

11 JULI 2001. — Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu

ALBERT II, Koning der Belgen,

Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de wet van 21 december 1998 betreffende de productnormen ter bevordering van duurzame productie- en consumptiepatronen en ter bescherming van het leefmilieu en de volksgezondheid, inzonderheid artikel 5, § 1, eerste lid, 3° en 5°;

Gelet op de richtlijn 2000/32/EG van de Commissie van 19 mei 2000 tot zesentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen;

Gelet op het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, 14 september 1989, 19 juli 1994, 13 november 1997, 14 december 1998, 25 november 1999, 4 februari 2000 en van 28 september 2000 en waarvan bijlage VI gerectificeerd werd door het ministerieel besluit van 10 oktober 2000;

Gelet op de omstandigheid dat de Gewestregeringen bij het ontwerpen van dit besluit betrokken zijn;

Gelet op het advies van de Federale Raad voor Duurzame Ontwikkeling van 6 februari 2001;

Gelet op het advies van de Hoge Gezondheidsraad van 18 januari 2001;

Gelet op het advies van de Raad voor het Verbruik van 18 december 2000;

Gelet op het advies van de Centrale Raad voor het Bedrijfsleven van 19 januari 2001;

Gelet op het advies van de Inspecteur van Financiën van 18 december 2000;

Gelet op het akkoord van de Minister van Begroting gegeven op 17 april 2001;

Gelet op de beraadslaging van de Ministerraad betreffende de adviesaanvraag binnen een termijn van één maand;

Gelet op het advies 31588/3 van de Raad van State, gegeven op 3 juli 2001, met toepassing van artikel 84, eerste lid, 1°, van de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, vervangen door de wet van 4 augustus 1996;

Op de voordracht van Onze Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

Artikel 1. De bijlagen van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, worden gewijzigd als volgt :

1° Deel B, van bijlage V aangevuld door het koninklijk besluit van 14 september 1989 en gewijzigd door de koninklijke besluiten van 13 november 1997, 14 december 1998 en 4 februari 2000 wordt gewijzigd als volgt :

- a) De tekst van bijlage IA van dit besluit vervangt hoofdstuk B.10.
- b) De tekst van bijlage IB van dit besluit vervangt hoofdstuk B.11.
- c) De tekst van bijlage IC van dit besluit vervangt hoofdstuk B.12.
- d) De tekst van bijlage ID van dit besluit vervangt hoofdstuk B.13 en B.14.
- e) De tekst van bijlage IE van dit besluit vervangt hoofdstuk B.17.
- f) De tekst van bijlage IF van dit besluit vervangt hoofdstuk B.23. De titel van hoofdstuk B.23 in de verklarende nota wordt dienovereenkomstig gewijzigd.
- g) De tekst van bijlage IG van dit besluit wordt toegevoegd.

2° Het vierde streepje van de algemene inleiding van het deel C van bijlage V aangevuld door het koninklijk besluit van 14 september 1989 en gewijzigd door de koninklijke besluiten van 13 november 1997, 14 december 1998 en 4 februari 2000, wordt geschrapt.

3° Bijlage IX, vervangen door het koninklijk besluit van 13 november 1997 wordt gewijzigd overeenkomstig bijlage II van dit besluit.

Art. 2. Onze Minister bevoegd voor leefmilieu is belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken,
Volksgezondheid en Leefmilieu,

« **B.10. MUTAGENITEIT – IN VITROTEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN ZOOGDIERCELLEN****1. METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG473 van de OESO : In-vitrotest op chromosoomafwijkingen in zoogdiercellen (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vitrotest op chromosoomafwijkingen is bedoeld om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen bij gekweekte menselijke cellen veroorzaken (1) (2) (3). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen : het chromosoomtype en het chromatidetype. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat een chemische stof numerieke afwijkingen kan veroorzaken. Deze methode is echter niet opgezet om numerieke afwijkingen te meten en wordt normaal gesproken niet voor dat doel gebruikt. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen die veranderingen in oncogenen en tumorsuppressorgenen van somatische cellen veroorzaken, betrokken zijn bij de inductie van kanker bij de mens en bij proefdieren.

Bij de in-vitrotest op chromosoomafwijkingen kunnen culturen van permanente cellijnen, celstammen of primaire celculturen worden gebruikt. De gebruikte cellen worden geselecteerd op basis van het groeivermogen in een cultuur, de stabiliteit van het karyotype, het aantal chromosomen, de verscheidenheid van de chromosomen en de frequentie van spontane chromosoomafwijkingen.

Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit maar door veranderingen in de pH of de osmolaliteit of een sterke cytotoxiciteit worden veroorzaakt, worden vermeden (4) (5).

Deze test wordt gebruikt voor de screening op mogelijke mutagenen en carcinogenen voor zoogdieren. Veel stoffen die positief op deze test reageren, zijn carcinogeen voor zoogdieren, maar er is geen absolute correlatie tussen deze test en carcinogeniteit. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en het lijkt er steeds meer op dat er carcinogenen zijn die met deze test worden gesignaleerd omdat ze blijkbaar via andere mechanismen dan directe DNA-beschadiging werken.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Endoreduplicatie : een proces waarbij de kern na een S-fase met DNA-replicatie niet tot mitose overgaat, maar opnieuw een S-fase begint. Het resultaat is chromosomen met 4, 8, 16, ... chromatiden.

Hiaat : een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

Mitotische index : de verhouding tussen het aantal cellen in de metafase en het totale aantal cellen in een populatie; deze index geeft een indicatie van de snelheid waarmee deze populatie zich voortplant.

Numerieke afwijking : een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte cellen.

Polyplöidie : het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen (n) dan het diploïde aantal (d.w.z. 3n, 4n, enz.).

Structurele afwijking : een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Celculturen worden zowel met als zonder metabole activering aan de teststof blootgesteld. Op vooraf bepaalde tijdstippen na de blootstelling van de celculturen aan de teststof worden ze met een metafasesstopper (bv. Colcemid® of colchicine) behandeld, geoogst en gekleurd en worden de cellen in de metafase microscopisch onderzocht op de aanwezigheid van chromosoomafwijkingen.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.4.1. Voorbereiding****1.4.1.1. Cellen**

Er kunnen verschillende soorten cellijnen, stammen of primaire celculturen worden gebruikt, waaronder ook menselijke cellen (bv. fibroblasten van Chinese hamsters of menselijke of van andere zoogdieren afkomstige perifere bloedlymfocyten).

1.4.1.2. Media en kweekomstandigheden

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden (kweekvat, CO₂ -concentratie, temperatuur en vochtigheid) voor de culturen. Permanente cellijnen en stammen moeten geregeld worden gecontroleerd om na te gaan of het modale aantal chromosomen stabiel is en er geen besmetting met mycoplasma heeft plaatsgevonden; indien dit laatste het geval is, mogen ze niet worden gebruikt. De normale tijd voor de celcyclus bij de gebruikte cellen en kweekomstandigheden moet bekend zijn.

1.4.1.3. *Bereiding van de culturen*

Permanente cellijnen en stammen : cellen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de kolonies voor het oogsten niet aaneengroeien, en bij 37°C geïncubeerd.

Lymphocyten : met een stollingsremmer (bv. heparine) behandeld volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten van gezonde proefpersonen worden toegevoegd aan het kweekmedium met een mitogeen (bv. fytohemagglutinine) en bij 37°C geïncubeerd.

1.4.1.4. *Metabole activering*

De cellen dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) of een mengsel van fenobarbiton en β -naftoflavon (10) (11) (12).

De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-10 % (v/v) in het uiteindelijke medium. De omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen zal wellicht meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie moeten worden gebruikt.

Een aantal ontwikkelingen, bijvoorbeeld de opbouw van genetisch aangepaste cellijnen waarin specifieke activeringsenzymen tot expressie komen, kan endogene activering mogelijk maken. Voor de keuze van de gebruikte cellijnen moet een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven (bv. aan de hand van de relevantie van het cytochroom P450-isoenzym voor het metabolisme van de teststof).

1.4.1.5. *Teststof/Bereiding*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór de behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. **Testomstandigheden**

1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de cellen en de S9-activiteit. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn. Water kan door toevoeging van een moleculaire zeef worden verwijderd.

1.4.2.2. *Blootstellingsconcentraties*

Bij de bepaling van de hoogste concentratie moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit, de oplosbaarheid in het testsysteem en veranderingen in de pH of de osmolaliteit.

De cytotoxiciteit moet met en zonder metabole activering in het hoofdexperiment worden bepaald aan de hand van adequate indicaties omtrent de integriteit en de groei van de cellen, zoals de mate van confluentie, het aantal levensvatbare cellen of de mitotische index. Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

Er moeten ten minste drie analyseerbare concentraties worden gebruikt. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten deze concentraties een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken; dit betekent meestal dat de concentraties niet meer dan een factor 2 tot $\sqrt{10}$ uit elkaar mogen liggen. Bij het oogsten moet de hoogste concentratie een significante verlaging van de mate van confluentie, het aantal cellen of de mitotische index veroorzaken (voor alle parameters meer dan 50 %). De mitotische index is slechts een indirecte maat voor de cytotoxische/cytostatische effecten en is afhankelijk van het tijdstip na de behandeling. De mitotische index is echter aanvaardbaar voor culturen in suspensie, waarbij andere metingen van de toxiciteit omslachtig en onpraktisch kunnen zijn. Informatie over de kinetiek van de celcyclus, zoals de gemiddelde generatietijd (GGT), kan als aanvulling worden gebruikt. De GGT is echter een algeheel gemiddelde waaruit niet altijd blijkt of er achterblijvende deelpopulaties zijn en zelfs een geringe stijging van de GGT kan samengaan met een zeer aanzienlijke vertraging op het moment waarop de hoeveelheid afwijkingen maximaal is.

Bij stoffen met een betrekkelijk geringe cytotoxiciteit moet de maximale concentratie 5 μ l/ml, 5mg/ml of 0,01 M (de laagste van deze drie) zijn.

Bij betrekkelijk onoplosbare stoffen die bij lagere concentraties dan de oplosbaarheidsgrens niet toxisch zijn, moet de hoogste dosis een concentratie boven de oplosbaarheidsgrens in het uiteindelijke kweekmedium aan het eind van de behandelingsperiode zijn. In sommige gevallen (bv. wanneer de toxiciteit alleen optreedt bij hogere concentraties dan de oplosbaarheidsgrens, is het raadzaam bij meer dan een concentratie met zichtbaar neerslag te testen. Het kan nuttig zijn de oplosbaarheid aan het begin en het eind van de behandeling te bepalen, aangezien de oplosbaarheid tijdens de blootstelling in het testsysteem door de aanwezigheid van bijvoorbeeld cellen, S9 of serum kan veranderen. Onoplosbaarheid kan met het blote oog worden geconstateerd. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

1.4.2.3. Negatieve en positieve controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. Wanneer metabole activering wordt gebruikt, moet de voor de positieve controle gebruikte chemische stof activering vereisen om een mutagene reactie te veroorzaken.

Voor de positieve controles moet een bekend klastogeen worden gebruikt, waarvan op het blootstellingsniveau een reproduceerbare en detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht om de gevoeligheid van het testsysteem aan te tonen.

De concentraties van de positieve controle moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Metabole activering	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Zonder exogene metabole activering	Methylmethaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitrochinoline-N-oxide	56-57-5	200-281-1
Met exogene metabole activering	Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
	Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

Voor elk oogsttijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de culturen met teststof worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.4.3. Uitvoering

1.4.3.1. Behandeling met de teststof

Delende cellen worden zowel met als zonder metabool activeringssysteem met de teststof behandeld. De behandeling van lymfocyten moet ongeveer 48 uur na de mitogene stimulering beginnen.

1.4.3.2. Normaal gesproken moeten voor elke concentratie twee culturen worden gebruikt en voor culturen met negatieve/oplosmiddelcontrole wordt dit sterk aanbevolen.

Wanneer aan de hand van gegevens uit het verleden kan worden aangetoond dat de verschillen tussen duploculturen minimaal zijn (13) (14), kan het gebruik van één cultuur voor elke concentratie aanvaardbaar zijn.

Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (15) (16).

1.4.3.3. Oogsttijdstippen

Bij het eerste experiment moeten de cellen zowel met als zonder metabole activering gedurende drie tot zes uur aan de teststof worden blootgesteld en wordt op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5-maal de normale lengte van een celcyclus na het begin van de behandeling bemonsterd (12). Als op deze wijze zowel met als zonder activering negatieve resultaten worden verkregen, wordt een nieuw experiment zonder activering uitgevoerd, waarbij de behandeling wordt voortgezet totdat op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5-maal de normale lengte van een celcyclus wordt bemonsterd. Voor sommige stoffen gaat de detectie beter bij een behandelings/bemonsteringstijd van meer dan 1,5-maal de lengte van de celcyclus. Negatieve resultaten met metabole activering moeten per geval worden bevestigd. Wanneer bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

1.4.3.4. Chromosoompreparaten

De celculturen worden meestal gedurende één tot drie uur vóór het oogsten behandeld met Colcemid ® of colchicine. Elke celcultuur wordt afzonderlijk geoogst en behandeld voor het maken van chromosoompreparaten.

Dit houdt in dat de cellen een hypotone behandeling krijgen, gevolgd door fixatie en kleuring.

1.4.3.5. Analyse

Alle objectglasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de fixatie vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen voor alle celtypes het modale aantal ±2 centromeren bevatten. Per concentratie en controle moeten minimaal 200 goed gespreide metafasen worden gescoord, indien van toepassing gelijkelijk verdeeld over de duplobepalingen. Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd.

Hoewel de test bedoeld is om structurele chromosoomafwijkingen op te sporen, is het belangrijk dat bij waarneming van polyploidie en endoreduplicatie ook deze verschijnselen worden geregistreerd.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Aangezien de cel bij dit experiment de eenheid is, moet het percentage cellen met één of meer structurele chromosoomafwijkingen worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controleculturen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd, maar worden meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen.

Gelijktijdige metingen van de cytotoxiciteit voor alle behandelde en negatieve controleculturen bij de hoofd-experimenten dienen ook te worden geregistreerd.

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet er een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden samengesteld.

Een duidelijk positieve reactie behoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. De noodzakelijke bevestiging van negatieve resultaten is al onder punt 1.4.3.3. besproken. Bij vervollexperimenten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden.

Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen en de omstandigheden bij metabole activering.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke of een reproduceerbare stijging van het aantal cellen met chromosoomafwijkingen. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (3) (13). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Een stijging van het aantal polyploïde cellen kan erop wijzen dat de teststof in staat is mitotische processen te remmen en numerieke chromosoomafwijkingen te induceren. Een stijging van het aantal cellen met endoreduplicatie van chromosomen kan erop wijzen dat de teststof in staat is de voortgang van de celcyclus te remmen (17) (18).

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof in dit systeem als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vitrotest op chromosoomafwijkingen wijzen erop dat de teststof in gekweekte somatische zoogdiercellen structurele chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in gekweekte somatische zoogdiercellen geen chromosoomafwijkingen induceert.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel / Medium :

- motivering voor de keuze van het medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel / medium, indien bekend.

Cellen :

- aard en herkomst van de cellen;
- kenmerken van het karyotype en bruikbaarheid van het gebruikte celtype;
- afwezigheid van mycoplasma, indien van toepassing;
- informatie over de lengte van de celcyclus;
- geslacht van de bloeddonors, volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten, gebruikt mitogeen;
- aantal overentingen, indien van toepassing;
- methoden om de celcultuur in leven te houden, indien van toepassing;
- modaal aantal chromosomen.

Testomstandigheden :

- naam van de metafase-stopper, gebruikte concentratie en blootstellingsduur;
- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid, indien beschikbaar;
- samenstelling van het medium en CO₂ -concentratie, indien van toepassing;
- concentratie van de teststof;
- toegevoegd volume medium en teststof;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij het enten, indien van toepassing;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- positieve en negatieve controles;
- methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;
- criteria voor het scoren van afwijkingen;
- aantal geanalyseerde metafases;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit, bijvoorbeeld de mate van confluentie, gegevens over de celcyclus, het aantal cellen en de mitotische index;
- neerslagverschijnselen;
- gegevens over de pH en de osmolaliteit van het behandelingsmedium, indien bepaald;
- definitie voor afwijkingen, met inbegrip van hiaten;
- het aantal cellen met chromosoomafwijkingen en de aard van de chromosoomafwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elke behandelde en controlecultuur;
- veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In : Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The in Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In : Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.
- (3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, M.A., Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells : Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
- (6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (8) Natarajan, A.T., Bates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
- (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro. *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
- (10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In : de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
- (13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In : Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (14) Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.
- (15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooley, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay : Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In : Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels of Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
- (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

« B.11. MUTAGENITEIT - IN-VIVOTEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN BEENMERGCELLEN VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 475 van de OESO : Test op chromosoomafwijkingen in beenmergcellen van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vivotest op chromosoomafwijkingen bij zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen bij beenmergcellen van dieren, meestal knaagdieren, veroorzaken (1) (2) (3) (4).

Er zijn twee soorten structurele afwijkingen : het chromosoomtype en het chromatidetype. Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat een chemische stof numerieke afwijkingen kan veroorzaken. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen die veranderingen in oncogenen en tumorsuppressorgenen veroorzaken, betrokken zijn bij de inductie van kanker bij de mens en bij proefdieren.

Voor deze test worden meestal knaagdieren gebruikt. Het doelweefsel is het beenmerg aangezien dit een sterk doorbloed weefsel is en een populatie snel delende cellen bevat die gemakkelijk kunnen worden geïsoleerd en verwerkt. De methode is niet geschikt voor andere diersoorten en doelweefsels.

Deze test op chromosoomafwijkingen is bijzonder geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese, hoewel deze aspecten van soort tot soort en van weefsel tot weefsel kunnen verschillen. Een in-vivotest is ook geschikt om een in vitro gesignaleerd mutageen effect nader te onderzoeken.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metaboliet daarvan niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Endoreduplicatie : een proces waarbij de kern na een S-fase met DNA-replicatie niet tot mitose overgaat, maar opnieuw een S-fase begint. Het resultaat is chromosomen met 4, 8, 16, ... chromatiden.

Hiaat : een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

Numerieke afwijking : een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte cellen.

Polyploidie : het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen (n) dan het diploïde aantal (d.w.z. 3n, 4n, enz.).

Structurele afwijking : een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld en op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood. Voordat de dieren worden gedood, worden ze behandeld met een metafasestopper (bv. colchicine of Colcemid®). Vervolgens worden chromosoompreparaten van de beenmergcellen gemaakt, die worden gekleurd; de cellen in de metafase worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Meestal worden ratten, muizen of Chinese hamsters gebruikt, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal ±20 % van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren.

1.4.1.4. Bereiding van de doseringen

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. Controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles voor elk geslacht worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo structurele afwijkingen veroorzaakt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Waar mogelijk kan het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met chromosoomafwijkingen. Als voor de negatieve controles één bemonsteringstijdstip wordt gebruikt, kan hiervoor het beste het eerste bemonsteringstijdstip worden gekozen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.5. UITVOERING

1.5.1. Aantal en geslacht van de dieren

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare dieren per geslacht bevatten. Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt bij voorkeur in één dosis toegediend. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. Voor een ander doseringsschema moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

De monsters worden op twee aparte tijdstippen na de behandeling op één dag genomen. Voor knaagdieren ligt het eerste bemonsteringstijdstip op 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus (deze cyclus duurt meestal 12 tot 18 uur) na de behandeling. Aangezien de voor de opname en het metabolisme van de teststof vereiste tijd en de effecten op de kinetiek van de celcyclus gevolgen kunnen hebben voor het optimale tijdstip om chromosoomafwijkingen te detecteren, verdient het aanbeveling 24 uur na het eerste bemonsteringstijdstip opnieuw te bemonsteren. Indien het doseringsschema meer dan één dag beslaat, moet één bemonsteringstijdstip op 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus na de laatste toediening worden gebruikt.

Voordat de dieren worden gedood, worden ze intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafasestopper (bv. Colcemid® of colchicine). De dieren worden na een adequate pauze bemonsterd. Voor muizen moet er ongeveer drie tot vijf uur worden gewacht en voor Chinese hamsters ongeveer vier tot vijf uur. De cellen worden uit het beenmerg gehaald en op chromosoomafwijkingen geanalyseerd.

1.5.3. Dosisniveaus

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek (5). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor het beenmerg oplevert (bv. een daling van de mitotische index met meer dan 50 %).

1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis van minimaal 2000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Voor studies met een langere duur is de limietdosis 2000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende maximaal 14 dagen en 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende meer dan 14 dagen. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven.

Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal hevigere effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. Chromosoompreparaten

Onmiddellijk nadat het dier is gedood wordt beenmerg verwijderd, in een hypotone oplossing gebracht en gefixeerd. De cellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd.

1.5.7. Analyse

Als maat voor de cytotoxiciteit wordt in ten minste 1000 cellen per dier voor alle behandelde dieren (ook de positieve controles) en onbehandelde dieren voor de negatieve controle de mitotische index bepaald.

Voor elk dier worden minimaal 100 cellen geanalyseerd. Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd. Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de bereiding van de objectglaasjes vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen $2n \pm 2$ centromeren bevatten.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk dier apart in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier. Voor elk dier moet het aantal gescoorde cellen, het aantal afwijkingen per cel en het percentage cellen met een of meer structurele chromosoomafwijkingen worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd maar meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen. Als er geen aanwijzingen zijn voor verschillen in reactie tussen de geslachten, kunnen de gegevens van beide geslachten voor de statistische analyse worden gecombineerd.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het relatieve aantal cellen met chromosoomafwijkingen of een duidelijke stijging van het aantal cellen met afwijkingen in één dosisgroep bij één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (6). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat de teststof in staat is numerieke chromosoomafwijkingen te induceren. Een toename van endoreduplicatie kan erop wijzen dat de teststof in staat is de voortgang van de celcyclus te remmen (7) (8).

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt uitgevoerd, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vivotest op chromosoomafwijkingen wijzen erop dat een stof in het beenmerg van de geteste soort chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in het beenmerg van de geteste soort geen chromosoomafwijkingen induceert.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metabolieten daarvan in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomen (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- motivering voor de keuze van het medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren :

- gebruikte soort/stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, huisvesting, voeding, enz.;
- het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden :

- positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;
- gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd;
- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- gegevens over de bereiding van de teststof;
- gegevens over de toediening van de teststof;
- achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;
- methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;
- een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- naam van de metafasestopper, gebruikte concentratie en blootstellingsduur;
- methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;
- criteria voor het scoren van afwijkingen;
- aantal geanalyseerde cellen per dier;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit;
- mitotische index;
- aard en aantal van de afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elk dier;
- totaal aantal afwijkingen per groep, met vermelding van het gemiddelde en de standaardafwijking;
- aantal cellen met afwijkingen per groep, met vermelding van het gemiddelde en de standaardafwijking;
- veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In : Mutagenicity Testing : a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
- (2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays : Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, pp. 157-165.
- (3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Simada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the in Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, pp. 305-312.
- (5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society / UK Environmental Mutagen Society Working Group : Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, pp. 313-319.
- (6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In : UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part. III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.
- (7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res. 119, pp. 403-413.
- (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, pp. 1362-1364 »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

« **B.12. MUTAGENITEIT - IN-VIVOMICRONUCLEUSTEST BIJ ERYTHROCYTEN VAN ZOOGDIEREN****1. METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 474 van de OESO : Micronucleustest bij erythrocyten van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vivomicronucleustest bij zoogdieren wordt gebruikt om na te gaan of de teststof schade toebrengt aan de chromosomen of het mitotisch apparaat van erythroblasten door de analyse van erythrocyten die worden verkregen uit het beenmerg en/of de perifere bloedcellen van dieren, meestal knaagdieren.

De micronucleustest is bedoeld om stoffen te signaleren die cytogenetische schade veroorzaken waarbij micronuclei ontstaan met achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Wanneer een erythroblast uit het beenmerg zich ontwikkelt tot een polychromatische erythrocyt, wordt de hoofdkern uitgestoten; wanneer een micronucleus is ontstaan, kan deze in het overigens kernloze cytoplasma achterblijven. Omdat deze cellen geen hoofdkern bevatten, zijn de micronuclei gemakkelijker zichtbaar te maken. Een stijging van de frequentie waarmee bij behandelde dieren polychromatische erythrocyten met micronuclei worden aangetroffen, wijst op chromosoombeschadiging.

Voor deze test wordt meestal het beenmerg van knaagdieren gebruikt, aangezien in dit weefsel polychromatische erythrocyten worden gevormd. Het is ook aanvaardbaar het aantal onrijpe (polychromatische) erythrocyten met micronuclei in perifere bloed te bepalen bij soorten waarvan is aangetoond dat de milt niet in staat is erythrocyten met micronuclei op te ruimen of dat de gevoeligheid om stoffen die structurele of numerieke chromosoomafwijkingen veroorzaken te detecteren afdoende is. Micronuclei kunnen aan de hand van een aantal criteria worden onderscheiden, bijvoorbeeld op grond van de aan- of afwezigheid van een kinetochoor- of centromeer-DNA in de micronuclei. Het belangrijkste eindpunt is de frequentie van onrijpe (polychromatische) erythrocyten met micronuclei. Het aantal rijpe (normochromatische) erythrocyten in het perifere bloed met micronuclei, bepaald bij een bekend aantal rijpe erythrocyten, kan ook als eindpunt van de bepaling worden gebruikt wanneer de dieren gedurende ten minste vier weken ononderbroken worden behandeld.

Deze in-vivomicronucleustest bij zoogdieren is bijzonder geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese, hoewel deze aspecten van soort tot soort, van weefsel tot weefsel en voor de verschillende genetische eindpunten kunnen verschillen. Een in-vivobepaling is ook geschikt om een in vitro gesignaleerd mutageen effect nader te onderzoeken.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metaboliet daarvan niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Centromeer (kinetochoor) : het deel of de delen van een chromosoom waar tijdens de celdeling de spoelraden aan vastzitten, zodat de verplaatsing van de dochterchromosomen naar de polen van de dochtercellen regelmatig kan verlopen.

Micronucleus : een kleine kern die buiten en naast de hoofdkern van cellen tijdens de telofase van de mitose (meiose) ontstaat door achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Normochromatische erythrocyt : een rijpe erythrocyt zonder ribosomen die van onrijpe polychromatische erythrocyten kan worden onderscheiden door de selectieve kleuring van ribosomen.

Polychromatische erythrocyt : een onrijpe erythrocyt in een tussentijdse ontwikkelingsfase die nog ribosomen bevat en derhalve van rijpe normochromatische erythrocyten kan worden onderscheiden door de selectieve kleuring van ribosomen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld. Als beenmerg wordt gebruikt, worden de dieren op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood, wordt het beenmerg verwijderd en worden er preparaten gemaakt die worden gekleurd (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Wanneer perifere bloed wordt gebruikt, wordt op geschikte tijdstippen na de behandeling bloed afgenomen en worden er uitstrijkpreparaten gemaakt die worden gekleurd (4) (8) (9) (10). Bij studies met perifere bloed moet er zo weinig mogelijk tijd verstrijken tussen de laatste blootstelling en het oogsten van de cellen. De preparaten worden onderzocht op de aanwezigheid van micronuclei.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.4.1. Voorbereiding****1.4.1.1. Keuze van de diersoort**

Als beenmerg wordt gebruikt, worden muizen of ratten aanbevolen, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Wanneer perifere bloed wordt gebruikt, worden muizen aanbevolen. In principe komt elke geschikte zoogdiersoort echter in aanmerking, mits het een soort is waarvan de milt niet in staat is erythrocyten met micronuclei op te ruimen of een soort waarvan is aangetoond dat de gevoeligheid om stoffen die structurele of numerieke chromosoomafwijkingen veroorzaken te detecteren afdoende is. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal $\pm 20\%$ van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt.

1.4.1.4. *Bereiding van de doseringen*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. **Testomstandigheden**

1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten referentiegegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. *Controles*

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles voor elk geslacht worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo micronuclei veroorzaakt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Waar mogelijk kan bovendien het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
N-Ethyl-N-nitrosourem	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met micronuclei. Als voor de negatieve controles één bemonsteringstijdstip wordt gebruikt, kan hiervoor het beste het eerste bemonsteringstijdstip worden gekozen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

Als perifeer bloed wordt gebruikt, kan een monster dat vóór de behandeling wordt genomen ook aanvaardbaar zijn als gelijktijdige negatieve controle, maar alleen wanneer het gaat om een korte studie met perifeer bloed (bv. één tot drie behandelingen) en het resultaat binnen het verwachte interval door de in het verleden uitgevoerde controle ligt.

1.5. **UITVOERING**

1.5.1. **Aantal en geslacht van de dieren**

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare dieren per geslacht bevatten (11). Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

1.5.2. **Behandelingsschema**

Er kan geen standaardbehandelingsschema (d.w.z. één, twee of meer behandelingen met een interval van 24 uur) worden aanbevolen. De monsters van verlengde doseringsschema's zijn aanvaardbaar, mits een positief effect voor deze studie is aangetoond of, voor een negatieve studie, mits toxiciteit is aangetoond of de limietdosis is gebruikt, en de toediening tot het bemonsteringstijdstip is voortgezet. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken.

De test kan op twee manieren worden uitgevoerd :

a) De dieren worden eenmaal met de teststof behandeld. Beenmergmonsters worden ten minste tweemaal genomen, de eerste keer niet eerder dan 24 uur na de behandeling en de laatste keer uiterlijk 48 uur na de behandeling, met een afdoende interval tussen de monsters. Voor het gebruik van een bemonsteringstijdstip binnen 24 uur na de behandeling moet een motivering worden gegeven. Monsters van perifeer bloed worden ten minste tweemaal genomen, de eerste keer niet eerder dan 36 uur na de behandeling, met een afdoende interval na het eerste monster, en de laatste keer uiterlijk 72 uur na de behandeling.

Wanneer op één bemonsteringstijdstip een positieve reactie wordt gesignaleerd, behoeven er geen verdere monsters meer te worden genomen.

b) Als twee of meer dagelijkse behandelingen worden gebruikt (bv. twee of meer behandelingen met een interval van 24 uur), moet de bemonstering voor het beenmerg eenmaal gebeuren tussen 18 en 24 uur na de laatste behandeling en voor het perifere bloed eenmaal tussen 36 en 48 uur na de laatste behandeling (12).

Indien dit nuttig is, kunnen daarnaast ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt.

1.5.3. Dosisniveaus

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingschema als bij het hoofdonderzoek (13). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor het beenmerg oplevert (bv. een daling van de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten in het beenmerg of het perifere bloed).

1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis van minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Voor studies met een langere duur is de limietdosis 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende maximaal 14 dagen en 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende meer dan 14 dagen. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven.

Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. Beenmerg/bloedpreparaten

De beenmergcellen worden meestal volgens gangbare methoden uit het dijbeen of scheenbeen van pas gedode dieren verwijderd, geprepareerd en gekleurd. Perifeer bloed wordt uit de staartader of een ander geschikt bloedvat afgenomen. De bloedcellen worden onmiddellijk supravitaal gekleurd (8) (9) (10) of er wordt een uitstrijkpreparaat gemaakt dat vervolgens wordt gekleurd. Door het gebruik van een DNA-specifieke kleurstof (bv. acridine oranje (14) of Hoechst 33258 plus pyronine-Y (15)) kunnen sommige artefacten die zich bij het gebruik van niet voor DNA specifieke kleurstoffen kunnen voordoen, worden voorkomen. Dit neemt niet weg dat ook klassieke kleurstoffen (zoals Giemsa) kunnen worden gebruikt. Ook andere systemen (zoals cellulosekolommen om cellen die een kern bevatten te verwijderen (16)) kunnen worden gebruikt, mits is aangetoond dat deze methoden geschikt zijn voor micronucleuspreparaten in het laboratorium.

1.5.7. Analyse

Voor elk dier wordt de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal (onrijpe + rijpe) erythrocyten bepaald door in totaal voor het beenmerg ten minste 200 erythrocyten en voor het perifere bloed ten minste 1 000 erythrocyten te tellen (17). Alle objectglaasjes, ook die van de negatieve en positieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Voor de bepaling van de frequentie waarmee onrijpe erythrocyten met micronuclei voorkomen, worden ten minste 2 000 onrijpe erythrocyten per dier gescoord. Aanvullende informatie kan worden verkregen door rijpe erythrocyten op micronuclei te scoren.

Bij de analyse van de objectglaasjes mag de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten niet lager dan 20 % van de controlewaarde zijn. Wanneer de dieren onafgebroken gedurende ten minste vier weken zijn behandeld, kunnen ook ten minste 2 000 rijpe erythrocyten per dier op het voorkomen van micronuclei worden gescoord. Geautomatiseerde analysesystemen (beeldanalyse en celsuspensie-doorstroomcytometrie) zijn aanvaardbaar als alternatief voor handmatige beoordeling, indien ze afdoende zijn gemotiveerd en gevalideerd.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elke dier apart in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier. Voor elk onderzocht dier worden het aantal gescoorde onrijpe erythrocyten, het aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei en het aantal onrijpe erythrocyten op het totale aantal apart vermeld. Wanneer de dieren onafgebroken gedurende ten minste vier weken zijn behandeld, moeten de gegevens over rijpe erythrocyten ook worden vermeld als deze zijn verzameld. Voor elk dier worden de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten en, indien dit zinnig wordt geacht, het percentage van de erythrocyten met micronuclei vermeld. Als er geen aanwijzingen zijn voor verschillen in reactie tussen de geslachten, kunnen de gegevens van beide geslachten voor de statistische analyse worden gecombineerd.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het aantal cellen met micronuclei of een duidelijke stijging van het aantal cellen met micronuclei in één dosisgroep bij één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (18) (19). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de micronucleustest wijzen erop dat de stof micronuclei induceert die ontstaan door chromosoombeschadigingen of beschadiging van het mitotisch apparaat in de erythroblasten van de geteste soort. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden geen micronuclei in de onrijpe erythrocyten van de geteste soort veroorzaakt.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metabolieten daarvan in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomen (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- motivering voor de keuze van het medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren :

- gebruikte soort/stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, huisvesting, voeding enz.;
- het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden :

- gegevens over positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;
- gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd;
- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- gegevens over de bereiding van de teststof;
- gegevens over de toediening van de teststof;
- achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;
- methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;
- een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de bereiding van de objectglasjes;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- criteria voor het scoren van onrijpe erythrocyten met micronuclei;
- aantal geanalyseerde cellen per dier;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit;
- verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten;
- aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei, afzonderlijk vermeld voor elk dier;
- gemiddelde $\pm$ standaardafwijking van het aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei per groep;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- statistische analyses en gevolgde methodes;
- gegevens over tegelijkertijd en in het verleden uitgevoerde negatieve controles;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
- (3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
- (4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.
- (5) MacGregor, J.T., Schlegel, R., Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes : A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. In : « Developments in Science and Practice of Toxicology », Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.
- (6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. *Mutation Res.* 189, pp. 103-122.
- (7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test : Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coates Slides. *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining : The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS : The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society / UK Environmental Mutagen Society Working Group : Dose Setting in In vivo Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y., *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetics Assay. In : D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

« **B.13/14. MUTAGENITEIT - TERUGMUTATIETEST MET BACTERIËN****1. METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 471 van de OESO : Terugmutatietest met bacteriën (1997).

1.1. INLEIDING

Bij de terugmutatietest met bacteriën worden aminozuurafhankelijke stammen van *Salmonella typhimurium* en *Escherichia coli* gebruikt voor de detectie van puntmutaties, waarbij vervanging, toevoeging of deletie van een of enkele DNA-basenparen optreedt (1) (2) (3). Deze terugmutatietest met bacteriën is gebaseerd op het beginsel dat mutaties worden gedetecteerd die ertoe leiden dat in de teststammen aanwezige mutaties en daarmee de functionele capaciteit van de bacteriën om een essentieel aminozuur te synthetiseren worden hersteld.

Deze teruggemuteerde bacteriën worden zichtbaar doordat ze kunnen groeien zonder het aminozuur dat de ouderstam nodig heeft.

Puntmutaties veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat puntmutaties in oncogenen en tumorsuppressorgenen van somatische cellen betrokken zijn bij het ontstaan van tumoren bij de mens en bij proefdieren. De terugmutatietest met bacteriën is snel, goedkoop en betrekkelijk gemakkelijk uit te voeren. Veel van de teststammen hebben verschillende kenmerken waardoor ze gevoeliger zijn voor de detectie van mutaties, zoals reactieve DNA-sequenties op de terugmutatieplaatsen, een verhoogde permeabiliteit van de cel voor grote moleculen en de afwezigheid van DNA-herstelsystemen of de stimulering van foutgevoelige DNA-herstelprocessen. De specificiteit van de teststammen kan enige nuttige informatie opleveren over de aard van de mutaties die door genotoxische stoffen worden geïnduceerd. Er zijn zeer veel gegevens beschikbaar over de resultaten van de terugmutatietest met bacteriën voor een grote verscheidenheid van structuren en er zijn betrouwbare methodologieën ontwikkeld voor het testen van chemische stoffen met uiteenlopende fysisch-chemische eigenschappen, waaronder ook vluchtige stoffen.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Terugmutatietest bij *Salmonella typhimurium* of *Escherichia coli* : een test voor de detectie van mutaties in een aminozuurafhankelijke stam (respectievelijk histidine of tryptofaan), waarbij een stam ontstaat die onafhankelijk is van een externe aminozuurbron.

Mutageen met basenpaarvervangning : een stof die een wijziging van een base in het DNA veroorzaakt. Bij een terugmutatietest kan dit op de plaats van de oorspronkelijke mutatie of op een andere plaats in het bacteriële genoom gebeuren.

Mutageen met leesraamverschuiving : een stof die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA veroorzaakt, waardoor het leesraam in het RNA wijzigt.

1.3. TOELICHTING

Voor de terugmutatietest met bacteriën worden prokaryote cellen gebruikt, die in bijvoorbeeld opname, metabolisme, chromosoomstructuur en DNA-herstelprocessen van zoogdiercellen verschillen. Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. De test levert dan ook geen directe informatie op over de potentiële mutagene en carcinogene werking van een stof bij zoogdieren.

De terugmutatietest met bacteriën wordt meestal gebruikt als een eerste screening voor een genotoxische werking en met name de inductie van puntmutaties. Op basis van een groot aantal gegevens is gebleken dat veel stoffen die bij deze test positief reageren, ook bij andere tests een mutagene werking vertonen. Er zijn voorbeelden van mutagene stoffen die met deze test niet worden gesignaleerd; dit kan wellicht worden toegeschreven aan de specifieke aard van het gedetecteerde eindpunt, verschillen in metabole activering of verschillen in biologische beschikbaarheid. Anderzijds kunnen factoren die de gevoeligheid van de terugmutatietest met bacteriën bevorderen, leiden tot een te hoge inschatting van de mutagene werking.

De terugmutatietest met bacteriën zal wellicht niet geschikt zijn voor de beoordeling van bepaalde klassen chemische stoffen zoals sterk bactericide verbindingen (bv. bepaalde antibiotica) en stoffen waarvan vermoed wordt (of bekend is) dat ze specifiek het replicatiesysteem van zoogdiercellen storen (bv. bepaalde topoisomeraseremmers en bepaalde nucleosideanalogen). In deze gevallen zullen mutatietests met zoogdiercellen wellicht geschikter zijn.

Hoewel veel stoffen die positief op deze test reageren, ook carcinogeen voor zoogdieren zijn, is de correlatie niet absoluut. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en er zijn carcinogenen die niet met deze test worden gesignaleerd omdat ze via andere niet-genotoxische mechanismen werken of via mechanismen die in bacteriecellen ontbreken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Suspensies van bacteriecellen worden zowel met als zonder een exogeen metabool activeringssysteem aan de teststof blootgesteld. Bij de methode met geïntegreerde voedingsbodem worden deze suspensies met een topagar vermengd en direct op minimaal medium uitgeplaat. Bij de preincubatiemethode wordt het behandelde mengsel geïncubeerd en vervolgens met een topagar vermengd voordat het op minimaal medium wordt uitgeplaat. Bij beide technieken worden na twee of drie dagen incuberen de terugmutantkolonies geteld en wordt dit aantal vergeleken met het aantal spontane terugmutantkolonies op controleplaten met oplosmiddel.

Er zijn verschillende procedures voor de uitvoering van de terugmutatietest met bacteriën beschreven. Het meest gebruikt worden de methode met geïntegreerde voedingsbodem (1) (2) (3) (4), de preincubatiemethode (2) (3) (5) (6) (7) (8), de fluctuatiemethode (9) (10) en de suspensiemethode (11). Ook wijzigingen voor het testen van gassen of dampen zijn beschreven (12).

De hier beschreven procedures gelden vooral voor de methode met geïntegreerde voedingsbodem en de preïncubatiemethode. Beide zijn aanvaardbaar voor de uitvoering van experimenten zowel met als zonder metabole activering. Bij sommige stoffen verloopt de detectie efficiënter met de preïncubatiemethode. Deze stoffen behoren tot chemische klassen als alifatische nitrosamines met een korte keten, divalente metalen, aldehyden, azokleurstoffen en diazoverbindingen, pyrolyzidine-alkaloiden, allylverbindingen en nitroverbindingen (3).

Tevens is het bekend dat bepaalde klassen mutagene verbindingen niet altijd met standaardprocedures als de methode met geïntegreerde voedingsbodem of de preïncubatiemethode worden gesignaleerd. Deze moeten als « speciale gevallen » worden beschouwd en voor de signalering daarvan wordt sterk aangeraden andere procedures te gebruiken. De volgende « speciale gevallen », kunnen worden genoemd (met voorbeelden van procedures die voor deze stoffen kunnen worden gebruikt) : azokleurstoffen en diazoverbindingen (3) (5) (6) (13), gassen en vluchtige stoffen (12) (14) (15) (16) en glycosiden (17) (18). Voor een afwijking van de standaardprocedure moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. Voorbereiding

1.5.1.1. Bacteriën

Verse bacterieculturen worden gekweekt tot het laat-exponentiële of vroeg-stationaire groeistadium (ongeveer 10^9 cellen per ml). Culturen in de laat-stationaire fase mogen niet worden gebruikt. Het is van essentieel belang dat de bij het experiment gebruikte culturen een hoog gehalte aan levensvatbare bacteriën bevatten.

De titer kan aan de hand van gegevens over groeicurves uit in het verleden uitgevoerde controles worden bepaald of door met behulp van een uitplaatexperiment het aantal levensvatbare cellen te bepalen.

De aanbevolen incubatietemperatuur is 37°C.

Er moeten ten minste vijf bacteriestammen worden gebruikt. Daarbij moeten vier stammen van *S. typhimurium* zijn (TA 1535; TA 1537, TA 97a of TA 97; TA 98; en TA 100) waarvan is aangetoond dat de resultaten betrouwbaar en in verschillende laboratoria reproduceerbaar zijn. Deze vier stammen van *S. typhimurium* hebben GC-basenparen op de primaire terugmutatieplaats en het is bekend dat bepaalde oxiderende mutagenen, cross-linkende stoffen en hydrazines daarmee niet altijd worden gesignaleerd. Voor deze stoffen kunnen de stammen WP2 van *E. coli* of TA 102 van *S. typhimurium* worden gebruikt (19), die een AT-basenpaar op de primaire terugmutatieplaats hebben. Als combinatie van stammen wordt derhalve aanbevolen :

- TA 1535 van *S. typhimurium* en
- TA 1537 of TA 97 of TA 97a van *S. typhimurium* en
- TA 98 van *S. typhimurium* en
- TA 100 van *S. typhimurium* en
- WP2 uvrA van *E. coli* of WP2 uvrA (pKM101) van *E. coli* of TA 102 van *S. typhimurium*.

Om cross-linkende mutagenen te signaleren kan het de voorkeur verdienen TA 102 of een stam van *E. coli* die bedreven is in DNA-herstel (bv. WP2 (pKM101) van *E. coli*) te gebruiken.

Er moeten erkende procedures voor de bereiding van voorraadculturen, markercontrole en opslag worden gebruikt. Voor elk preparaat van de ingevroren voorraadcultuur moet de aminozuurafhankelijkheid voor de groei worden aangetoond (histidine voor stammen van *S. typhimurium* en tryptofaan voor stammen van *E. coli*). Ook ander fenotypekenmerken moeten worden gecontroleerd, namelijk : de aan- of afwezigheid van plasmiden met de R-factor, indien van toepassing (bv. resistentie tegen ampicilline bij de stammen TA 98, TA 100 en TA 97a of TA 97, WP2 uvrA en WP2 uvrA (pKM101) en resistentie tegen ampicilline en tetracycline bij stam TA 102); de aanwezigheid van karakteristieke mutaties (bv. de rfa-mutatie bij *S. typhimurium* door de gevoeligheid voor kristalviolet en de uvrA-mutatie bij *E. coli* of de uvrB-mutatie bij *S. typhimurium* door de gevoeligheid voor ultraviolet licht) (2) (3). Bij de stammen moeten ook spontane terugmutantkolonies voorkomen met een frequentie die ligt binnen het interval dat op grond van controlegegevens van het laboratorium uit het verleden kan worden verwacht en bij voorkeur binnen het interval dat in de literatuur wordt opgegeven.

1.5.1.2. Medium

Er wordt gebruikgemaakt van een geschikte minimale agar (bv. met minimaal medium E van Vogel-Bonner en glucose) en een topagar met histidine en biotine of tryptofaan om een aantal celdelingen mogelijk te maken (1) (2) (9).

1.5.1.3. Metabole activering

De bacteriën dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (1) (2) of een combinatie van fenobarbiton en β -naftoflavon (18) (20) (21). De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 5 tot 30 % (v/v) in het S9-mengsel. De keuze en de omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen kan het nuttig zijn meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie te gebruiken. Voor azokleurstoffen en diazoverbindingen kan wellicht beter een reductief metabool activeringssysteem worden gebruikt (6) (13).

1.5.1.4. Teststof/Bereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de bacteriën worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen worden gebruikt. Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de bacteriën en de S9-activiteit (22). Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn.

1.5.2. Testomstandigheden

1.5.2.1. Teststammen (zie punt 1.5.1.1)

1.5.2.2. Blootstellingsconcentraties

Bij de bepaling van de grootste te gebruiken hoeveelheid teststof moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid in het uiteindelijke behandelingsmengsel.

Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de toxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

De cytotoxiciteit kan worden bepaald aan de hand van een daling in het aantal terugmutantkolonies, een opheldering of afname van de achtergrond of de mate waarin de behandelde culturen overleven. De cytotoxiciteit van een stof kan in aanwezigheid van een metabool activeringssysteem veranderen. De oplosbaarheid moet worden beoordeeld aan de hand van het met het blote oog zichtbare neerslaggedrag in het uiteindelijke mengsel onder de feitelijke testomstandigheden.

De aanbevolen maximale concentratie voor oplosbare niet-cytotoxische stoffen is 5 mg/plaat of 5 µl/plaat.

Voor niet-cytotoxische stoffen die bij 5 mg/plaat of 5 µl/plaat niet oplosbaar zijn, moet een of meer van de geteste concentraties in het uiteindelijke behandelingsmengsel onoplosbaar zijn. Teststoffen die al bij lagere concentraties dan 5 mg/plaat of 5 µl/plaat cytotoxisch zijn, moeten tot een cytotoxische concentratie worden getest. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

Er moeten ten minste vijf analyseerbare concentraties van de teststof worden gebruikt met ongeveer een half log-interval (d.w.z. een factor √10) tussen de concentraties voor een eerste experiment. Kleinere intervallen kunnen nuttig zijn wanneer het verband tussen concentratie en respons wordt onderzocht. Hogere concentraties dan 5 mg/plaat of 5 µl/plaat kunnen worden overwogen bij de beoordeling van stoffen die significante hoeveelheden potentieel mutagene verontreinigingen bevatten.

1.5.2.3. Negatieve en positieve controles

Bij elke bepaling moeten tegelijkertijd stam-specifieke positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. De concentraties van de positieve controle moeten zodanig worden gekozen dat voor elke bepaling wordt aangetoond dat deze correcte resultaten oplevert.

Voor bepalingen waarbij een metabool activeringssysteem wordt gebruikt, moet(en) de voor de positieve controle gebruikte referentiestof(fen) op basis van de aard van de gebruikte bacteriestam worden gekozen.

Voor bepalingen met metabole activering kunnen als positieve controle bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	Cas-nr.	Einecs-nr.
9,10-dimethylantraceen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenz[a]anthraceen	57-97-6	200-359-5
Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraceen	613-13-8	210-330-9
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Voor de methode met reductieve metabole activering kan als positieve controle worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Kongo rood	573-58-0	209-358-4

2-aminoantraceen mag niet als enige indicator voor de werkzaamheid van het S9-mengsel worden gebruikt.

Als 2-aminoantraceen wordt gebruikt, moet elke charge S9 ook worden gekarakteriseerd met een mutageen waarvoor metabole activering met microsomale enzymen nodig is, zoals benzo[a]pyreen of dimethylbenzantraceen.

Voor bepalingen zonder exogeen metabool activeringssysteem kunnen als stam-specifieke positieve controle bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.	Stam
Natriumazide	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 en TA 100
2-nitrofluoreen	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridine	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 en TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 en TA 97a
Cumeenhydroperoxide	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA en TA 102
N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA en WP2 uvrA(pKM101)
4-nitroquinoline-1-oxide	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA en WP2 uvrA(pKM101)
Furylfuramide (AF2)	3688-53-7		Stammen die plasmiden bevatten



Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

In het experiment dienen negatieve controles te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium zonder teststof wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.5.3. Uitvoering

Voor de methode met geïntegreerde voedingsbodem (1) (2) (3) (4) zonder metabole activering wordt meestal 0,05 ml of 0,1 ml testoplossing, 0,1 ml verse bacteriecultuur (met ongeveer 10^8 levensvatbare cellen) en 0,5 ml steriele buffer gemengd met 2,0 ml topagar. Voor de bepaling met metabole activering wordt meestal 0,5 ml van het metabool activeringsmengsel met een afdoende hoeveelheid post-mitochondriale fractie (tussen 5 en 30 % (v/v) in het metabool activeringsmengsel) gemengd met de topagar (2,0 ml), de bacteriën en de test stof/testoplossing. De inhoud van elke buis wordt gemengd en uitgedoten over het oppervlak van een minimale agarplaat. De topagar krijgt voor de incubatie de gelegenheid te stollen.

Voor de preïncubatiemethode (2) (3) (5) (6) wordt de teststof/testoplossing gepreïncubeerd met de teststam (met ongeveer 10^8 levensvatbare cellen) en steriele buffer of het metabole activeringssysteem (0,5 ml), meestal gedurende minimaal 20 minuten bij 30-37°C, en vervolgens gemengd met de topagar en uitgedoten over het oppervlak van een minimale agarplaat. Meestal wordt 0,05 ml of 0,1 ml teststof/testoplossing, 0,1 ml bacteriën en 0,5 ml S9-mengsel of steriele buffer gemengd met 2,0 ml topagar. De buizen dienen gedurende de preïncubatie met behulp van een schudmachine te worden belucht.

Om een adequate raming van de spreiding te kunnen maken moeten voor elk dosisniveau drie platen worden gebruikt. Het gebruik van twee platen is aanvaardbaar wanneer daarvoor een wetenschappelijke motivering wordt gegeven. Wanneer nu en dan een plaat verloren gaat, maakt dit de bepaling niet noodzakelijkerwijs onbruikbaar.

Bij het testen van gasen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Incubatie

Alle platen voor een bepaling worden gedurende 48-72 uur bij 37°C geïncubeerd. Na de incubatieperiode wordt het aantal terugmutantkolonies per plaat geteld.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens worden vermeld als het aantal terugmutantkolonies per plaat. Daarnaast moet ook het aantal terugmutantkolonies op de platen voor zowel negatieve (oplosmiddel en zonder behandeling, indien gebruikt) als positieve controle worden vermeld. Voor zowel de teststof als de positieve en negatieve (zonder behandeling en/of oplosmiddel) controle moeten de tellingen per plaat, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat en de standaardafwijking worden vermeld.

Een duidelijk positieve reactie behoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. Negatieve resultaten moeten per geval worden bevestigd. Wanneer een bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Bij vervollexperimenten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen, de wijze van behandeling (geïntegreerde voedingsbodem of preïncubatie in vloeistof) en de omstandigheden bij metabole activering.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke stijging op het geteste interval en/of een reproduceerbare stijging bij een of meer concentraties van het aantal terugmutantkolonies per plaat bij ten minste één stam met of zonder metabool activeringssysteem (23). In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (24). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de terugmutatietest met bacteriën wijzen erop dat de teststof puntmutaties door basenpaarvervanging of leesraamverschuiving in het genoom van *Salmonella typhimurium* en/of *Escherichia coli* induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden bij de geteste soort niet mutageen is.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Stammen :

- gebruikte stammen;
- aantal cellen per cultuur;
- kenmerken van de stam.

Testomstandigheden :

- hoeveelheid teststof per plaat (in mg/plaat of μ l/plaat) met vermelding van de achtergrond voor de keuze van de dosis en het aantal platen per concentratie;
- gebruikte media;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- procedures voor de behandeling.

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit;
- neerslagverschijnselen;
- tellingen per plaat;
- gemiddeld aantal terugmutantkolonies per plaat met de standaardafwijking;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The Salmonella typhimurium / Mammalian Microsomal Assay : A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In : Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In : Basic Mutagenicity Tests : UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.
- (9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, pp. 33-42.
- (10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and Bridges, J.W. (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In : Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
- (11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium. *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
- (13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughan, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
- (14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salmonella typhimurium. *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase : A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains. *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In : « In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing » Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
- (23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. *Mutation Res.* 189, pp. 83-91.
- (24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In : UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

« **B.17. MUTAGENITEIT - IN-VITROGENMUTATIE TEST MET ZOOGDIERCELLEN****1. METHODE**

Deze methode is overgenomen van TG 476 van de OESO : In-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen kan worden gebruikt voor de detectie van genmutaties die door chemische stoffen zijn geïnduceerd. Geschikte cellijnen zijn bijvoorbeeld de L5178Y-muizenlymfoomcellen, de cellijnen CHO, CHO-AS52 en V79 van Chinese hamsters en de humane TK6-lymfoblastoidcellen (1). Bij deze cellijnen zijn de meest gangbare genetische eindpunten : een mutatie bij thymidinekinase (TK), hypoxanthine-guanine-fosforibosyltransferase (HPRT) en transgeen xanthine-guanine-fosforibosyltransferase (XPRT). Bij de mutatietests met TK, HPRT en XPRT worden verschillende spectra van genetische gebeurtenissen gedetecteerd. Door de ligging van TK en XPRT op autosomen kunnen genetische gebeurtenissen worden gedetecteerd (bv. grote deleties) die niet op de HPRT-locus op X-chromosomen worden gesignaleerd (2) (3) (4) (5) (6). Bij de in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen kunnen culturen van permanente cellijnen of celstammen worden gebruikt. De gebruikte cellen worden geselecteerd op basis van het groeivermogen in een cultuur en de stabiliteit van de spontane mutatiefrequentie.

Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringstelsel kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit, worden vermeden. Positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit, kunnen ontstaan door veranderingen in de pH of de osmolaliteit of een sterke cytotoxiciteit (7).

Deze test wordt gebruikt voor de screening op mogelijke mutagenen en carcinogenen voor zoogdieren. Veel stoffen die positief op deze test reageren, zijn carcinogeen voor zoogdieren, maar er is geen absolute correlatie tussen deze test en carcinogeniteit. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en het lijkt er steeds meer op dat er carcinogenen zijn die niet met deze test worden gesignaleerd omdat ze blijkbaar via andere niet-genotoxische of in bacteriecellen afwezige mechanismen werken (6).

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Voorwaartse mutatie : een genmutatie van het oudertype naar de mutantvorm die leidt tot wijziging of verlies van de enzymactiviteit of de functie van het gecodeerde eiwit.

Mutageen met basenpaarvervangings : een stof die vervanging van een of meer basenparen in het DNA veroorzaakt.

Mutageen met leesraamverschuiving : een stof die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA-molecuul veroorzaakt.

Fenotypische expressietijd : de periode gedurende welke ongewijzigde genproducten uit pas gemuteerde cellen verdwijnen.

Mutantfrequentie : de verhouding tussen het aantal waargenomen mutantcellen en het aantal levensvatbare cellen.

Relatieve totale groei : de toename van het aantal cellen in de loop van de tijd in vergelijking met een controle-cel populatie, berekend als het product van de suspensiegroei in vergelijking met de negatieve controle en de kloneringsefficiëntie in vergelijking met de negatieve controle.

Relatieve suspensiegroei : de toename van het aantal cellen tijdens de expressieperiode in vergelijking met de negatieve controle.

Levensvatbaarheid : de kloneringsefficiëntie van de behandelde cellen bij het uitplaten in selectieve omstandigheden na de expressieperiode.

Overleving : de kloneringsefficiëntie van de behandelde cellen bij het uitplaten aan het eind van de behandelingsperiode; de overleving wordt meestal uitgedrukt in vergelijking met de controle-cel populatie.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Cellen met een deficiëntie aan thymidinekinase (TK) door de mutatie TK^{+/−} — TK^{−/−} zijn resistent voor de cytotoxische effecten van de pyrimidine-analoog trifluorthymidine (TFT). Cellen zonder deficiëntie aan thymidinekinase zijn gevoelig voor TFT, waardoor het celmetabolisme wordt geremd en er geen celdeling meer plaatsvindt. Dit betekent dat mutantcellen zich in aanwezigheid van TFT kunnen voortplanten en normale cellen, die thymidinekinase bevatten, niet. Analooq hieraan worden ook cellen met een deficiëntie aan HPRT of XPRT geselecteerd door resistentie voor 6-thioguanine (TG) of 8-azaguanine (AG). De eigenschappen van de teststof moeten zorgvuldig worden bekeken als een base-analoog of een met de selecterende stof verwante verbinding aan een van de genmutatietests met zoogdiercellen wordt onderworpen. Eventuele vermoedens omtrent selectieve toxiciteit van de teststof bij mutantcellen en gewone cellen moeten nader worden onderzocht. Bij het testen van chemische stoffen die verwant zijn met de selecterende stof moet worden bevestigd of het selectiesysteem en de selecterende stof bruikbaar zijn (8). Cellen in een suspensie of een monolaaqcultuur worden zowel met als zonder metabole activering gedurende een geschikte periode aan de teststof blootgesteld en overgeënt om de cytotoxiciteit te bepalen en fenotypische expressie mogelijk te maken alvorens de mutanten te selecteren (9) (10) (11) (12) (13). De cytotoxiciteit wordt meestal bepaald door de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei van de culturen na de behandelingsperiode te meten. De behandelde culturen blijven een voldoende lange periode, kenmerkend voor elke locus en elk celtype, in groeimedium om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken. De mutantfrequentie wordt bepaald door bekende aantallen cellen te enten in medium met de selecterende stof voor de detectie van mutantcellen en in medium zonder de selecterende stof voor de bepaling van de kloneringsefficiëntie (levensvatbaarheid). Na een geschikte incubatietijd worden de kolonies geteld. De mutantfrequentie wordt bepaald aan de hand van het aantal mutantkolonies in het selectieve medium en het aantal kolonies in het niet-selectieve medium.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Cellen

Er kunnen verschillende soorten cellen voor deze test worden gebruikt, zoals subklonen van de cellijnen L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 of TK6. Van de bij deze test gebruikte cellen moet worden aangetoond dat ze gevoelig zijn voor chemische mutagenen en een hoge kloneringsefficiëntie en een stabiele spontane mutantfrequentie hebben. De cellen moeten op besmetting met mycoplasma worden gecontroleerd en mogen bij besmetting niet worden gebruikt.

De test moet zodanig worden opgezet dat deze een vooraf bepaalde gevoeligheid en onderscheidingsvermogen heeft. Het aantal cellen, culturen en concentraties van de teststof moet aan de hand van deze vooraf bepaalde parameters worden gekozen (14). Het minimale aantal levensvatbare cellen dat de behandeling overleeft en bij elke fase van de test wordt gebruikt, moet op basis van de spontane mutatiefrequentie worden gekozen. Een vuistregel is dat het gebruikte aantal cellen ten minste tien keer zo groot moet zijn als de inverse van de spontane mutatiefrequentie. Aanbevolen wordt echter ten minste 10^6 cellen te gebruiken. Er moeten afdoende gegevens uit het verleden over het gebruikte celsysteem beschikbaar zijn om aan te kunnen nemen dat de test consistente resultaten oplevert.

1.4.1.2. Media en kweekomstandigheden

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden (kweekvat), temperatuur, CO₂-concentratie, en vochtigheid). De media moeten worden gekozen op basis van de bij de test gebruikte selectieve systemen en celtypes. Het is vooral belangrijk dat de kweekomstandigheden zodanig worden gekozen dat de celgroei tijdens de expressieperiode en het kolonievormend vermogen van zowel de mutantcellen als de gewone cellen optimaal zijn.

1.4.1.3. Bereiding van de culturen

Cellen uit stamculturen worden in een kweekmedium geënt en bij 37 °C geïncubeerd. Het is wellicht nodig reeds aanwezige mutantcellen uit de cultuur te verwijderen voordat deze voor de test wordt gebruikt.

1.4.1.4. Metabole activering

De cellen dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) of een combinatie van fenobarbiton en β -naftoflavon (19) (20).

De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-10 % (v/v) in het uiteindelijke medium. De keuze en omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen zal wellicht meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie moeten worden gebruikt.

Een aantal ontwikkelingen, bijvoorbeeld de opbouw van genetisch aangepaste cellijnen waarin specifieke activeringsenzymen tot expressie komen, kan endogene activering mogelijk maken. Voor de keuze van de gebruikte cellijnen moet een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven (bv. aan de hand van de relevantie van het cytochroom P450-isoenzym voor het metabolisme van de teststof).

1.4.1.5. Teststof/Bereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór de behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de cellen en de S9-activiteit. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn. Water kan door toevoeging van een moleculaire zeef worden verwijderd.

1.4.2.2. Blootstellingsconcentraties

Bij de bepaling van de hoogste concentratie moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit, de oplosbaarheid in het testsysteem en veranderingen in de pH of de osmolaliteit.

De cytotoxiciteit moet met en zonder metabole activering in het hoofdexperiment worden bepaald aan de hand van adequate indicaties omtrent de integriteit en de groei van de cellen, zoals de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei. Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

Er moeten ten minste vier analyseerbare concentraties worden gebruikt. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten deze concentraties een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken; dit betekent meestal dat de concentratieniveaus niet meer dan een factor 2 tot $\sqrt{10}$ uit elkaar mogen liggen. Als de maximale concentratie op cytotoxische effecten is gebaseerd, moet de relatieve overleving (relatieve kloneringsefficiëntie) of de relatieve totale groei daarbij op ongeveer 10-20 % liggen (maar niet lager dan 10 %). Bij stoffen met een betrekkelijk geringe cytotoxiciteit moet de maximale concentratie 5 mg/ml, 5 μ l/ml of 0,01 M (de laagste van deze drie) zijn.

Bij betrekkelijk onoplosbare stoffen moet de hoogste dosis bij of boven de oplosbaarheidsgrens onder de kweekomstandigheden liggen. De oplosbaarheidsgegevens moeten worden bepaald in het uiteindelijke behandelingsmedium waaraan de cellen worden blootgesteld. Het kan nuttig zijn de oplosbaarheid aan het begin en het eind van de behandeling te bepalen, aangezien de oplosbaarheid tijdens de blootstelling in het testsysteem door de aanwezigheid van bijvoorbeeld cellen, S9 of serum kan veranderen. Onoplosbaarheid kan met het blote oog worden geconstateerd. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

1.4.2.3. Controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. Wanneer metabole activering wordt gebruikt, moet de voor de positieve controle gebruikte chemische stof activering vereisen om een mutagene reactie te veroorzaken.

Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Metabole activering	Locus	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Zonder exogene metabole activering	HPRT	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
	TK (kleine en grote kolonies)	Methylmethaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
Met exogene metabole activering	HPRT	3-Methylcholanthreen	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimethylbenzanthraceen	57-97-6	200-359-5
	TK (kleine en grote kolonies)	Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
		Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	
		Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
		3-Methylcholanthreen	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimethylamine (voor hoge concentraties van S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5

Ook andere geschikte referentiestoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt, bijvoorbeeld 5-broom-2',deoxyuridine (CAS-nr. 59-14-3 en Einecs-nr. 200-415-9) als het laboratorium over referentiegegevens uit het verleden beschikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

Er dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de testgroepen worden behandeld.

Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.4.3. Uitvoering

1.4.3.1. Behandeling met de teststof

Delende cellen worden zowel met als zonder metabole activering aan de teststof blootgesteld. De blootstelling moet gedurende een geschikte periode worden uitgevoerd (meestal is drie tot zes uur voldoende). De blootstelling kan een of meer celcycli beslaan.

Voor elke concentratie kan de bepaling met één behandelde cultuur of in duplo worden uitgevoerd. Wanneer één cultuur wordt gebruikt, moet het aantal concentraties worden verhoogd om ervoor te zorgen dat een afdoende aantal culturen kan worden geanalyseerd (d.w.z. ten minste acht analyseerbare concentraties). Voor de negatieve controle (oplosmiddel) moeten duploculturen worden gebruikt.

Bij het testen van gasen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (21) (22).

1.4.3.2. Meting van de overleving, de levensvatbaarheid en de mutantfrequentie

Aan het eind van de blootstellingsperiode worden de cellen gewassen en gekweekt om de overleving te bepalen en expressie van het mutantfenotype mogelijk te maken. Meestal wordt na de behandelingsperiode begonnen met de meting van de cytotoxiciteit door bepaling van de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei van de culturen.

Voor elke locus is er een bepaalde minimale tijd nodig om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken (voor HPRT en XPRT is ten minste zes tot acht dagen nodig en voor TK ten minste twee dagen). De cellen worden gekweekt in medium met en zonder de selecterende stof(fen) om respectievelijk het aantal mutanten en de kloneringsefficiëntie te bepalen. Aan het eind van de expressieperiode wordt een begin gemaakt met de meting van de levensvatbaarheid (gebruikt voor de berekening van de mutantfrequentie) door uitplating in het niet-selectieve medium.

Als de teststof positief reageert of de TK^{+/-} - test met L5178Y, moet bij ten minste een van de testculturen (de hoogste positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles de grootte van de kolonies worden geïnventariseerd. Als de teststof negatief reageert op de TK^{+/-} - test met L5178Y, moet bij de negatieve en positieve controles de grootte van de kolonies worden geïnventariseerd. Als de TK^{+/-} - test met TK6 wordt gebruikt, kan de grootte van de kolonies ook worden geïnventariseerd.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Er moeten gegevens worden verstrekt over de bepaling van de cytotoxiciteit en de levensvatbaarheid, het aantal kolonies en de mutantfrequentie bij de behandelde en de controleculturen. Als de teststof positief reageert op de TK^{+/+}-test met L5178Y, moeten de kolonies bij ten minste één concentratie van de teststof (de hoogste positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles worden gescoord aan de hand van de criteria voor grote en kleine kolonies. Er is een gedetailleerde analyse gemaakt van de moleculaire en cytogenetische aard van zowel grote als kleine mutantkolonies (23) (24). Bij de TK^{+/+}-test worden de kolonies gescoord aan de hand van de criteria voor normale groei (grote kolonies) en langzame groei (kleine kolonies) (25). Mutantcellen die de omvangrijkste genetische beschadigingen hebben opgelopen, hebben een langere verdubbelingstijd en vormen derhalve kleine kolonies. De omvang van deze beschadiging varieert meestal van verlies van het hele gen tot karyotypisch zichtbare chromosoomafwijkingen. Er is een verband gelegd tussen mutanten met kleine kolonies en chemische stoffen die grootschalige chromosoomafwijkingen induceren (26). Minder ernstig aangetaste mutantcellen hebben een groeitempo dat vergelijkbaar is met de oudercellen en vormen grote kolonies.

De overleving (relatieve kloneringsefficiëntie) of de relatieve totale groei moet worden vermeld. De mutantfrequentie moet worden uitgedrukt als de verhouding tussen het aantal mutantcellen en het aantal overlevende cellen.

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet er een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden samengesteld.

Een duidelijk positieve reactie behoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. Negatieve resultaten moeten per geval worden bevestigd. Wanneer een bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Bij vervollexperimenten na onduidelijke of negatieve resultaten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen en de omstandigheden bij metabole activering.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke of een reproduceerbare stijging van de mutantfrequentie. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt. Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof in dit systeem als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste studies duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen wijzen erop dat de teststof in de gebruikte gekweekte zoogdiercellen genmutaties induceert. Het duidelijkst is een positieve concentratieafhankelijke respons die reproduceerbaar is. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in de gebruikte gekweekte zoogdiercellen geen genmutaties induceert.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/ Medium :

- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Cellen :

- aard en herkomst van de cellen;
- aantal celculturen;
- aantal overenting, indien van toepassing;
- methoden om de celcultuur in leven te houden, indien van toepassing;
- afwezigheid van mycoplasma.

Testomstandigheden :

- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid, indien beschikbaar;
- samenstelling van het medium, CO₂-concentratie;
- concentratie van de teststof;
- toegevoegd volume medium en teststof;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij de behandeling;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- positieve en negatieve controles;
- lengte van de expressieperiode (met vermelding van het aantal geënte cellen en schema's voor enting en overenting, indien van toepassing);
- selecterende stoffen;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;
- methoden die zijn gebruikt om het aantal levensvatbare en mutantcellen te bepalen;
- definitie van kolonies van een bepaalde omvang en aard (bv. criteria voor « kleine » en « grote » kolonies).

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit;
- neerslagverschijnselen;
- gegevens over de pH en de osmolaliteit tijdens de blootstelling aan de teststof, indien bepaald;
- grootte van een gescoorde kolonie voor ten minste de negatieve en positieve controles;
- mogelijkheden van het laboratorium voor de detectie van mutanten met een kleine kolonie bij de TK^{+/+} - test met L5178Y, indien van toepassing;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- mutantfrequentie.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28 : Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E.H.Y. and Mallng, H.V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res., 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 394-403.
- (5) Aaron, C.S., and Stankowski, Jr. L.F., (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays : Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents : A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 196, pp. 17-36.
- (10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., ÓNeill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F.Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/ Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, pp. 135-141.
- (11) Liber, H.L., Yandell, D.W. and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells : Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L.F.Jr., Tindall, K.R., and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate - and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate - and ICR-191 Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, pp. 133-147.
- (13) Turner, N.T., Baltson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/ TK^{+/+} - TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In : Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith J.C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In : Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, pp. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterisation of the L5178Y/ TK^{+/+} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in : In Vitro Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In : In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, E.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds). Elsevier, North-Holland. pp. 85-88.

(21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO / HGPRT Mutation Assay : Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In : Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO / HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, pp. 795-801.

(23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, pp. 51-55.

(24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT r) Mutants of L5178Y/ TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, pp. 161-174.

(25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, pp. 89-102.

(26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/ TK^{+/+} - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, pp. 609-614. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,
Mevr. M. AELVOET

—
Bijlage IF

« B.23. TEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN SPERMATOGONIA VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 483 van de OESO : Test op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren veroorzaken (1) (2) (3) (4) (5). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen : het chromosoomtype en het chromatidetype. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Deze methode is niet bedoeld om numerieke afwijkingen te meten en wordt meestal niet voor dat doel gebruikt. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens.

Bij deze test wordt gemeten wat er met de chromosomen van bepaalde kiemcellen (spermatogonia) gebeurt en op grond van het resultaat zullen wellicht voorspellingen kunnen worden gedaan over de inductie van erfelijke mutaties in kiemcellen.

Voor deze test worden meestal knaagdieren gebruikt. Het is een in vivo cytogenetische test waarbij chromosoomafwijkingen worden gedetecteerd die zich voordoen bij mitose van spermatogonia. De methode is niet geschikt voor andere doelweefsels.

Om afwijkingen van het chromatidetype in spermatogonia te detecteren, wordt de eerste mitose na de behandeling onderzocht, voordat deze beschadigingen bij latere celdelingen verloren gaan. Aanvullende informatie van behandelde spermatogoniastamcellen kan worden verkregen door de chromosomen bij de meiose te analyseren op afwijkingen van het chromosoomtype tijdens de diakinese-metafase I, wanneer de behandelde cellen spermatocyten worden.

Deze in vivotest is bedoeld om na te gaan of mutagenen voor somatische cellen ook in kiemcellen mutageen zijn. Daarnaast is de test met spermatogonia geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese.

De testis bevat een aantal generaties spermatogonia met een uiteenlopende gevoeligheid voor chemische stoffen. De geconstateerde afwijkingen vertegenwoordigen dan ook een gecombineerde respons van de behandelde spermatogoniacelpopulaties, waarbij de in grotere aantallen voorkomende gedifferentieerde spermatogonia overheersen. Afhankelijk van hun plaats binnen de testis kunnen verschillende generaties spermatogonia vanwege de fysische en fysiologische barrière van de cellen van Sertoli en de bloed-testisbarrière al dan niet via de grote bloedsomloop bereikbaar zijn.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metabool daarvan niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Hiaat : een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

Numerieke afwijking : een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte dieren.

Polyplöidie : het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen (n) dan het diploïde aantal (d.w.z. 3n, 4n, enz.).

Structurele afwijking : een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld en op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood. Voordat de dieren worden gedood, worden ze behandeld met een metafasestopper (bv. colchicine of Colcemid®). Vervolgens worden chromosoompreparaten van de kiemcellen gemaakt, die worden gekleurd; de cellen in de metafase worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Meestal worden mannetjes van Chinese hamsters of muizen gebruikt. Ook mannetjes van andere geschikte zoogdiersoorten komen echter in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal $\pm 20\%$ van het gemiddelde gewicht bedragen.

1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren.

Gezonde jonge volwassen mannetjes worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt.

De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren voordat de test begint.

1.4.1.4. Bereiding van de doseringen

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosiseniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. Controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia veroorzaakt bij toediening op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht.

De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Tevens kan waar mogelijk het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide-monomeer	79-06-1	201-173-7
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met chromosoomafwijkingen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.5. UITVOERING

1.5.1. Aantal dieren

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare mannetjes bevatten.

1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt bij voorkeur een of twee keer (d.w.z. als één of twee behandelingen) toegediend. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. Voor een ander doseringsschema moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

In de hoogste doseringsgroep worden twee bemonsteringstijdstippen na de behandeling gebruikt. Aangezien de kinetiek van de celcyclus door de teststof kan worden beïnvloed, wordt er één vroeg en één laat bemonsteringstijdstip gebruikt rond 24 en 48 uur na de behandeling. Voor andere doses dan de hoogste dosering moet een bemonsteringstijdstip op 24 uur of 1,5-maal de lengte van de celcyclus na de behandeling worden gekozen, tenzij bekend is dat een ander bemonsteringstijdstip geschikter is voor de detectie van effecten (6).

Daarnaast kunnen ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt. Een vroeger bemonsteringstijdstip zal bijvoorbeeld wellicht beter zijn bij stoffen die tot achterblijvende chromosomen kunnen leiden of S-onafhankelijke effecten kunnen hebben (1).

Per geval moet worden onderzocht of een schema voor herhaalde behandeling nodig is. Na herhaalde behandeling worden de dieren 24 uur (1,5-maal de lengte van de celcyclus) na de laatste behandeling gedood. Waar mogelijk kunnen aanvullende bemonsteringstijdstippen worden gebruikt.

Voordat de dieren worden gedood, worden ze intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafasestopper (bv. Colcemid ® of colchicine). De dieren worden na een adequate wachttijd bemonsterd. Voor muizen moet er ongeveer drie tot vijf uur worden gewacht en voor Chinese hamsters ongeveer vier tot vijf uur.

1.5.3. Dosisniveaus

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam en hetzelfde behandelingschema als bij het hoofdonderzoek (7). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden.

Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor de spermatogonia oplevert (bv. een daling van de verhouding tussen cellen in spermatogniamitose en eerste en tweede meiosemetafase; deze daling mag niet groter zijn dan 50 %).

1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven.

Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. Chromosoompreparaten

Onmiddellijk nadat het dier is gedood worden suspensies gemaakt van cellen uit één testis of beide testes en worden deze in een hypotone oplossing gebracht en gefixeerd. De cellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd.

1.5.7. Analyse

Voor elk dier worden minimaal 100 goed gespreide metafases geanalyseerd (d.w.z. ten minste 500 metafases per groep). Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd. Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de fixatieprocedures vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen $2n \pm 2$ centromeren bevatten.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk dier in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier.

Voor elk dier apart moet het aantal cellen met structurele chromosoomafwijkingen en het aantal chromosoomafwijkingen per cel worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd maar meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen.

Als zowel mitose als meiose wordt geobserveerd, wordt als maat voor de cytotoxiciteit bij alle behandelde dieren en negatieve controles in een monster van in totaal 100 delende cellen per dier de verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase bepaald om een mogelijk cytotoxisch effect vast te stellen. Als alleen de mitose wordt geobserveerd, moet in ten minste 1 000 cellen voor elk dier de mitotische index worden bepaald.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het relatieve aantal cellen met chromosoomafwijkingen of een duidelijke stijging van het aantal cellen met afwijkingen bij één dosis en één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (8). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia wijzen erop dat de teststof in de kiemcellen van de geteste soort structurele chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in de kiemcellen van de geteste soort geen chromosoomafwijkingen induceert.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metaboliëten daarvan in het doelweefsel terechtkomen, dient te worden besproken.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium

— Motivering voor de keuze van het medium.

— Oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren :

— Gebruikte soort/stam.

— Aantal en leeftijd van de dieren.

— Herkomst, huisvesting, voeding, enz.

— Het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden :

— Gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd.

— Achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus.

— Achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg.

— Gegevens over de bereiding van de teststof.

— Gegevens over de toediening van de teststof.

— Achtergrond voor de keuze van het tijdstip waarop de dieren gedood worden.

— Omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing.

— Gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater.

— Een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema.

— Methoden voor de meting van de toxiciteit.

— Naam van de metafasestopper, gebruikt concentratie en blootstellingsduur.

— Methoden voor de bereiding van de objectglaasjes.

— Criteria voor het scoren van afwijkingen.

— Aantal geanalyseerde cellen per dier.

— Criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- Tekenen van toxiciteit.
- Mitotische index.
- Verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase.
- Aard en aantal van de afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elk dier.
- Totaalaantal afwijkingen per groep.
- Aantal cellen met afwijkingen per groep.
- Indien mogelijk het verband tussen dosis en respons.
- Eventuele statistische analyses.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles.
- Gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.
- Veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Adler, I.D., (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In : Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B : Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In : Mutagenicity Testing : a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E. (1964). An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289-294.
- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res. 52, pp. 207-209.
- (6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, pp. 313-318.
- (7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society / UK Environmental Mutagen Society Working Group : Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.
- (8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

« B.39. IN-VIVOTEST OP DNA-HERSTELSYNTHESE IN LEVERCELLEN VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 486 van de OESO : In-vivotest op DNA-herstelsynthese in levercellen van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vivotest op DNA-herstelsynthese (unscheduled DNA synthesis - UDS) in levercellen van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen DNA-herstel in levercellen van behandelde dieren induceren (1) (2) (3) (4).

Deze in-vivotest maakt het mogelijk de genotoxische effecten van chemische stoffen in de lever te onderzoeken. Het gemeten eindpunt levert een indicatie op van de DNA-beschadiging en het herstel daarvan in levercellen. De lever is de plaats waar het metabolisme van geresorbeerde verbindingen zich meestal voor het grootste deel afspeelt en is derhalve een goede plaats om DNA-beschadiging in vivo te meten.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Het eindpunt van UDS wordt gemeten door bepaling van de opname van gelabelde nucleosiden in cellen waar geen geprogrammeerde DNA-synthese (in de S-fase) plaatsvindt. De meest gebruikte techniek is bepaling van de opname van met tritium gelabeld thymidine (^3H -TdR) met behulp van autoradiografie. Bij een in vivo UDS-test wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van de rattenlever. Ook andere weefsels dan de lever kunnen worden gebruikt, maar daarvoor is deze methode niet geschikt.

De detectie van een UDS-respons is afhankelijk van het aantal DNA-basen dat op de beschadigde plaats wordt verwijderd en vervangen. De UDS-test is dan ook bijzonder geschikt voor de detectie van stoffen die leiden tot vervanging van grote stukken van 20-30 basen (« longpatch repair »). De gevoeligheid bij de detectie van « shortpatch repair », waarbij één tot drie basen worden vervangen, is daarentegen veel lager. Bovendien kunnen mutagene effecten een gevolg zijn van niet of verkeerd herstelde of verkeerd gerepliceerde DNA-beschadigingen. De intensiteit van de UDS-respons levert geen indicatie op omtrent de betrouwbaarheid van het herstelproces. Daarnaast is het mogelijk dat een mutagene stof met DNA reageert, maar dat de DNA-beschadiging niet via een excisieherstelproces wordt gerepareerd. De UDS-test levert dus niet veel specifieke informatie over een mutagene werking op, maar dit wordt gecompenseerd door de potentiële gevoeligheid van dit eindpunt omdat het in het hele genoom wordt gemeten.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Cel in herstel : een cel met een hogere nettokernkorreling (NKK) dan een vooraf bepaalde waarde, waarvoor het laboratorium dat de test uitvoert een motivering moet geven.

Nettokernkorreling : een kwantitatieve maat voor de UDS-activiteit van cellen bij een UDS-test met autoradiografie, berekend door het gemiddelde aantal cytoplasmakorrels in kern-equivalente cytoplasmagebieden (CK) af te trekken van het aantal kernkorrels (KK) : $\text{NKK} = \text{KK} - \text{CK}$. De NKK wordt per cel apart berekend en vervolgens samengevoegd voor cellen in een cultuur, in parallelle culturen, enz.

DNA-herstelsynthese (unscheduled DNA synthesis - UDS) : herstelsynthese van DNA na excisie en verwijdering van een stuk DNA dat gedeeltelijk beschadigd is door een chemische stof of een fysisch agens.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De in vivo UDS-test in levercellen van zoogdieren levert een indicatie op van de herstelsynthese van DNA na excisie en verwijdering van een stuk DNA dat gedeeltelijk beschadigd is door een chemische stof of een fysisch agens. Meestal is de test gebaseerd op de inbouw van ^3H -TdR in het DNA van levercellen met een geringe frequentie van cellen in de S-fase van de celcyclus. De opname van ^3H -TdR wordt meestal bepaald met behulp van autoradiografie, aangezien deze techniek niet zo gevoelig is voor storing door cellen in de S-fase als bijvoorbeeld vloeistofscintillatie-telling.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Meestal worden ratten gebruikt, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen.

Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal $\pm 20\%$ van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie en blijven voordat de test begint minimaal vijf dagen in hun kooi om in het laboratorium te acclimatiseren.

1.4.1.4. Teststof/Bereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisiniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. Controles

In elk onafhankelijk uitgevoerd deel van het experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt waarvan bekend is dat deze tot UDS leidt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. Wanneer voor een positieve controle metabole activering nodig is, moet de dosering zodanig worden gekozen dat de respons gematigd is (4). De doseringen kunnen zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Bemonsteringstijdstip	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Vroeg (2-4 uur)	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-249-8
Laat (12-16 uur)	N-Fluoreen-2-ylacetamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof.

1.5. UITVOERING

1.5.1. Aantal en geslacht van de dieren

Er moet een afdoende aantal dieren worden gebruikt om rekening te houden met de natuurlijke biologische variatie in de respons op de test. Elke groep moet minimaal drie analyseerbare dieren bevatten. Wanneer er een significant basisbestand met gegevens uit het verleden is opgebouwd, zijn er voor de gelijktijdige negatieve en positieve controlegroepen slechts één of twee dieren nodig.

Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht, bij voorkeur mannetjes, uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals dit bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt in het algemeen in één behandeling toegediend.

1.5.3. Dosisniveaus

Normaal gesproken worden er ten minste twee dosisniveaus gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. In het algemeen wordt als laagste dosis 25-50 % van de hoogste dosis gebruikt.

Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek.

De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit in de lever oplevert (bv. pyknotische kernen).

1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis van minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek uit te voeren. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Intraperitoneale toediening wordt echter niet aanbevolen, aangezien de lever dan rechtstreeks aan de teststof kan worden blootgesteld in plaats van via de bloedsomloop. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven. Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. Levercelpreparaten

Normaal gesproken worden twaalf tot 16 uur na de toediening van de teststof levercelpreparaten van de behandelde dieren gemaakt. Meestal is ook een eerder bemonsteringstijdstip (normaal gesproken twee tot vier uur na de behandeling) nodig, tenzij er op twaalf tot 16 uur een duidelijke positieve reactie is. Er kunnen echter ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt, wanneer daarvoor op basis van toxicokinetische gegevens een motivering kan worden gegeven.

Meestal worden kortetermijnculturen van zoogdierlevercellen gemaakt door de lever in situ met collagenase te perfuseren en de net losgemaakte levercellen zich te laten hechten aan een geschikt oppervlak. De levercellen van dieren uit de negatieve controlegroep moeten een levensvatbaarheid (5) van ten minste 50 % hebben

1.5.7. Bepaling van de UDS

Net geïsoleerde zoogdierlevercellen worden gedurende een geschikte periode, bijvoorbeeld drie tot acht uur, geïncubeerd met een medium dat meestal ^3H -TdR bevat. Aan het eind van de incubatieperiode worden de cellen uit het medium verwijderd en kunnen ze vervolgens worden geïncubeerd met medium dat een overmaat ongelabeld thymidine bevat, om de niet ingebouwde radioactiviteit te verdrijven (« cold chase »). De cellen worden vervolgens gespoeld, gefixeerd en gedroogd. Bij een langduriger incubatietijd zal de « cold chase » wellicht niet nodig zijn. De objectglaasjes worden in autoradiografische emulsie gedoopt, in het donker belicht (bv. gekoeld gedurende zeven tot 14 dagen), ontwikkeld en gekleurd, waarna de belichte zilverterkorrels worden geteld. Voor elk dier worden twee tot drie objectglaasjes geprepareerd.

1.5.8. Analyse

De geprepareerde objectglaasjes moeten voldoende cellen met een normale morfologie bevatten om een zinvolle bepaling van de UDS mogelijk te maken. De preparaten worden microscopisch onderzocht op tekenen van duidelijke cytotoxiciteit (bv. pyknose of een verlaagd gehalte aan het radioactieve isotoop).

De objectglaasjes worden vóór het tellen van de korrels gecodeerd. Normaal gesproken worden voor elk dier 100 cellen van ten minste twee objectglaasjes gescoord. Voor het scoren van minder dan 100 cellen per dier moet een motivering worden gegeven. Er worden geen korrels geteld bij cellen waarvan de kern in de S-fase is, maar het relatieve aantal cellen in de S-fase kan wel geregistreerd worden.

Met behulp van geschikte methoden wordt aan de hand van de neergeslagen zilverterkorrels de hoeveelheid ingebouwd ^3H -TdR in de kern en het cytoplasma van morfologisch normale cellen bepaald.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk objectglaasje en elk dier apart worden verstrekt. Daarnaast moet een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden gegeven. Voor elke cel, voor elk dier en voor elke dosis en tijd wordt de nettokernkorreling (NKK) berekend volgens de formule : $\text{NKK} = \text{KK} - \text{CK}$. Als het aantal « cellen in herstel » wordt geteld, moet een motivering worden gegeven voor de criteria voor de definitie van « cel in herstel » op basis van de resultaten bij in het verleden of tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles. De numerieke resultaten kunnen met behulp van statistische methoden worden geëvalueerd. Als statistische tests worden gebruikt, moeten deze vóór de uitvoering van het onderzoek worden gekozen en gemotiveerd.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Criteria voor een positieve/negatieve respons zijn bijvoorbeeld :

Positief	i)	NKK-waarden boven een vooraf bepaalde drempelwaarde die op basis van gegevens van het laboratorium uit het verleden wordt gemotiveerd;
of	ii)	NKK-waarden die significant hoger zijn dan de gelijktijdige controle.
Negatief	i)	NKK-waarden binnen/onder de controledrempelwaarde uit het verleden;
of	ii)	NKK-waarden die niet significant hoger zijn dan de gelijktijdige controle.

Er moet naar de biologische relevantie van de gegevens worden gekeken. Daarbij moet bijvoorbeeld rekening worden gehouden met parameters als de spreiding over dieren, het verband tussen dosis en respons en de cytotoxiciteit. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt. Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de UDS-test met levercellen van zoogdieren in vivo wijzen erop dat een teststof in vivo DNA-beschadigingen in levercellen van zoogdieren induceert, die in vitro door DNA-herstelsynthese kunnen worden gerepareerd. Negatieve resultaten wijzen erop dat de teststof onder de testomstandigheden geen DNA- beschadigingen induceert die met deze test kunnen worden gedetecteerd.

De waarschijnlijkheid dat de teststof in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomt (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel / Medium :

- Motivering voor de keuze van het medium.
- Oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel / medium, indien bekend.

Proefdieren :

- Gebruikte soort / stam.
- Aantal, leeftijd en geslacht van de dieren.
- Herkomst, huisvesting, voeding, enz.
- Het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden :

- Positieve en negatieve (oplosmiddel / medium) controles.
- Gegevens uit het oriënterende onderzoek, indien dit is uitgevoerd.
- Achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus.
- Gegevens over de bereiding van de teststof.
- Gegevens over de toediening van de teststof.
- Achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg.
- Methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing.
- Omrekening van de concentratie van de teststof in het voer / drinkwater (in ppm) in de feitelijke dosis (in mg / kg lichaamsgewicht / dag), indien van toepassing.
- Gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater.
- Een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema.
- Methoden voor de meting van de toxiciteit.
- Methoden voor het kweken en prepareren van de levercellen.
- Gebruikte autoradiografietechniek.
- Aantal geprepareerde objectglaasjes en aantal gescoorde cellen.
- Criteria voor de beoordeling.
- Criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- Waarden voor de kernkorrels, de cytoplasmakorrels en de nettokernkorreling voor elk objectglaasje apart, gemiddeld voor elk dier en gemiddeld per groep.
- Indien beschikbaar het verband tussen dosis en respons.
- Eventuele statistische analyses.
- Teken van toxiciteit.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel / medium) en positieve controles.
- Gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel / medium) en positieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.
- Aantal « cellen in herstel », indien bepaald.
- Aantal cellen in de S-fase, indien bepaald.
- Levensvatbaarheid van de cellen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Ashby, J. Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the In Vivo Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J. Probst, G. and Williams, G. (1987); A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res., 189, pp. 123-133.
- (3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay. In : Kirkland D.J. and Fox M., (eds), Supplementary Mutagenicity Tests : UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
- (4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, Mutation Res., 312, pp. 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo / In Vitro DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo / In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553-562.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

Bepalingen betreffende kinderveilige sluitingen

Naast de bepalingen in artikel 7, lid 1, onder e), van dit besluit dienen houders, die stoffen bevatten die gevaar bij verslikken opleveren (Xn; R65) en overeenkomstig punt 3.2.3 van bijlage VI bij dit besluit worden ingedeeld en gekenmerkt, ongeacht de hoeveelheid die zij kunnen bevatten, van een kinderveilige sluiting te worden voorzien, met uitzondering van stoffen die in de vorm van aerosolen of in een houder met een vaste verstuiver in de handel worden gebracht.

1. Hersluitbare verpakkingen

Kinderveilige sluitingen van hersluitbare verpakkingen moeten voldoen aan ISO-norm 8317 (uitgave 1 juli 1989) betreffende « Kinderveilige verpakkingen - Eisen en beproevingsmethoden ten aanzien van hersluitbare verpakkingen », vastgesteld door de Internationale Organisatie voor Normalisatie (ISO).

2. Niet-hersluitbare verpakkingen

Kinderveilige sluitingen van niet-hersluitbare verpakkingen moeten voldoen aan CEN-norm EN-862 (uitgave maart 1997) betreffende « Verpakkingen - Kinderveilige verpakkingen - Eisen en beproevingsmethoden ten aanzien van niet-hersluitbare verpakkingen voor niet-farmaceutische producten », vastgesteld door het Europees Comité voor Normalisatie (CEN).

3. Opmerkingen

1. Alleen laboratoria die aan de Europese normenreeks EN 45 000 voldoen, zijn bevoegd na te gaan of aan bovenstaande normen is voldaan.

2. Bijzondere gevallen

Indien het duidelijk is dat een verpakking in voldoende mate veilig is voor kinderen omdat kinderen niet bij de inhoud ervan kunnen komen zonder de hulp van een stuk gereedschap, hoeft de test niet te worden uitgevoerd.

In alle andere gevallen en wanneer er voldoende redenen zijn om aan de doeltreffendheid van de kinderveilige sluiting te twijfelen, kan de nationale autoriteit van degene die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen, een certificaat eisen dat is afgegeven door een laboratorium als bedoeld onder 3.1, waarin wordt verklaard dat :

— het toegepaste type sluiting zodanig is dat het niet noodzakelijk is om onderzoek volgens bovengenoemde ISO- of CEN-norm te verrichten,

of

— de sluiting is onderzocht en aan de voorschriften van bovengenoemde norm voldoet.

DEEL B

Bepalingen betreffende bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen

De technische specificaties voor bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen moeten voldoen aan EN ISO-norm 11683 (uitgave 1997) betreffende « Verpakkingen - Bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen – Eisen » ».

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :