, but it's still too early to implement guidelines based on the existing alternatives. Over the next 5-10 years significant progress is expected in this area. The DG SANCO report provides a realistic representation of the current situation. The RIVM therefore disagrees with the conclusions of the BUAV report that for the above-mentioned endpoints non-animal methods are available for determining the safety of cosmetics.

Keywords: cosmetics, ingredients, trade ban, alternatives to animal testing, toxicology

Inhoud

Samenvatting—6

1 Inleiding—8

2 Testen binnen de EU richtlijnen—9

3 Threshold of Toxicological Concern—11

4 Toxicokinetiek—12

4.1 Huidabsorptie—12

4.2 Overige kinetiek eindpunten—12

5 Toxiciteit na herhaalde blootstelling—13

5.1 5.1 Toxiciteit na herhaalde blootstelling, met uitzondering van carcinogeniteit en sensibilisatie—13

5.2 Carcinogeniteit—14

5.3 Huidsensibilisatie—14

6 Reproductie toxiciteit—16

7 Kwantitatieve risicobeoordeling—17

8 Integrated Testing Strategies (ITS)—18

9 Algemene conclusie—19

Appendix 1—20

Samenvatting

Op 15 juni 2011 heeft de Stichting "Een Dier Een Vriend" (EDEV) een brief gestuurd naar de Tweede Kamer om te pleiten tegen uitstel van het Europese handelsverbod in op dieren geteste (ingrediënten voor) cosmetica. Dit handelsverbod gaat maart 2013 in, maar er gaan binnen Europa stemmen op om het handelsverbod uit te stellen. De Stichting EDEV stelt dat uitstel van het handelsverbod niet nodig is omdat voldoende alternatieven voor dierproeven aanwezig zijn. Zij baseert zich hierbij onder meer op het rapport "Meeting the Deadline of the 2013 EU Marketing Ban - A Scientific Review of Non-Animal Tests for Cosmetics" van de "British Union for the Abolition of Vivisection" (BUAV). Dit rapport geeft aan dat voor alle toxicologische eindpunten waarvoor nu nog geen handelsverbod geldt (toxicokinetiek, toxiciteit na herhaalde blootstelling en reproductietoxiciteit) adequate proefdiervrije methoden beschikbaar zijn voor het vaststellen van de veiligheid van cosmetica.

Deze mening is duidelijk een andere dan die van een groot aantal experts die –op uitnodiging van de Europese Commissie– per eindpunt de mogelijkheden voor proefdiervrije methoden voor veiligheidsonderzoek van cosmetica hebben verkend. Zij kwamen tot de conclusie dat de ontwikkeling van proefdiervrije methoden voor deze eindpunten nog minimaal 5-10 jaar nodig heeft (DG SANCO rapport).

Dit briefrapport bespreekt voor elk eindpunt of en hoe de in het BUAV rapport voorgestelde testen gebruikt kunnen worden voor het testen van de veiligheid van cosmetica.

Door de EU Cosmetica Richtlijn worden geen specifieke proefdiertesten gevraagd voor toxicokinetiek, carcinogeniteit en reproductietoxiciteit. De manier waarop cosmetica beoordeeld moeten worden staat beschreven in lagere regelgeving van de EU "Scientific Committee on Consumer Safety" (SCCS). De Cosmetica Richtlijn gaat uit van vervanging door **gevalideerde** methoden. Om die reden ligt de nadruk in het DG SANCO rapport, net als in het SCCS memorandum uit 2009 op gevalideerde studies. In het memorandum wordt geconcludeerd dat er voor slechts vijf eindpunten gevalideerde alternatieve testen beschikbaar zijn; dit geldt niet voor toxicokinetiek, carcinogeniteit en reproductietoxiciteit.

De "Threshold of Toxicological Concern" (TTC) benadering wordt gebruikt om het risico te schatten van lage concentraties van stoffen aanwezig in voeding. Het is echter onduidelijk voor hoeveel (en welke) cosmetica ingrediënten aan de randvoorwaarden voor TTC wordt voldaan: valt de totale blootstelling beneden de TTC, past de chemische structuur binnen het domein waarvoor TTC kan voorspellen en het feit dat de route van blootstelling aan cosmetica niet oraal is (zoals voeding), maar via huid en luchtwegen.

Voor distributie en excretie zijn computermodellen beschikbaar. Deze hebben echter betrekking op geneesmiddelen; de waarde hiervan voor cosmetica is onzeker. Daarnaast zijn deze modellen ontwikkeld voor orale blootstelling, terwijl dit voor cosmetica via huid en luchtwegen plaatsvindt. Verder staat in het rapport dat voor metabolisme en excretie *in vitro* testen met hepatocyten beschikbaar zijn. Deze hebben opnieuw alleen betrekking op geneesmiddelen; de geschiktheid voor cosmetica is onbekend.

Voor toxiciteit na herhaalde blootstelling worden alleen alternatieven genoemd voor organen waarin vaak nadelige gevolgen worden gezien. Men kan niet stellen dat met de alternatieve testen die voor deze organen worden voorgesteld dezelfde veiligheid kan worden gegarandeerd als met een dierexperiment. Ondanks het feit dat deze alternatieve testen nog in ontwikkeling en/of validatie zijn, wordt gesteld dat hun voorspelbaarheid goed

tot uitstekend is, terwijl de conclusie daarvoor vaak is gebaseerd op een klein aantal modelstoffen. Het rapport merkt terecht op dat als deze testen al goede voorspellingen doen, het lastig is om de resultaten te gebruiken voor kwantitatieve risicoschatting.

Voor carcinogeniteit bestaat er redelijke overeenkomst met het DG SANCO rapport. De beste combinatie van testen in het BUAV rapport voorspelt 90% van de stoffen die kankerverwekkend zijn in proefdieren goed; 10% van deze stoffen dus niet.

De genoemde "Direct Peptide Reactivity Assay" is inderdaad veelbelovend, toch is het nog te vroeg om te stellen dat op basis van alleen deze test sensibiliserende activiteit voldoende goed kan worden voorspeld. Op basis van een teststrategie is dit op korte termijn wellicht wel mogelijk. Het rapport gaat echter voorbij aan het feit dat naast het identificeren van sensibiliserende activiteit het schatten van de sterkte van deze activiteit erg belangrijk is in de risico-evaluatie van dit type stoffen. Geen van de alternatieve testen beschreven in het rapport is hierop onderzocht.

Het rapport geeft aan dat er voor ontwikkelingstoxiciteit alternatieve testen zijn die per direct ingevoerd kunnen worden. Men spreekt van testen die gevalideerd zijn en een voldoende voorspellende waarde hebben. Dit is een onjuiste weergave van de stand van zaken: validatie met enige tientallen stoffen is voor reprotoxiciteit onvoldoende. Daarnaast is vervanging van een dierstudie door één *in vitro* test niet mogelijk voor een complex proces als embryogenese.

Veel proefdiervrije testen richten zich alleen op het identificeren van toxiciteit, en een vertaling naar sterkte of naar de *in vivo* situatie is (nog) niet mogelijk. Daarnaast zijn de testen maar beperkt gevalideerd en dus (nog) niet bruikbaar voor **kwantitatieve risicobeoordeling** in een regulatoire setting.

Er is de laatste decennia internationaal veel vooruitgang geboekt bij het ontwikkelen van proefdiervrije alternatieve testen voor het vaststellen van de veiligheid van chemische stoffen, waaronder cosmetica ingrediënten. De acceptatie en implementatie van deze testen in internationale regelgeving voor regulatorisch vereiste kwantitatieve risicobeoordeling is veel minder ver gevorderd. De huidige stand van zaken geeft wel reden tot optimisme. Het is echter nog te vroeg om regelgeving te implementeren op basis van de bestaande alternatieven. De komende 5-10 jaar wordt wel belangrijke vooruitgang verwacht op dit vlak. Het DG SANCO rapport bevat een realistische weergave van de huidige stand van zaken. Het RIVM is het dus niet eens met de conclusie van het BUAV rapport dat voor toxicokinetiek, toxiciteit na herhaalde blootstelling en reproductietoxiciteit adequate proefdiervrije methoden beschikbaar zijn voor het vaststellen van de veiligheid van cosmetica ingrediënten.

1 Inleiding

Op 15 juni 2011 heeft de Stichting "Een Dier Een Vriend" (EDEV) als voorzitter en Nederlands vertegenwoordiger van de "European Coalition to End Animal Experiments" (ECEAE) een brief gestuurd naar de Tweede Kamer om te pleiten tegen uitstel van het Europese handelsverbod in op dieren geteste (ingrediënten voor) cosmetica. Dit handelsverbod gaat per maart 2013 in, maar er gaan binnen Europa stemmen op om het handelsverbod uit te stellen. De Stichting EDEV stelt dat uitstel van het handelsverbod niet nodig is omdat voldoende alternatieven voor dierproeven aanwezig zijn. De Stichting EDEV baseert zich hierbij onder meer op het rapport "Meeting the Deadline of the 2013 EU Marketing Ban - A Scientific Review of Non-Animal Tests for Cosmetics" van de "British Union for the Abolition of Vivisection" (BUAV) en de onderliggende publicatie van Taylor et al. (ALTEX 28 (2011) 131-148). Deze publicatie geeft aan dat voor alle toxicologische eindpunten waarvoor nu nog geen handelsverbod geldt (toxicokinetiek, toxiciteit na herhaalde blootstelling en reproductietoxiciteit) adequate proefdiervrije methoden beschikbaar zijn voor het vaststellen van de veiligheid van cosmetica. Deze mening is duidelijk anders dan die van een groot aantal experts die –op uitnodiging van de Europese Commissie- per toxicologisch eindpunt de mogelijkheden voor proefdiervrije methoden voor veiligheidsonderzoek van cosmetica hebben verkend. Zij kwamen tot de conclusie dat de ontwikkeling van proefdiervrije methoden voor deze eindpunten nog minimaal 5 tot 10 jaar nodig heeft (DG SANCO draft for public consultation (2010) – http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/documents/public_consultation/index_en.htm; DG SANCO report (2011) http://ec.europa.eu/consumers/docs/annual_reports_animal_testing_13092011_en.pdf; Adler et al. Arch Toxicol 85 (2011) 367-485).

Dit briefrapport bespreekt voor elk toxicologisch eindpunt of en op welke manier de in het BUAV rapport voorgestelde testen gebruikt kunnen worden voor het testen van de veiligheid van (ingrediënten) voor cosmetica.

2 Testen binnen de EU richtlijnen

Een belangrijk punt dat in het BUAV rapport wordt gemaakt is dat er door de EU Cosmetics Richtlijn geen specifieke proefdiertesten worden gevraagd voor toxicokinetiek, carcinogeniteit en reproductietoxiciteit. In de Cosmetics Richtlijn (Directive 76/768/EEC en Regulation 1223/2009) zijn inderdaad geen datavereisten opgenomen; er worden dus geen specifieke testen in de Cosmetics Richtlijn genoemd. Wel wordt gesteld dat cosmetische producten onder normale of redelijkerwijs te verwachten gebruiksomstandigheden veilig moeten zijn. De manier waarop stoffen beoordeeld moeten worden staat beschreven in lagere regelgeving, de zogenoemde "Notes of Guidance" van de EU "Scientific Committee on Consumer Safety" (SCCS). In die "Notes of Guidance" staat dat de volgende eindpunten beschouwd worden als de basisset datavereisten:

- acute toxiciteit;
- huid- en oogirritatie en corrosiviteit;
- huid sensibilisatie;
- huid absorptie;
- toxiciteit na herhaalde blootstelling;
- mutageniteit/genotoxiciteit.

Voor specifieke stoffen (in producten die verwacht of bedoeld zijn voor gebruik op de huid die aan de zon wordt blootgesteld) is informatie over fotogeïnduceerde toxiciteit noodzakelijk. Als er sprake is van significante orale blootstelling of (afhankelijk van de toxiciteit van de stof) significante huidopname, zijn aanvullende data over carcinogeniteit, genotoxiciteit, reproductietoxiciteit en/of toxicokinetiek nodig. Ook kan door de SCCS om deze gegevens gevraagd worden op basis van de resultaten uit de studies van de basisset. In deze speciale gevallen zou het dus noodzakelijk kunnen zijn om proefdiertesten voor toxicokinetiek, carcinogeniteit en reproductietoxiciteit uit te voeren.

De Cosmetics Richtlijn gaat uit van vervanging door **gevalideerde** methoden (zie Appendix 1). Om die reden ligt de nadruk in het DG SANCO rapport evenals in het SCCS memorandum uit 2009 (SCCS/1294/10) op gevalideerde studies. In het SCCS memorandum wordt geconcludeerd dat er voor slechts vijf eindpunten gevalideerde testen beschikbaar zijn, zie onderstaande tabel.

Table 1: Actual status of available replacement alternatives and impact of European cosmetic testing and marketing bans

Validated replacement alternatives available	No validated replacement alternatives available	
→ endpoints <u>not</u> affected by EU testing or marketing ban	→ endpoints affected by EU testing ban (2009) EU marketing ban (2009)	→ endpoints affected by EU testing ban (2009) EU marketing ban (2013)
<ul style="list-style-type: none"> • skin corrosivity • skin irritation • dermal absorption • mutagenicity / genotoxicity* • phototoxicity 	<ul style="list-style-type: none"> • acute toxicity • eye irritation 	<ul style="list-style-type: none"> • repeated dose toxicity: <ul style="list-style-type: none"> - skin sensitisation - sub-acute toxicity - sub-chronic toxicity - chronic toxicity - carcinogenicity • reproductive toxicity • toxicokinetics

In het nu volgende gedeelte wordt per toxicologisch eindpunt de opinie van het BUAV rapport bediscussieerd. Binnen "toxiciteit na herhaalde blootstelling" vallen ook carcinogeniteit en sensibilisatie. Voorafgaand zal de "Threshold of Toxicological Concern" (TTC) benadering worden besproken.

3 Threshold of Toxicological Concern

In de rapportage van de BUAV worden een aantal methodieken genoemd die gebruikt kunnen worden in de risicobeoordeling voor (ingrediënten van) cosmetica. Een van deze methodieken is de zogenaamde "Threshold of Toxicological Concern" (TTC) benadering. Deze benadering is een instrument dat gebruikt wordt om het risico in te schatten van lage concentraties van stoffen die aanwezig zijn in voeding, waarvan de structuur bekend is, maar waarvoor geen of nauwelijks toxicologische gegevens bekend zijn. Op basis van een database met gegevens over stoffen (gegroepeerd op chemische structuur en toxicologische effecten) zijn innamedrempels afgeleid (de zogenaamde TTCs). Wanneer de blootstelling aan de specifieke stof, waarvoor geen toxicologische gegevens beschikbaar zijn, onder deze TTC ligt, kan er van worden uitgegaan dat de risico's verwaarloosbaar zijn. Dit betekent dus een heel grove inschatting van de veiligheid of risico's van deze stof, zonder noodzaak tot dierproeven. De TTC benadering kan een veelbelovend instrument zijn voor toepassing bij cosmetica ingrediënten. Echter, omdat de huidige TTCs zijn afgeleid op basis van alleen orale blootstellingstudies (proefdieren blootgesteld via het maagdarmkanaal), is een extrapolatie nodig, en wel voor blootstelling via de huid (dermaal) of via inademing (inhalatie). Omdat in die gevallen stoffen via een andere route het lichaam binnenkomen, kan het gedrag van een stof (absorptie en metabolisme) anders zijn dan na binnenkomst via de orale route. Hier speelt dus route-naar-route extrapolatie een rol.

De aan de TTC onderliggende database is gebaseerd op stoffen die in voeding terecht komen; het is daarom noodzakelijk om na te gaan in hoeverre de database ook bruikbaar is voor stoffen in cosmetica, bijvoorbeeld een haarkleurstof.

Daarnaast is een goede inschatting van de (interne) blootstelling aan een cosmetica ingrediënt nodig. Dit kan voor de dermale en inhalatie route ingewikkeld zijn. Bovendien kan blootstelling ook via meerdere routes tegelijk plaatsvinden.

Voor cosmetica ingrediënten waarvan de totale blootstelling onder de TTC ligt, waarvoor route-naar-route extrapolatie geen probleem is, en waarvan de structurele eigenschappen door de database worden afgedekt kan de TTC benadering in de toekomst inderdaad een bruikbaar instrument zijn. Het is op dit moment echter niet duidelijk voor hoeveel (en welke) cosmetica ingrediënten aan deze randvoorwaarden voldaan wordt. Als dit nader is onderzocht zou een dergelijke methodiek een goed startpunt zijn voor de beoordeling. Als de totale inname onder de TTC grens ligt kan een stof veilig gebruikt worden in cosmetica en zijn geen dierproeven nodig voor de stof bedoeld als cosmetica ingrediënt. Deze methodiek is ontwikkeld in het voedingsdomein; op dit moment wordt in Brussel geëvalueerd in hoeverre deze methodiek ook bruikbaar is voor risicoschatting van cosmetica ingrediënten. Eind 2011 wordt een opinie van de gezamenlijke Wetenschappelijke Comités van de Europese Commissie - DG SANCO - verwacht.

4 Toxicokinetiek

4.1 Huidabsorptie

OECD Technische Richtlijn 428 voor huidabsorptie is een breed geaccepteerde dierproefvrije methode voor het testen van chemische stoffen, waaronder cosmetica ingrediënten.

4.2 Overige kinetiek eindpunten

In het BUAV rapport wordt gesteld dat voor distributie en excretie computermodellen beschikbaar zijn. Deze "Physiologically Based Toxicokinetic" (PBTK) computermodellen hebben een grote potentie, maar de resultaten die genoemd worden hebben alle betrekking op geneesmiddelen. Ook voor geneesmiddelen is de onzekerheid vrij groot: 80% resp. 70% correcte voorspelling van distributie, resp. algemene farmacokinetiek. Voor geneesmiddelen levert dit echter geen groot probleem op. Een nieuwe 'werkzame stof' wordt in heel lage doseringen aan vrijwilligers gegeven; met de meetgegevens kan een computervoorspelling geverifieerd en zo nodig aangepast worden.

De algemene validiteit is voor cosmetica ingrediënten hoogst onzeker. De in het BUAV rapport genoemde computermodellen zijn veelal ontwikkeld voor orale blootstelling, de meest gebruikte toedieningroute bij geneesmiddelen, terwijl blootstelling aan cosmetica veelal via huid en longen plaatsvindt.

Het gebruik van PBTK modellen werd al op diverse plekken voorgesteld (EFSA, OECD TG 417, ECVAM). PBTK modellering heeft dan ook een grote potentie. Het probleem is echter dat PBTK modellen gevoed (geparameteriseerd) moeten worden met meetgegevens en deze zijn nog maar zeer beperkt te verkrijgen met proefdier vrije methoden (EFSA-Q-2006-118: "PBTK models require generic and chemical-specific information, some of which can be obtained in vitro" <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/449.pdf>).

In het BUAV rapport staat dat voor metabolisme en excretie *in vitro*, testen met hepatocyten beschikbaar zijn. Er zijn goede resultaten verkregen, echter deze resultaten hebben wederom louter betrekking op geneesmiddelen. De geschiktheid voor cosmetica ingrediënten is grotendeels nog onbekend.

5 Toxiciteit na herhaalde blootstelling

Onder "Toxiciteit na herhaalde blootstelling" wordt in dit briefrapport ook carcinogeniteit en huidsensibilisatie verstaan.

5.1 5.1 Toxiciteit na herhaalde blootstelling, met uitzondering van carcinogeniteit en sensibilisatie

Bij "Toxiciteit na herhaalde blootstelling" wordt de toxiciteit van stoffen onderzocht na herhaalde blootstelling gedurende een specifieke periode, die kan uiteenlopen van enkele weken tot levenslang. In deze studies wordt vastgesteld in welke organen toxiciteit optreedt en bij welke dosering dit gebeurt. In feite geeft het in één experiment een beeld van de nadelige gevolgen die in alle cellen, organen en (cel/orgaan)-systemen kunnen optreden.

Het is duidelijk dat een dergelijk proces niet *in vitro* is na te bootsen. Om experimenten met herhaalde blootstelling te vervangen zal een hele batterij *in vitro* testen ontwikkeld moeten worden. Echter, in het BUAV rapport worden alleen alternatieven besproken voor organen waarin veelvuldig nadelige gevolgen worden waargenomen, zoals de lever. Het is terecht dat in het Taylor artikel gesteld wordt dat niet alle aspecten van een proefdierexperiment afgedekt hoeven te worden met *in vitro* alternatieven om toch nog zeer voorspelbaar te zijn. Het is echter (volledig) onterecht om te stellen dat met de 8 alternatieve testen die voor deze beperkte set organen worden voorgesteld dezelfde veiligheid kan worden gegarandeerd als met een normaal dierexperiment, zelfs al wordt hier aangenomen dat het proefdier dat gebruikt wordt een slecht alternatief is voor de mens.

In het BUAV rapport worden 8 alternatieven genoemd, als losstaande testen, voor de meest voorkomende doelorganen. Ondanks het feit dat het rapport vermeldt dat deze zich in verschillende fases van ontwikkeling en/of validatie bevinden, wordt gesteld dat de voorspelbaarheid van deze testen goed, accuraat en zelfs uitstekend is terwijl de conclusie daarvoor in de meeste gevallen berust op een validatie met 15 of minder modelstoffen. Daarnaast wordt voorbijgegaan aan het feit dat naast een goede (positieve) voorspelbaarheid voor toxiciteit het minstens even belangrijk is dat stoffen die niet toxisch zijn ook negatief scoren en dus terecht een negatief testresultaat krijgen.

Het voorstel in het BUAV rapport is in feite een "Integrated Testing Systems" (ITS) benadering, met daarin de TTC benadering, "Quantitative Structure Activity Relationship" (QSAR) modellen en een batterij van *in vitro* testen. Ook voor dit toxicologische eindpunt wordt dus het TTC concept naar voren geschoven. In die gevallen waarin de blootstelling erg laag is, is dit een goede optie. Echter, ook voor cosmetica zal de blootstelling meestal zo hoog zijn dat het TTC concept niet gebruikt kan worden. QSAR modellen zijn veelbelovend, maar de algemene mening is dat QSAR modellen alleen voor speciale groepen chemische stoffen (bijvoorbeeld aromatische amines) gebruikt kunnen worden. Dan blijven de *in vitro* testen over. De huidige beschikbare testen kunnen het hele veld van toxiciteit na herhaalde blootstelling zeker nog niet afdekken. Daarnaast merkt het BUAV rapport terecht op dat als deze testen al goede voorspellingen doen, het nog niet eenvoudig is om deze resultaten te gebruiken in een kwantitatieve risicoschatting.

De bewering dat we op het moment met de bestaande *in vitro* testen al de "Toxiciteit na herhaalde blootstelling" kunnen voorspellen en een risicobeoordeling kunnen doen is gebaseerd op selectieve interpretatie van de resultaten en dus onterecht.

5.2 Carcinogeniteit

Wat betreft carcinogeniteit is het BUAV rapport redelijk in lijn met de feiten en gedachten uit het DG SANCO rapport. Terecht wordt in het Taylor artikel gesteld dat een klassieke 2-jaars carcinogeniteitstest nauwelijks nog wordt uitgevoerd en dat de carcinogeniteit veelal wordt bepaald met *in vitro* en *in vivo* genotoxiciteitstesten.

Beperking tot alleen *in vitro* genotoxiciteitstesten hoeft geen belemmering te zijn als er internationaal consensus wordt bereikt dat een positief resultaat in een *in vitro* genotoxiciteitstest voldoende aanwijzing is dat een stof carcinogeen is. Ondanks het feit dat de kans hierop groot is, zal dat toch nog goed uitgezocht moeten worden. De reden hiervoor is dat de *in vitro* testen lijden onder onterecht-positieve en onterecht-negatieve voorspellingen, vooral wat betreft de carcinogeniteit. De onterecht positieve voorspellingen zijn vooral belangrijk voor de industrie omdat die veelbelovende stoffen niet verder kan ontwikkelen op basis van een onjuist testresultaat. Op dit moment lopen er diverse initiatieven om de testen te verbeteren en zo het aantal onterecht positieve uitkomsten te verminderen. Belangrijker voor de consument echter zijn de onterecht negatieve voorspellingen. In het BUAV rapport voorspelt de beste combinatie van testen 90% van de stoffen die kankerverwekkend zijn in proefdieren goed; 10% van de kankerverwekkende stoffen wordt dus niet als zodanig herkend.

Het BUAV rapport noemt ook de cel transformatie assay als een goed *in vitro* alternatief. Deze test zou zowel genotoxische als niet-genotoxische kankerverwekkende stoffen herkennen; op basis van een aantal validatiestudies is dit inderdaad het geval. De verschillende validatiestudies laten een foute voorspelling zien in 1 op de 5 gevallen (in de studie met het slechtste resultaat) tot minder dan 1 op de 20 gevallen (in de studie met het beste resultaat). De cel transformatie assay lijkt dus een goed alternatief. Echter, het mechanisme achter de test is tot op heden onduidelijk.

De bovengenoemde carcinogeniteitstesten lijken voldoende betrouwbaar, maar risk managers en overheden zullen moeten aangeven of zij een foutenmarge van 1 op de 10 acceptabel vinden.

Additioneel wordt in het DG SANCO rapport melding gemaakt van veelbelovende nieuwe methoden zoals "read across" en QSARs, en genotoxiciteitstesten in 3D humane huidmodellen en de Greenscreen test.

Met een ITS systeem op basis van de bestaande *in vitro* genotoxiciteitstesten aangevuld met de 3D huidmodellen en de cel transformatie assay, aangenomen dat het mechanisme achter deze test wordt ontrafeld, moet een kwalitatieve voorspelling van de carcinogeniteit van stoffen te voorspellen zijn. Echter, dit betekent nog niet dat ook de sterkte van carcinogene activiteit van stoffen of drempelwaarden af te leiden zijn ten behoeve van kwantitatieve risicoschatting. Concluderend kan gesteld worden dat op termijn het vaststellen van carcinogeniteit zonder proefdieren waarschijnlijk mogelijk is.

5.3 Huidsensibilisatie

Het BUAV rapport heeft gelijk dat er veel kennis is over de mechanismen van sensibilisatie. Deze kennis heeft in de afgelopen jaren geleid tot het ontwikkelen van alternatieve testen gericht op verschillende onderdelen van het proces van sensibilisatie. In het BUAV rapport wordt gesteld dat de test om eiwitbinding te meten, de "Direct Peptide Reactivity Assay" (DPRA) zeer accuraat is om sensibiliserende activiteit vast te stellen en dat deze test zou volstaan om de bestaande proefdiertesten te vervangen. Naast eiwitbinding van de stof zijn er nog een aantal cruciale stappen in het proces van sensibilisatie waarvoor

verschillende testen in ontwikkeling zijn. Ofschoon er al meer dan 100 stoffen zijn getest in de DPRA en deze test inderdaad veelbelovend is, is het nog te vroeg om te stellen dat alleen op basis van deze test stoffen met voldoende mate van voorspelbaarheid kunnen worden getest. Waarschijnlijk geeft een ITS benadering waar de DPRA dan onderdeel van zou moeten uitmaken een nauwkeuriger resultaat. Dit wordt ook in het EU rapport beschreven, waarbij vermeld wordt dat deze testen veelbelovend zijn. Een stap die nog gemaakt moet worden is het valideren van een dergelijke ITS om de accuraatheid vast te stellen.

Een teststrategie voor identificatie van sensibiliserende verbindingen zonder proefdieren is op korte termijn wellicht mogelijk. Echter, het BUAV rapport gaat voorbij aan het feit dat naast het identificeren van sensibiliserende activiteit het schatten van de sterkte van de sensibiliserende activiteit, een heel belangrijk aspect is van de risico-evaluatie van dit type stoffen. Zonder dergelijke informatie is risico-evaluatie onmogelijk. Geen van de alternatieve testen die in het BUAV rapport zijn beschreven is nog onderzocht op het vermogen om de sterkte van de sensibiliserende activiteit aan te geven. Dat maakt dat er momenteel geen testen voorhanden zijn anders dan proefdiertesten die dat wel kunnen. Goed gefundeerde risicomanagement beslissingen voor nieuwe producten zijn, op geleide van alleen *in vitro* onderzoek, nu nog onmogelijk. Indien de risico-evaluatie alleen gebaseerd is op de huidige *in vitro* testen, kan de sterkte van de sensibiliserende respons niet meegenomen worden. De gevolgen hiervan zijn een kwestie van risicomanagement.

6 Reproductie toxiciteit

Het Taylor artikel betoogt dat er testen zijn die per direct ingevoerd kunnen worden als alternatief voor de bestaande dierstudie voor ontwikkelingstoxiciteit. Men spreekt van testen die gevalideerd zijn en een voldoende voorspellende waarde hebben. Dit is een onjuiste weergave van de stand van zaken.

Ten eerste is er internationaal geen consensus over wat moet worden verstaan onder adequate validatie. Inmiddels is uit de praktijk gebleken dat in de ontwikkelingstoxicologie een validatie met enkele tientallen stoffen (en de daaraan ontleende voorspellende waarde) onvoldoende inzicht geeft in de toepasbaarheid van een test voor het hele universum van chemische stoffen. Het Taylor artikel haalt zelfs een studie aan waarin 7 van slechts 8 stoffen correct voorspeld werden. Het zal duidelijk zijn dat dit aantal geen voldoende zekerheid biedt over de algemene toepasbaarheid van de betrokken test. Ten tweede is een één op één vervanging van een dierstudie door een *in vitro* test niet opportuun voor een complex proces als de embryogenese. De bewering dat "de stamceltest de ontwikkeling van het embryo bestrijkt" is hiervan een illustratie. De studie van Schenk et al. (*Reprod Toxicol* 30 (2010) 200-218), die als voorbeeld voor een testbatterij wordt genoemd (en waarbij ook het RIVM een rol speelde), werd uitgevoerd met nauwkeurig geselecteerde teststoffen die in één van de testen een effect zou moeten geven. Dit was daarom geen algemene validatie maar een eerste aanzet tot het formuleren van een testbatterij.

De SCCS rapportage geeft een genuanceerd beeld, ze geeft aan dat er veel vooruitgang wordt geboekt met het ontwikkelen van alternatieven, maar concludeert terecht dat het op dit moment niet opportuun is om een volledige kwantitatieve risicobeoordeling uit te voeren met gebruikmaking van louter alternatieve (in vitro) testen.

Het RIVM onderschrijft deze conclusie.

7 Kwantitatieve risicobeoordeling

Zoals het BUAV rapport aangeeft zijn er momenteel veel *in vitro* testen beschikbaar. Deze testen beschrijven vaak slechts een onderdeel van een *in vivo* studie, en onderzoeken bijvoorbeeld alleen levertoxiciteit. Veel van deze testen richten zich alleen op het identificeren van toxiciteit, en een vertaling naar sterkte of naar de *in vivo* situatie is (nog) niet mogelijk. Daarnaast zijn de testen maar beperkt gevalideerd (onder andere vanwege het feit dat slechts een beperkt aantal stoffen is getest) en dus (nog) niet bruikbaar voor een **kwantitatieve risicobeoordeling** in een regulatoire setting.

8 Integrated Testing Strategies (ITS)

Zoals recent ook door Prof Rogiers beschreven (Arch Toxicol 85 (2011) 363-364) is er de laatste jaren internationaal veel vooruitgang geboekt bij de ontwikkeling van ITS. Hierbij wordt de stof vanuit een risicoperspectief onderzocht, en door middel van een getrapte benadering de relevante informatie verzameld of gegenereerd. Op die manier kunnen proefdierstudies heel gericht en alleen indien nodig worden ingezet voor het veiligheidsdossier. Omdat er in de Cosmetics Richtlijn alleen wordt gesproken over 'Vervanging' is een ITS aanpak waarin ook proefdierstudies zijn opgenomen voor cosmetica ingrediënten volgens die Cosmetics Richtlijn niet mogelijk.

9 Algemene conclusie

Er is in de laatste decennia internationaal veel vooruitgang geboekt bij het ontwikkelen van proefdiervrije alternatieve testen voor het vaststellen van de veiligheid van chemische stoffen, waaronder cosmetica ingrediënten. Daardoor is er ook meer kennis gegenereerd over de mechanismen waarlangs chemische stoffen schadelijk kunnen zijn. Dit heeft er ongetwijfeld toe geleid dat bepaalde stoffen niet in proefdieren getest en niet op de markt gebracht zijn. Dat heeft op zich al een proefdierbesparing en efficiencyverhoging opgeleverd.

Echter, de acceptatie en implementatie van alternatieve testen in de internationale regelgeving voor regulatorisch vereiste kwantitatieve risicobeoordeling is veel minder ver gevorderd. Dit heeft twee belangrijke oorzaken. In de eerste plaats bevatten alternatieve testen slechts onderdelen van bestaande *in vivo* testen op basis van het complete organisme. Een individuele alternatieve test zal dus nooit een compleet antwoord kunnen geven op de vraag of een stof schadelijk is in een compleet organisme. Er is dus een combinatie van testen nodig om de voorspelling van schadelijkheid te optimaliseren. Zulke testbatterijen zijn nog sterk in ontwikkeling, en naar verwachting zal het voor de meeste eindpunten nog een aantal jaren duren voordat een acceptabel voorstel op tafel ligt. Het is vooral lastig om een dergelijke testbatterij te definiëren omdat we nog niet goed op de hoogte zijn van alle mogelijke mechanismen waarlangs een stof schadelijk kan zijn. Daarnaast geldt dat het complete organisme meer is dan de som van een aantal onderdelen. De complexe interactie in het lichaam tussen organen en fysiologische functies is dan ook moeilijk te vangen in een combinatie van alternatieve testen. Er wordt op dit moment wereldwijd veel onderzoek gedaan, zowel aan individuele alternatieve testen als aan het ontwerpen van testbatterijen op basis van *in vitro* testen die de belangrijkste elementen bevatten voor het vaststellen van schadelijkheid van stoffen. Deze benadering is echter nog volop in ontwikkeling en heeft nog een aantal jaren nodig om vruchten af te werpen.

De huidige stand van zaken geeft echter wel reden tot optimisme, aangezien in de laatste tien jaar onder meer nieuwe moleculaire technieken en fysiologische computermodellen beschikbaar zijn gekomen die de ontwikkeling en toepassing van alternatieven naar een hoger plan kunnen brengen. Het is echter nog te vroeg om regelgeving te implementeren op basis van de bestaande alternatieven. In de komende 5 á 10 jaar wordt wel belangrijke vooruitgang verwacht op dit vlak indien de vereiste doelgerichte investeringen in voldoende mate plaatsvinden.

Het RIVM heeft als overheidsinstituut op de grens van innovatief onderzoek en beleidsimplicaties een sleutelrol om de kwaliteit van de veiligheidsevaluatie van chemische stoffen te garanderen en tegelijkertijd zoveel als mogelijk en verantwoord is de implementatie van alternatieven in de regelgeving te bevorderen. Het DG SANCO rapport bevat naar ons oordeel een realistische weergave van de huidige stand van zaken zoals hierboven aangeduid. Deze kan kort worden samengevat als veelbelovend maar nog niet rijp voor implementatie. Het RIVM is het dus niet eens met de conclusie van het BUAV rapport dat voor toxicokinetiek, toxiciteit na herhaalde blootstelling en reproductietoxiciteit adequate proefdiervrije methoden beschikbaar zijn voor het vaststellen van de veiligheid van ingrediënten van cosmetica.

Appendix 1

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20100301:en:PDF>

Member States shall prohibit the marketing of cosmetic products containing ingredients or combinations of ingredients which, in order to meet the requirements of this Directive, have been the subject of animal testing using a method other than an alternative method **after such alternative method has been validated and adopted at Community level with due regard to the development of validation within the OECD.**

Member States shall prohibit the performance on their territory of animal testing of ingredients or combinations of ingredients in order to meet the requirements of this Directive, no later than the date on which such tests are required **to be replaced by one or more validated methods** listed in Commission Regulation (EC) No 440/2008 of 30 May 2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) (1) or in Annex IX to this Directive.

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl