

## I

(Veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

**RICHTLINIE 2000/32/EG DER KOMMISSION****vom 19. Mai 2000****zur sechszwanzigsten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt (\*)****(Text von Bedeutung für den EWR)**

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 67/548/EWG des Rates vom 27. Juni 1967 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe<sup>(1)</sup>, zuletzt geändert durch die Richtlinie 1999/33/EG des Europäischen Parlaments und des Rates<sup>(2)</sup>, insbesondere auf Artikel 28,

in Erwägung nachstehender Gründe:

(1) Anhang I der Richtlinie 67/548/EWG enthält eine Liste gefährlicher Stoffe sowie Einzelheiten über die Verfahren zur Kennzeichnung und Einstufung der Stoffe. Nach dem neuesten Stand der wissenschaftlichen und technischen Kenntnisse sollte die Liste der gefährlichen Stoffe im Anhang angepaßt werden. Bestimmte Abschnitte im Vorwort und in der Tabelle A von Anhang I der Richtlinie müssen in einigen Sprachfassungen korrigiert werden.

(2) Anhang III derselben Richtlinie enthält eine Liste von Sätzen zur Bezeichnung besonderer Gefahren bei gefährlichen Stoffen und Zubereitungen. Anhang IV der Richtlinie 67/548/EWG enthält eine Liste von Sicherheitsratschlägen für gefährliche Stoffe und Zubereitungen. Anhang VI der Richtlinie enthält einen Leitfaden zur Einstufung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe und Zubereitungen. Bestimmte Abschnitte in den Anhängen III, IV und VI der Richtlinie müssen in einigen Sprachfassungen korrigiert werden.

(3) In Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG sind die Methoden zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, der Toxizität und der Ökotoxizität festgelegt. Dieser Anhang muß an den technischen Fortschritt angepaßt werden.

(4) Anhang IX der Richtlinie 67/548/EWG enthält Vorschriften für kindergesicherte Verschlüsse. Diese Vorschriften sollen angepaßt und aktualisiert werden. Der Anwendungsbereich kindergesicherter Verschlüsse muß ausgeweitet werden.

(5) Die mit dieser Richtlinie getroffenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ausschusses zur Anpassung der Richtlinien zur Beseitigung der technischen Handelshemmnisse für gefährliche Stoffe und Zubereitungen an den technischen Fortschritt —

HAT FOLGENDE RICHTLINIE ERLASSEN:

*Artikel 1*

Die Richtlinie 67/548/EWG wird hiermit wie folgt geändert:

1. Anhang I wird wie folgt geändert:

- a) Die Anmerkung Q in Anhang 1A dieser Richtlinie ersetzt die entsprechende Anmerkung im Vorwort.
- b) Die Zeilen in Anhang 1B dieser Richtlinie ersetzen die entsprechenden Zeilen in Tabelle A.
- c) Die Einträge in Anhang 1C dieser Richtlinie ersetzen die entsprechenden Einträge.
- d) Die Einträge in Anhang 1D dieser Richtlinie werden aufgenommen.

2. Die Bezeichnung der Gefahren in Anhang 2 dieser Richtlinie ersetzt die entsprechende Bezeichnung in Anhang III.

3. Anhang IV wird wie folgt geändert:

- a) Die Sätze in Anhang 3A dieser Richtlinie ersetzen die entsprechenden Sätze in Anhang IV.

(\*) Angenommen vor der 27. Anpassung.

<sup>(1)</sup> ABl. 196 vom 16.8.1967, S. 1.<sup>(2)</sup> ABl. L 199 vom 30.7.1999, S. 57.

- b) Die kombinierten Sicherheits-Sätze in Anhang 3B dieser Richtlinie ersetzen die entsprechenden Sätze in Anhang IV.
4. Anhang V Teil B wird wie folgt geändert:
- a) Kapitel B.10 wird durch den Wortlaut von Anhang 4A dieser Richtlinie ersetzt.
- b) Kapitel B.11 wird durch den Wortlaut von Anhang 4B dieser Richtlinie ersetzt.
- c) Kapitel B.12 wird durch den Wortlaut von Anhang 4C dieser Richtlinie ersetzt.
- d) Die Kapitel B.13 und B.14 werden durch den Wortlaut von Anhang 4D dieser Richtlinie ersetzt.
- e) Kapitel B.17 wird durch den Wortlaut von Anhang 4E dieser Richtlinie ersetzt.
- f) Kapitel B.23 wird durch den Wortlaut von Anhang 4F dieser Richtlinie ersetzt. Der Titel von Kapitel B.23 in der Begründung wird entsprechend geändert.
- g) Der Wortlaut von Anhang 4G dieser Richtlinie wird hinzugefügt.
5. Der vierte Gedankenstrich der allgemeinen Einleitung von Teil C in Anhang V wird gestrichen.
6. Der Wortlaut in Anhang 5 dieser Richtlinie ersetzt den entsprechenden Wortlaut in Anhang VI.
7. Anhang IX wird gemäß Anhang 6 dieser Richtlinie geändert.

*Artikel 2*

(1) Die Mitgliedstaaten erlassen die erforderlichen Rechts- und Verwaltungsvorschriften, um dieser Richtlinie spätestens zum 1. Juni 2001 nachzukommen. Sie unterrichten die Kommission unverzüglich davon.

Wenn die Mitgliedstaaten diese Vorschriften erlassen, nehmen sie in diesen Vorschriften selbst oder durch einen Hinweis bei der amtlichen Veröffentlichung auf diese Richtlinie Bezug. Die Mitgliedstaaten regeln die Einzelheiten dieser Bezugnahme.

(2) Die Mitgliedstaaten teilen der Kommission den Wortlaut der wichtigsten innerstaatlichen Rechtsvorschriften mit, die sie auf dem unter diese Richtlinie fallenden Gebiet erlassen.

*Artikel 3*

Diese Richtlinie tritt am dritten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* in Kraft.

*Artikel 4*

Diese Richtlinie ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 19. Mai 2000

*Für die Kommission*  
Margot WALLSTRÖM  
*Mitglied der Kommission*

## ANHANG 1A

## VORWORT ZU ANHANG I

**Erläuterung der Anmerkungen zur Einstufung und Kennzeichnung von Stoffen**

DA:

Note Q:

Klassificeringen som kræftfremkaldende kan udelades for fibre, som opfylder en af følgende betingelser:

- en kortvarig biopersistensprøve ved inhalation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægtet halveringstid på mindre end 10 dage
- en kortvarig biopersistensprøve ved intratrakeal instillation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægtet halveringstid på mindre end 40 dage
- en egnet intra-peritoneal prøve ikke har vist kræftfremkaldende virkning, eller
- en egnet langvarig inhalationsprøve ikke har vist relevante sygdomsfremkaldende virkninger eller neoplastiske forandringer.

SV:

Note Q:

Ämnet behöver inte klassificeras som cancerframkallande om det kan visas att det uppfyller ett av följande villkor:

- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid inhalation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 10 dagar
- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid intratrakeal instillation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 40 dagar
- ett lämpligt intraperitonealt test har inte givit belägg för förhöjd cancerogenitet
- frånvaro av relevant patogenitet eller neoplastiska förändringar i ett lämpligt långtids inhalationstest.

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DE-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die IT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

\_\_\_\_\_

## ANHANG 1B

TABELLE A

Z	Symb.	ES	DA	DE	EL	EN	FI	FR	IT	NL	PT	SV
„18	Ar	Argón	Argon	Argon	Αργό	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon	Árgon	Argon“
„64	Gd	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinium	Γαδολίνιο	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium	Gadólínió	Gadolinium“

## ANHANG 1C

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
006-011-00-7	Carbaryl (ISO) 1-Naphthylmethylcarbamat		200-555-0	63-25-2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-)22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	Metam-Natrium (ISO) Natrium-N-methyl-dithiocarbamat		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	Diuron (ISO)		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	Propoxur (ISO) 2-Isopropoxyphenylmethylcarbamat		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-017-00-X	Aldicarb (ISO) 2-Methyl-2-(methylthio) propionaldehyd- O-(methylcarbamoyl) oxim		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	Aminocarb (ISO) 4-Dimethylamino-3-tolylmethylcarbamat		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	Diallat (ISO) S-2,2-Dichlorallyldiisopropylthiocarbamat		218-961-1	2303-16-4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
006-020-00-6	Barban (ISO) (4-Chlorbut-2-ynyl)-3-chlorphenylcarbamat		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
006-023-00-2	Mercaptodimethur (ISO) Metiocarb 4-Methylthio-3,5-xylylmethylcarbamat		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	Proxan-Natrium (ISO) Natrium-O-isopropyl-dithiocarbonat		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
006-026-00-9	Carbofuran (ISO) 2,3-Dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-ylmethylcarbammat		216-353-0	1563-66-2	T+; R26/28 N; R50-53	T+; N R: 26/28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	Dinobuton (ISO) 2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenylisopropylcarbonat		213-546-1	973-21-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-029-00-5	Dioxacarb (ISO) 2-(1,3-Dioxolan-2-yl)phenylmethylcarbammat		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N; R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2-)37-45-61		
006-033-00-7	Metoxuron (ISO) 3-(3-Chlor-4-methoxy-phenyl)-1,1-dimethylharnstoff		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	Pebulat (ISO) S-Propylbutyl(ethyl)thiocarbamat		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)23-61		
006-035-00-8	Pirimicarb (ISO) 5,6-Dimethyl-2-dimethylamino-pyrimidin-4-yl-N,N-dimethyl-carbammat		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	Promecarb (ISO) 5-Isopropyl-3-tolylmethylcarbammat		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	Sulfallat (ISO) 2-Chlorallyldiethylthiocarbamat	E	202-388-9	95-06-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	Triallat (ISO) S-2,3,3-Trichlorallyldiisopropylthiocarbamat		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
006-042-00-6	Monuron (ISO) 3-(4-Chlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff		205-766-1	150-68-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-043-00-1	Monuron-TCA 3-(4-Chlorphenyl)-1,1-dimethyluroniumtrichloracetat		—	140-41-0	Xi; R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
006-045-00-2	Methomyl (ISO) 1-Methylthioethylidenaminmethylcarbammat		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	Bendiocarb (ISO) 2,2-Dimethyl-1,3-benzodioxol-4-ylmethylcarbammat		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	Bufencarb (ISO) 3-(1-Methylbutyl)phenylmethylcarbammat-3-(1-Ethylpropyl)phenylmethylcarbammat (3:1)		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	Ethiofencarb (ISO) 2-Ethylthiomethylphenylmethylcarbammat		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-050-00-X	Fenuron-TCA 1,1-Dimethylphenyluroniumtrichloracetat		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)60-61		
006-053-00-6	Isoproc carb (ISO) o-Cumenylmethylcarbammat		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-054-00-1	Mexacarb (ISO) 4-Dimethylamino-3,5-xylylmethylcarbammat		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-057-00-8	Nitrapyrin (ISO) 2-Chlor-6-trichlormethylpyridin		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)24-61		
006-060-00-4	Oxycarboxin (ISO) 5,6-Dihydro-2-methyl-1,4-oxathiin-3-carboxanilid-4,4-dioxid		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
006-069-00-3	Thiophanat-Methyl (ISO)		245-740-7	23564-05-8	Muta. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-070-00-9	Furmecyclo N-Cyclohexyl-N-methoxy-2,5-dimethyl-3-furamid		262-302-0	60568-05-0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
006-088-00-7	Benfuracarb (ISO)		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
007-012-00-5	N,N-Dimethylhydrazin	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	1,2-Dimethylhydrazin	E	—	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25%: T; R45-23/24/25 3% ≤ C < 25%: T; R45-20/21/22 0,01% ≤ C < 3%: T; R45	
009-003-00-1	Fluorwasserstoffsäure ... % Flußsäure ... %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-)7/9-26-36/37-45	C ≥ 7%: T+; C; R26/27/28-35 1% ≤ C < 7%: T; R23/24/25-34 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	Azinphos-methyl (ISO) O,O-Dimethyl-4-oxobenzotriazin-3-ylmethylthiophosphat		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	Fenthion (ISO) O,O-Dimethyl-O-(4-methylthio-m-tolyl)thiophosphat		200-231-9	55-38-9	Muta. Cat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
015-056-00-1	Azinphos-ethyl (ISO) O,O-Diethyl-4-oxobenzotriazin-3-ylmethylthiophosphat		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	Triazophos (ISO) O,O-Diethyl-O-1-phenyl-1,2,4-triazol-3-ylthiophosphat		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
016-013-00-X	Schwefeldichlorid		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
016-014-00-5	Schwefeltetrachlorid		—	13451-08-6	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
016-023-00-4	Dimethylsulfat	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25%: T+; R45-25-26-34-43 10% ≤ C < 25%: T+; R45-22-26-34-43 7% ≤ C < 10%: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5% ≤ C < 7%: T; R45-22-23-36/37/38-43 3% ≤ C < 5%: T; R45-22-23-43 1% ≤ C < 3%: T; R45-23-43 0,1% ≤ C < 1%: T; R45-20 0,01% ≤ C < 0,1%: T; R45	
016-024-00-X	Dimexano (ISO) Bis(methoxy-thiocarbonyl)-disulfid		215-993-8	1468-37-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
016-071-00-6	Trinatrium-3-amino-6,13-dichlor-10-[[3-[[[4-chlor-6-(2-sulfonatophenylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]propyl]amino]-4,11-triphenoxydioxazindisulfonat		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
022-001-00-5	Titantetrachlorid		231-441-9	7550-45-0	R14 C; R34	C R: 14-34 S: (1/2-)7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
030-004-00-8	Dimethylzink [1] Diethylzink [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F; R17 C; R34 N; R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2-)16-43-45-60-61		
050-002-00-0	Cyhexatin (ISO) Tri(cyclohexyl)zinnhydroxid		236-049-1	13121-70-5	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)13-60-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
050-012-00-5	Tetracyclohexylstannan [1] Chlortricyclohexylstannan [2] Butyltricyclohexylstannan [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 1 %: Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	Fenbutatin-Oxid (ISO) Bis(tris(2-methyl-2-phenylpropyl)zinn)oxid		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	Bleisulfochromatgelb (Diese Substanz wird im Colour Index durch Colour Index Constitution Number, C.I. 77603, identifiziert.)		215-693-7	1344-37-2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	Bleichromatmolybdatsulfatrot (Diese Substanz wird im Colour Index durch Colour Index Constitution Number, C.I. 77605, identifiziert.)		235-759-9	12656-85-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	Cumol [1] Propylbenzol [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2-)24-37-61-62		4
601-032-00-3	Benzo[a]pyren Benzo[def]chrysen		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	Benz[e]acephenanthylen		205-911-9	205-99-2	Carc. Cat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-Dichlorbenzol p-Dichlorbenzol		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-Jodpropen Allyljodid		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7-26-45		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
603-076-00-9	But-2-in-1,4-diol 2-Butin-1,4-diol		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2-)26-36/37/39-45	C ≥ 50%: T; R21-23/25-34-48/22 25% ≤ C < 50%: T; R21-23/25-36/38-48/22 10% ≤ C < 25%: Xn; R20/22-48/22 3% ≤ C < 10%: Xn; R20/22	
603-091-00-0	Exo-1-methyl-4(1-methylethyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan-2-ol		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2-)26		
603-093-00-1	Exo-(+/-)-1-methyl-4(1-methylethyl)-2-[(2-methylphenyl)methoxy]-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2-)23-61		
603-097-00-3	1,1',1''-Nitrilotripropan-2-ol Triisopropanolamin		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2-)26-61		
603-117-00-0	Propan-2-ol		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2-)7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	Biphenyl-2-ol 2-Hydroxybiphenyl		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2-)22-61		
604-021-00-1	Natriumbiphenyl-2-yloxid		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2-)22-26-61		
604-024-00-8	4,4'-Isobutylethylidendiphenol		401-720-1	6807-17-6	Repr. Cat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	Acifluorfen [1] Acifluorfen-Natrium [2] 5-[2-Chlor-4-(trifluormethyl)phenoxy]-2-nitrobenzoesäure [1] Natrium-5-[2-chlor-4-(trifluormethyl)phenoxy]-2-nitrobenzoat [2]		256-634-5 [1] 263-560-7 [2]	50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-)24-39-60-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
604-043-00-1	Monobenzon		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	Mequinol		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	Glyoxal ... %	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10 %: Xn; R20-36/38-40-43 1 % ≤ C < 10 %: Xn; R40-43	
606-016-00-X	Pindon (ISO) 2-Pivaloyl-indan-1,3-dion		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	Dichlon (ISO) 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	Chlordecon (ISO) Decachlor-pentacyclo[5,2,1,0 <sup>2,6</sup> ,0 <sup>3,9</sup> ,0 <sup>5,8</sup> ] decan-4-on		205-601-3	143-50-0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	Metribuzin (ISO) 4-Amino-6-tert-butyl-3-methylthio-1,2,4- triazin-5-on		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	Chloridazon (ISO) 5-Amino-4-chlor-2-phenylpyridazin-3-(2H)-on		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	Chinomethionat (ISO) 6-Methyl-1,3-dithiolo(4,5-b)chinoxalin-2-on		219-455-3	2439-01-2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/ 53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	Triadimefon (ISO) 1-(4-Chlorphenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1,2,4-tria- zol-1-yl)butanon		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
606-044-00-2	2,4,6-Trimethylbenzophenon		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2-)26-60-61		
607-043-00-X	Dicamba (ISO) 3,6-Dichlor-2-methoxybenzoesäure		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-057-00-6	Coumachlor (ISO) 3-(1-(4-Chlorphenyl)-3-oxobutyl)-4-hydroxycumarin		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)37-61		
607-058-00-1	Cumafuryl (ISO) Coumafuryl 4-Hydroxy-2-[3-oxo-1-(2-furyl)butyl]-cumarin		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
607-079-00-6	Kelevan (ISO) Ethyl-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-decachlor-4-hydroxypentacyclo(5,2,1,0 <sup>2,6</sup> ,0 <sup>3,9</sup> ,0 <sup>5,8</sup> )dec-4-yl)-4-oxovalerat		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-097-00-4	Benzol-1,2,4-tricarbonsäure-1,2-anhydrid		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-143-00-3	Valeriansäure		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) 2,3,6-Trichlorbenzoesäure		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	Benazolin (ISO) 4-Chlor-2-oxobenzothiazolin-3-yllessigsäure		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)22-61		
607-156-00-4	Chlorfenson (ISO) 4-Chlorphenyl-4-chlorbenzolsulfonat		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-158-00-5	Natriumsalz von Chloressigsäure Natriumchloracetat		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2-)22-37-45-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
607-159-00-0	Chlorbenzilat (ISO) Ethyl-4,4'-dichlorbenzilat		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
607-176-00-3	Gemisch aus: $\alpha$ -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyl- $\omega$ -hydroxypoly(oxyethylen); $\alpha$ -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyl- $\omega$ -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionyloxy(oxyethylen)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-188-00-9	Hydrogennatrium-N-carboxylatoethyl-N-octadec-9-enylmaleamat		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24/37-61		
607-209-00-1	Gemisch aus: O,O-di(1-Methylethyl)trithio-bis-thioformat; O,O-di(1-Methylethyl)tetrathio-bis-thioformat; O,O-di(1-Methylethyl)pentathio-bis-thioformat		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
607-213-00-3	Ethyl-3,3-bis[(1,1-dimethylpropyl)peroxy]butyrat		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2-)3/7-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-Ethoxyethyl-2-[4-(2,6-dihydro-2,6-dioxo-7-phenyl-1,5-dioxaindacen-3-yl)phenoxy]acetat		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
607-243-00-7	Dicamba-Natrium [1] Dicamba-diethanolamin [2] Dicamba-ethanolamin [3] Natrium-3,6-dichlor-o-anisat [1] 3,6-Dichlor-o-anissäure, Verbindung mit 2,2'-Iminodiethanol (1:1) [2] 3,6-Dichlor-o-anissäure, Verbindung mit 2-Aminoethanol (1:1) [3]		217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]	1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-248-00-4	Naptalam-Natrium		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
607-249-00-X	(1-Methyl-1,2-ethandiy1)bis[oxy(methyl-2,1-ethandiy1)diacrylat TPGDA		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	C ≥ 10%: Xi; R36/37/38-43 1% ≤ C < 10%: Xi; R43	
607-252-00-6	lambda-Cyhalothrin (ISO)		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2-)28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	Fluroxypyr (ISO)		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	Acrylnitril	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 20%: T; R45-23/24/25-37/38-41-43 10% ≤ C < 20%: T; R45-23/24/25-41-43 5% ≤ C < 10%: T; R45-23/24/25-36-43 1% ≤ C < 5%: T; R45-23/24/25-43 0,2% ≤ C < 1%: T; R45-20/21/22 0,1% ≤ C < 0,2%: T; R45	
608-016-00-5	1,4-Dicyano-2,3,5,6-tetrachlorbenzol		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
609-030-00-4	Dinoterb (ISO) 2-tert-Butyl-4,6-dinitrophenol	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	nitrofen (ISO) 2,4-Dichlorphenyl-4-nitrophenylether	E	217-406-0	1836-75-5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	Tecnazen (ISO) 1,2,4,5-Tetrachlor-3-nitrobenzol		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
611-008-00-4	4-Aminoazobenzol		200-453-6	60-09-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	Trilithium-1-hydroxy-7-(3-sulfonatoanilino)-2-[3-methyl-4-[2-methoxy-4-(3-sulfonatophenylazo)phenylazo]phenylazo]naphthalin-3-sulfonat		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	4,4'-(4-Iminocyclohexa-2,5-dienylidenmethylendianilinhydrochlorid C.I. Basic Red 9		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-Methoxy-anilin <i>o</i> -Anisidin	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	Benzidin 4,4'-Diaminobiphenyl	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25%: T; R45-22 0,01% ≤ C < 25%: T; R45	
612-051-00-1	4,4'-Diaminodiphenylmethan	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/ 21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	Salze von 4,4'-Bi- <i>o</i> -toluidin Salze von 3,3'-Dimethylbenzidin	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-Methyl- <i>m</i> -phenylendiamin Toluylen-2,4-diamin	E	202-453-1	95-80-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-Piperazin-1-ylethylamin		205-411-0	140-31-8	Xn, R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
612-111-00-7	2-Methyl- <i>m</i> -phenylendiamin Toluylen-2,6-diamin		212-513-9	823-40-5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2-)24-36/37-61		
612-125-00-3	2-Methyl- <i>p</i> -phenylendiamin Toluylen-2,5-diamin		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2-)24-37-45-61		
612-144-00-7	Flumetralin (ISO)		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
612-151-00-5	Diaminotoluol	E	246-910-3	25376-45-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	Morfamquat (ISO) 1,1'-Bis(3,5-dimethylmorpholinocarbonyl- methyl)-4,4'-bipyridiliumion		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-031-00-5	Symclosen		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2-)8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-Phenyl-1,3,5-triazin-2,4-diyldiamin		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
613-042-00-5	Imazalil (ISO) 1-[2-(Allyloxy)-2-(2,4-dichlorphenyl)ethyl]- 1H-imidazol		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
613-043-00-0	Imazalilsulfat (ISO) 1-[2-(Allyloxy)ethyl-2-(2,4-dichlorphenyl)- 1H-imidazoliumhydrogensulfat [1] (±)-1-[2-(Allyloxy)ethyl-2-(2,4-dichlorphe- nyl)]-1H-imidazoliumhydrogensulfat [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
613-066-00-6	Terbumeton (ISO) 2- <i>tert</i> -Butylamino-4-ethylamino-6-methoxy-1,3,5-triazin		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
613-091-00-2	Morfamquatdichlorid [1] Morfamquatsulfat [2]		225-062-8 [1]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-098-00-0	1-Octylpyrrolidin-2-on		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	Hexaconazol (ISO)		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-131-00-9	Pyroquilon (ISO)		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
613-134-00-5	Myclobutanil (ISO)		—	88671-89-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2-)36/37-46-61		
613-137-00-1	Methabenzthiazuron (ISO)		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	Metsulfuronmethyl		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	Nicotin (ISO)		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
614-006-00-1	Brucin		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
614-007-00-7	Brucinsulfat [1] Brucinnitrat [2] Strychnidin-10-on, 2,3-Dimethoxy-, Mono[(R)-1-methylheptyl-1,2-benzoldicarboxylat] [3] Strychnidin-10-on, 2,3-Dimethoxy-, Verbindung mit (S)-Mono(1-methylheptyl-1,2-benzoldicarboxylat(1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		
615-006-00-4	2-Methyl- <i>m</i> -phenylendiisocyanat [1] 4-Methyl- <i>m</i> -phenylendiisocyanat [2] <i>m</i> -Tolylidendiisocyanat [3] 2,6-Diisocyanat-toluol [1] 2,4-Diisocyanat-toluol [2] 2,6-TDI [1] 2,4-TDI [2]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C ≥ 20%: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7% ≤ C < 20%: T+; R26-40-42/43 1% ≤ C < 7%: T; R23-40-42/43 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20-42	2
616-010-00-9	Chloramin T (Natriumsalz) Tosylchloramidnatrium		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2-)7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	Pyracarbolid (ISO)		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	Cymoxanil 2-Cyan-N-[(ethylamino)carbonyl]-2-(methoxyimino)acetamid		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
617-004-00-9	1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthylhydroperoxid		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-)3/7-14-26 -36/37/39-45-60-61	C ≥ 25%: C; R22-34 10% ≤ C < 25%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	Bis(α,α-dimethylbenzyl)peroxid		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	Dibenzoylperoxid		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi R: 2-36-43 S: (2-)3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	Chlordimeform (ISO) N <sup>2</sup> -(4-Chlor-o-tolyl)-N <sup>1</sup> ,N <sup>1</sup> -dimethylformamidin		228-200-5	6164-98-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
650-008-00-9	Drazoxolon (ISO) 4-(2-Chlorphenylhydrazono)-3-methyl-5-isoxazolon		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	Chlordimeformhydrochlorid N'-(4-Chlor-o-tolyl)-N,N-dimethylformamidinmonohydrochlorid		243-269-1	19750-95-9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
650-033-00-5	Esfenvalerat (ISO)		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2-)24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	Triasulfuron (ISO)		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

## ANHANG 1D

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
006-090-00-8	2-(3-Iodprop-2-yn-1-yloxy)ethylphenylcarbamate		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
014-016-00-0	Gemisch aus: 1,3-Dihex-5-en-1-yl-1,1,3,3-tetramethyldisiloxan; 1,3-Dihex-n-5-en-1-yl-1,1,3,3-tetramethyldisiloxan		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	Calcium-P,P'-(1-hydroxyethylen)bis(hydrogenphosphonat)dihydrate		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Gemisch aus: Thiobis(4,1-phenylen)-S,S',S'-tetraphenyldisulfoniumbischexafluorphosphat; Diphenyl(4-phenylthiophenyl)sulfoniumhexafluorphosphat		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-Bis(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenoxy)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-diphosphaspiro[5.5]undecan		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	3-(Hydroxyphenylphosphinyl)propansäure		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601-050-00-1	Benzol, C <sub>10-13</sub> -Alkylderivate		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-Phenylbut-1-en		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
602-083-00-4	Diphenylether, Pentabromderivat Pentabromdiphenylether		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-Dichlor-1-fluorethan		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(Phenylmethoxy)naphthalin		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
603-129-00-6	1-Tert-butoxypropan-2-ol		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603-130-00-1	Isomergemisch aus: $\alpha$ -((Dimethyl)biphenyl)- $\omega$ -hydroxypoly(oxyethylen)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)39-61		
603-131-00-7	Gemisch (3:1) aus: 1-Desoxy-1-[methyl-(1-oxododecyl)amino]-D-glucitol; 1-Desoxy-1-[methyl-(1-oxotetradecyl)amino]-D-glucitol		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-132-00-2	2-Hydroxymethyl-9-methyl-6-(1-methylethyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]decan		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61		
603-133-00-8	Gemisch aus: 3-[(4-Amino-2-chlor-5-nitrophenyl)amino]propan-1,2-diol; 3,3'-(2-Chloro-5-nitro-1,4-phenylendiimino)bis(propan-1,2-diol)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-36-61		
603-134-00-3	Gemisch aus substituierten Dodecyl- und/oder Tetradecyldiphenylether. Die Substanz wird mittels der Friedel Crafts Reaktion hergestellt. Der Katalysator wurde vom Reaktionsprodukt entfernt. Die Diphenylether sind substituiert mit C1-C10-Alkylgruppen. Die Alkylgruppen sind willkürlich zwischen C1 und C6 gebunden. Lineare C12 und C14, 50/50 verwendet		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	Bis[[2,2',2''-nitrilotris(ethanolato)]-1-N,O]bis[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]-titan		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
603-136-00-4	3-((4-(Bis(2-hydroxyethyl)amino)-2-nitrophenyl)amino)-1-propanol		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
603-137-00-X	Gemisch aus: 1-Desoxy-1-[methyl-(1-oxohexadecyl)amino]-D-glucitol; 1-Desoxy-1-[methyl-(1-oxooctadecyl)amino]-D-glucitol		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-Dimethyl-3-hydroxypropyl)toluol		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
604-050-00-X	4-Chlor- <i>o</i> -kresol		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25%: T; C; R23-35 10% ≤ C < 25%: C; R20-35 5% ≤ C < 10%: C; R20-34 3% ≤ C < 5%: Xn; R20-36/37/38 1% ≤ C < 3%: Xi; R36/37/38	
604-051-00-5	3,5-Bis((3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxy)benzyl)-2,4,6-trimethylphenol		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-Methylenbis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-teramethylbutyl)phenol)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-Methyl-4-(1,1-dimethylethyl)-6-(1-methylpentadecyl)-phenol		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
604-054-00-1	Gemisch aus: 2-Methoxy-4-(tetrahydro-4-methylen-2H-pyran-2-yl)-phenol; 4-(3,6-Dihydro-4-methyl-2H-pyran-2-yl)-2-methoxyphenol		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-((3,5',5,5'-Tetramethyl-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl)-bis(oxy-methylen))-bis-oxiran		413-900-7	85954-11-6	Muta.Cat.3; R40	Xn R: 40 S: (2-)22-36-37		
605-027-00-7	Gemisch aus: 3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-4,7-methano-1H-inden-6-carboxaldehyd; 3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-4,7-methano-1H-inden-5-carboxaldehyd		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
606-051-00-0	4-Pentylcyclohexanon		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-Dibutylamino)-2-hydroxy-2'-carboxybenzophenon		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	Fluoroxypyr-meptyl (ISO) [1] Fluoroxypyr-butometyl (ISO) [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
607-273-00-0	Ammonium-7-(2,6-dimethyl-8-(2,2-dimethylbutyryloxy)-1,2,6,7,8,8a-hexahydro-1-naphthyl)-3,5-dihydroxyheptanoat		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	2-(N-benzyl-N-methylamino)ethyl-3-amino-2-butenaoat		405-350-1	54527-73-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-275-00-1	Natriumbenzoyloxybenzol-4-sulfonat		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-276-00-7	Bis[(1-methylimidazol)-(2-ethyl-hexanoat)], Zinkkomplex		405-635-0	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-277-00-2	Gemisch aus: 2-(Hexylthio)ethylaminhydrochlorid; Natriumpropionat		405-720-2	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-278-00-8	Isomerengemisch aus: Natriumphenenethylnaphthalinsulfonat; Natriumnaphthylethylbenzosulfonat		405-760-0	—	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-279-00-3	Gemisch aus: n-Octadecylaminodiethylbis(hydrogenmaleat); n-Octadecylaminodiethylhydrogenmaleathydrogenphthalat		405-960-8	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-280-00-9	Natrium-4-chlor-1-hydroxybutan-1-sulfonat		406-190-5	54322-20-2	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)22-26-36/37		
607-281-00-4	Gemisch aus verzweigten und linearen C7-C9-Alkyl-3-[3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]propionaten		407-000-3	127519-17-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	2-Acetoxyethyl-4-benzyloxybut-1-ylacetat		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
607-283-00-5	E-Ethyl-4-oxo-4-phenylcrotonat		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	Gemisch aus: Natrium/Lithium 3,3'-[1,4-phenylenbis(carbonylimino-3,1-propandiylimino)]bis(10-amino-6,13-dichlor)-4,11-triphenodioxazindisulfonat		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Gemisch aus: Hydrogen-, Natrium-, Kalium-7-(((3-aminophenyl)sulfonyl)amino)-naphthalin-1,3-disulfonat		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-286-00-1	Gemisch aus: Natrium/Kalium-7-[[[3-[[4-((2-hydroxy-naphthyl)azo)phenyl]azo]phenyl]sulfonyl]amino]naphthalin-1,3-disulfonat		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-287-00-7	O'-Methyl-O-(1-methyl-2-methacryloyloxyethyl)-1,2,3,6-tetrahydrophthalat		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	Tetranatrium-(c-(3-(1-(3-(e-6-dichlor-5-cyanopyrimidin-f-yl(methyl)amino)propyl)-1,6-dihydro-2-hydroxy-4-methyl-6-oxo-3-pyridylazo)-4-sulfonatophenylsulfamoyl)phtalocyanin-a,b,d-trisulfonato(6-))nickelat (II) (a: 1,2,3 oder 4, b: 8,9,10 oder 11, c: 15,16,17 oder 18, d: 22,23,24 oder 25, e,f = 2 oder 4)		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37-61		
607-289-00-8	3-(3-(4-(2,4-Bis(1,1-dimethylpropyl)phenoxy)butylaminocarbonyl-4-hydroxy-1-naphthalinyl)thio)propansäure		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Gemisch (Verhältnis nicht bekannt) aus: Ammonium-1-C14-C18-alkyloxycarbonyl-2-(3-allyloxy-2-hydroxypropoxycarbonyl)ethan-1-sulfonat; Ammonium-2-C14-C18-alkyloxycarbonyl-1-(3-allyloxy-2-hydroxypropoxycarbonyl)ethan-1-sulfonat		410-540-2	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-291-00-9	Dodecyl- $\omega$ -(C5/C6-cycloalkyl)alkylcarboxylat		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
607-292-00-4	Gemisch aus: [1-(Methoxymethyl)-2-(C12-alkoxy)-ethoxy]essigsäure; [1-(Methoxymethyl)-2-(C14-alkoxy)-ethoxy]essigsäure		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-293-00-X	Gemisch aus: N-Aminoethylpiperazonium-mono-2,4,6-trimethylnonyldiphenyletherdi-sulfonat; N-Aminoethylpiperazonium-di-2,4,6-trimethylnonyldiphenyletherdi-sulfonat		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
607-294-00-5	Natrium-2-benzoyloxy-1-hydroxyethan-sulfonat		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-295-00-0	Gemisch aus: Tetranatrium-phosphonethan-1,2-dicarboxylat; Hexanatrium-phosphonbutan-1,2,3,4-tetracarboxylat		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-296-00-6	Gemisch aus: Tetraester von Pentaerythriol mit Heptansäure und 2-Ethylhexansäure		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	(E-E)-3,3'-(1,4-Phenylendimethyliden)bis(2-oxobornan-10-sulfonsäure)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-298-00-7	2-(Trimethylammonium)ethoxycarboxybenzol-4-sulfonat		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-36/37		
607-299-00-2	Methyl-3-(acetylthio)-2-methyl-propanat		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-300-00-6	Trinatrium-[2-(5-chlor-2,6-difluorpyrimidin-4-ylamino)-5-(b-sulfamoyl-c,d-sulfonatophthalocyanin-a-yl-K4,N29,N30,N31,N32-sulfonylamino)benzoato(5-)]cuprat(II) wo a = 1, 2, 3 oder 4 b = 8, 9, 10 oder 11 c = 15, 16, 17 oder 18 d = 22, 23, 24 oder 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-301-00-1	Gemisch aus: Dodecansäure; Poly(1-7)lactatester von Dodecansäure		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
607-302-00-7	Gemisch aus: Tetradecansäure; Poly(1-7)lactat-ester von Tetradecansäure		411-910-6	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	1-Cyclopropyl-6,7-difluor-1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-carbonsäure		413-760-7	93107-30-3	Repr. Cat.3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-Chlorphenyl)-2-phenyl-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl]butannitril		406-140-2	114369-43-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-Butyl-N-phenethylamino)phenyl)ethylen-1,1,2-tricarbonitril		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-Nitro-4,5-bis(benzyloxy)phenylacetonitril		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	Hydrazin-tri-nitromethan		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-Brom-1-(2-furyl)-2-nitroethylen		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	2:1:1 Gemisch aus: Trinatrium-N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6-[2-amino-4-(oder 6)-hydroxy-(oder 4-amino-2-hydroxy)phenylazo]-6''-(1-carbaniloyl-2-hydroxyprop-1-enylazo)-5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonatobis(naphthalin-2,1'-azobenzol-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromat; Trinatrium N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis(1-carbaniloyl-2-hydroxyprop-1-enylazo)-5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonato-bis(naphthalin-2,1'-azobenzol-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromat; Trinatrium-N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-bis[2-amino-4-(oder 6)-hydroxy-(oder 4-amino-2-hydroxy)phenylazo]5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonato-bis(naphthalin-2,1'-azobenzol-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromat		402-850-1	—	Xi; R41 R2-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
611-044-00-0	Gemisch aus: Tert-alkyl(C12-C14)ammonium-bis[1-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]-chromat(1-); Tert-alkyl(C12-C14)ammonium-bis[1-[(2-hydroxy-4-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]-chromat(1-); Tert-alkyl(C12-C14)ammonium-bis[1-[[5-(1,1-dimethylpropyl)-2-hydroxy-3-nitrophenyl]azo]-2-naphthalenolato(2-)]-chromat(1-); Tert-alkyl(C12-C14)ammonium-[[1-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]-[1-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]]-chromat(1-); Tert-alkyl(C12-C14)ammonium-[[1-[[5-(1,1-dimethylpropyl)-2-hydroxy-3-nitrophenyl]azo]-2-naphthalenolato(2-)]-[1-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)azo]-2-naphthalenolato(2-)]]-chromat(1-); C12-14-tert-Alkylammonium((1-(4(oder 5)-nitro-2-oxidophenylazo)-2-naphtholato)(1-(3-nitro-2-oxido-5-pentylphenylazo)-2-naphtholato))chromat(1-)		403-720-7	117527-94-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-Acetoxybutyl)-N-ethyl]amino-2-methylphenylazo]-3-acetyl-5-nitrothiophen		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-Diamino-2-methylazobenzol		407-590-2	43151-99-1	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R50-53	T; N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	Gemisch (1:1) aus: 2-[[4-[N-Ethyl-N-(2-acetoxyethyl)amino]phenyl]azo]-5,6-dichlorbenzothiazol; 2-[[4-[N-Ethyl-N-(2-acetoxyethyl)amino]phenyl]azo]-6,7-dichlorbenzothiazol		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	Gemisch (1:1) aus: 2-[[4-[Bis(2-acetoxyethyl)amino]phenyl]azo]-5,6-dichlorbenzothiazol; 2-[[4-[Bis(2-acetoxyethyl)amino]phenyl]azo]-6,7-dichlorbenzothiazol		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
611-049-00-8	7-[4-(3-Diethylaminopropylamino)-6-(3-diethylammoniopropylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino]-4-hydroxy-3-(4-phenylazophenylazo)-naphthalen-2-sulfonat, Essigsäure, Milchsäure (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
611-051-00-9	2-(4-(N-Ethyl-N-(2-hydroxyethyl)amino-2-methylphenyl)azo-6-methoxy-3-methylbenzothiazoliumchlorid		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	Mononatrium-aqua-[5-[[2,4-dihydroxy-5-[(2-hydroxy-3,5-dinitrophenyl)azo]phenyl]azo]-2-naphthalensulfonat], Eisenkomplex		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Gemisch aus: Trihexadecylmethylammoniumchlorid; Dihexadecyldimethylammoniumchlorid		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
612-157-00-8	(Z)-1-Benzo[b]thien-2-ylethanonoximhydrochlorid		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	Gemisch aus: Bis(5-dodecyl-2-hydroxybenzaldoximat)-kupfer (II). Die C12-Alkylgruppe ist verzweigt; 4-Dodecylsalicylaldoxim		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Reaktionsprodukte von: Trimethylhexamethylen-diamin (ein Gemisch aus 2,2,4-Trimethyl-1,6-hexandiamin und 2,4,4-Trimethyl-1,6-hexandiamin, in EINECS enthalten), Epoxide 8 (Mono[(C10-C16-alkyloxy)methyl]oxiran Derivate) und p-Toluensulfonsäure		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-tert-Butyl-5-(4-tert-butylbenzylthio)-4-chlorpyridazin-3(2H)-on		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(Piperazin-1,4-diyl)dipropyl]bis(1H-benzimidazo[2,1-b]benzo[l,m,n][3,8]phenanthrolin-1,3,6-trion		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
613-151-00-8	1-(3-Mesyloxy-5-trityloxymethyl-2-D-threofuryl)thymine		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	Phenyl-N-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamate		406-600-2	89392-03-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-Trichlorpyridin		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-Amino-4-chlor-6-methoxypyrimidin		410-050-9	5734-64-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613-155-00-X	5-Chlor-2,3-difluorpyridin		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2-)23-36-61		
613-156-00-5	2-Butyl-4-chlor-5-formylimidazol		410-260-0	83857-96-9	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-157-00-0	2,4-Diamino-5-methoxymethylpyrimidin		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi; R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2-)22-26-36		
613-158-00-6	2,3-Dichlor-5-trifluormethyl-pyridin		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-Dimethylethyl)phenyl]-ethoxy]chinazolin		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N; R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
613-160-00-7	(1S)-2-Methyl-2,5-diazobicyclo[2.2.1]heptandihydrobromid		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615-022-00-1	Methyl-3-isocyanatosulfonyl-2-thiophencarboxylat		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2-)22-30-35-36/37		

Index-Nr.	Chemischer Name	Anmerkungen zu Stoffen	EG-Nr.	CAS-Nr.	Einstufung	Kennzeichnung	Konzentrationsgrenzen	Anmerkungen zu Zubereitungen
615-023-00-7	2-(Isocyanatosulfonylmethyl)benzoesäuremethylester		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. Cat.3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2-)23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-dichlor-4-ethyl-2-hydroxyphenyl)-2-(3-pentadecylphenoxy)-butanamid		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-Chlor-3-cyano-5-formyl-2-thienylazo)-5'-diethylamino-2-methoxyacetanilid		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-Chlor-7-methylpyrazolo(1,5-b)-1,2,4-triazol-4-yl)propyl)-2-(2,4-di-tert-pentylphenoxy)octanamid		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	Gemisch aus: 2,2',2'',2'''-(Ethylendinitrilotetrakis-N,N-di(C16)alkylacetamid; 2,2',2'',2'''-(Ethylendinitrilotetrakis-N,N-di(C18)alkylacetamid		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616-048-00-6	3'-Trifluormethylisobutyranilid		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-bis(1,1-Dimethylethyl)phenoxy)-N-(3,5-dichlor-4-ethyl-2-hydroxyphenyl)-hexanamid		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-Dichlor-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluorpropoxy)-phenyl-aminocarbonyl]-2,6-difluorbenzamid		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
616-051-00-2	Gemisch aus: 2,4 -Bis(N'-(4-methylphenyl)-ureido)-toluol; 2,6 -Bis(N'-(4-methylphenyl)-ureido)-toluol		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	Bis(4-methylbenzoyl)peroxid		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2-)7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	Cyproconazol (ISO) (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-Chlorphenyl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol		—	94361-06-5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2-)36/37-60-61		

## ANHANG 2

**R 66**

IT: L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle.

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DE-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die SV-Sprachfassung)

---

## ANHANG 3A

**S 23**

FR: Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant].

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DE-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die IT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die SV-Sprachfassung)

**S 26**

DE: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die IT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die SV-Sprachfassung)

**S 56**

DE: Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die SV-Sprachfassung)

—

## ANHANG 3B

**S 27/28**

DE: Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben).

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die IT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die SV-Sprachfassung)

**S 29/56**

ES: No tirar los residuos por el desagüe; elimínese esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

DE: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Do not empty into drains, dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Non gettare i residui nelle fognature; smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

NL: Afval niet in de gootsteen werpen; deze stof en de verpakking naar een inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval brengen.

SV: Töm ej i avloppet, lämna detta material och dess behållare till insamlingsställe för farligt avfall.

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

---

## ANHANG 4A

**„B.10. MUTAGENITÄT — IN-VITRO-TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN IN SÄUGETIERZELLEN****1. METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 473, In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

**1.1. EINLEITUNG**

Der In-Vitro-Test auf Chromosomenaberrationen dient zum Nachweis von Agenzien, die in Säugerzellkulturen strukturelle Chromosomenaberrationen auslösen. (1) (2) (3). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Eine Zunahme der Polyploidie ist möglicherweise ein Hinweis darauf, daß ein chemischer Stoff numerische Aberrationen hervorzurufen vermag. Allerdings ist diese Methode nicht zur Messung numerischer Aberrationen bestimmt und wird daher auch nicht routinemäßig dafür eingesetzt. Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, daß Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge, die Änderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen somatischer Zellen auslösen, an der Entstehung von Krebs bei Menschen und Versuchstieren beteiligt sind.

Beim In-vitro-Chromosomenaberrationstest können Kulturen von etablierten Zelllinien und Zellstämmen oder primäre Zellkulturen zum Einsatz kommen. Die verwendeten Zellen werden unter dem Gesichtspunkt der Wachstumsfähigkeit in Kultur, der Karyotypstabilität, der Chromosomenzahl, der Chromosomenvielfalt und der spontanen Häufigkeit von Chromosomenaberrationen ausgewählt.

In vitro durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem System lassen sich aber die In-vivo-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, bei denen positive Ergebnisse auftreten, die nicht die intrinsische Mutagenität widerspiegeln und möglicherweise aus Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolarität oder hochgradiger Zytotoxizität herrühren (4) (5).

Dieser Test dient zum Nachweis möglicher Mutagene und Kanzerogene in Säugetierzellen. Viele chemische Verbindungen, bei denen der Test positiv ausfällt, haben eine kanzerogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation zwischen Test und Kanzerogenität. Die Korrelation ist von der chemischen Klasse abhängig, und es gibt zunehmende Anzeichen dafür, daß bestimmte Kanzerogene durch diesen Test nicht nachweisbar sind, da ihre Wirkung anscheinend auf anderen Mechanismen als einer direkten DNA-Schädigung beruht.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. DEFINITIONEN**

**Chromatidentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion zwischen Chromatiden.

**Chromosomentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

**Endoreduplikation:** Prozeß, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft, sondern in eine weitere S-Phase eintritt. Das Ergebnis sind Chromosomen mit 4, 8, 16, ... Chromatiden.

**Gap:** achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatide(n).

**Mitoseindex:** Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in Metaphase befinden; Gradmesser für den Vermehrungsgrad dieser Population.

**Numerische Aberration:** Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Zellen charakteristisch ist.

**Polyploidie:** Vorhandensein von mehr als zwei haploiden Chromosomensätzen (n) (z. B. 3n, 4n usw.).

**Strukturelle Aberration:** Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intra-chromosomalen oder reziproken Translokationen.

### 1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Behandlung der Zellkulturen mit der Prüfsubstanz erfolgt mit und ohne Zusatz eines Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Nach Ablauf eines vorher festgelegten Zeitraums werden die Zellkulturen mit einem Spindelgift (z. B. Colcemid® oder Colchicin) behandelt, gewonnen und gefärbt, woraufhin die Metaphasezellen mikroskopisch auf Chromosomenaberrationen untersucht werden.

### 1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.4.1. Vorbereitungen

##### 1.4.1.1. Zellen

Es können verschiedene Zelllinien, Zellstämme oder primäre Zellkulturen, auch menschliche Zellen, Verwendung finden (z. B. Fibroblasten des chinesischen Hamsters, Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen oder anderen Säugern).

##### 1.4.1.2. Kulturmedien und Inkubationsbedingungen

Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu verwenden. Etablierte Zelllinien und -stämme sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und Mycoplasmaverunreinigung zu überprüfen und sollten bei Verunreinigung nicht herangezogen werden. Die normale Dauer des Zellzyklus bei den gewählten Zellen und Inkubationsbedingungen sollte bekannt sein.

##### 1.4.1.3. Vorbereitung der Kulturen

Etablierte Zelllinien und -stämme: die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen, im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, daß die Kultur vor dem Zeitpunkt der Gewinnung nicht konfluent wird, und bei 37°C inkubiert.

Lymphozyten: mit einem Antikoagulans (z. B. Heparin) behandeltes Vollblut oder separierte Lymphozyten von gesunden Probanden werden dem Kulturmedium beigegeben, das ein Mitogen (z. B. Phytohämagglutinin) enthält, und bei 37°C inkubiert.

##### 1.4.1.4. Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Fremdstoff-Metabolisierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) oder einem Gemisch aus Phenobarbiton und  $\beta$ -Naphthoflavon (10) (11) (12) vorbehandelt wurde.

Die post-mitochondriale Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 10% v/v verwendet. Der Zustand des Stoffwechselsystems ist möglicherweise von der geprüften chemischen Klasse abhängig. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der post-mitochondrialen Fraktion zu verwenden.

Eine Reihe von Entwicklungen, darunter die Herstellung gentechnisch veränderter Zelllinien zur Expression spezifischer Aktivierungsenzyme, eröffnen vielleicht die Möglichkeit für eine endogene Aktivierung. Die Wahl der verwendeten Zelllinien sollte wissenschaftlich begründet sein (z. B. durch die Relevanz des Isoenzym Cytochrom P450 für den Stoffwechsel der Prüfsubstanz).

#### 1.4.1.5. Prüfsubstanz/Zubereitung

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

#### 1.4.2. Prüfbedingungen

##### 1.4.2.1. Lösungsmittel/Vehikel

Die Lösungsmittel/Vehikel sollten nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und sie sollten mit dem Überleben der Zellen und der S9-Aktivität kompatibel sein. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein. Das Wasser läßt sich durch Zusatz eines Molekularsiebs entfernen.

##### 1.4.2.2. Expositionskonzentration

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität, die Löslichkeit im Versuchssystem und die Veränderungen des pH-Wertes oder der Osmolalität.

Die Zytotoxizität sollte im Hauptversuch mit und ohne Stoffwechsellaktivierung unter Verwendung eines geeigneten Indikators für Zellintegrität und -wachstum wie Konfluenzgrad, Anzahl der lebensfähigen Zellen oder Mitoseindex bestimmt werden. Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Löslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen.

Es sind mindestens drei analysierbare Konzentrationen zu verwenden. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten diese Konzentrationen den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Im Normalfall bedeutet dies, daß sich die Konzentrationen maximal um einen Faktor zwischen 2 und  $\sqrt{10}$  unterscheiden. Zum Zeitpunkt der Gewinnung sollte die höchste Konzentration eine deutliche Verminderung des Konfluenzgrades, der Anzahl der Zellen oder des Mitoseindex (jeweils um mehr als 50%) erkennen lassen. Der Mitoseindex ist nur ein indirekter Gradmesser für zytotoxische/zytostatische Wirkungen und hängt davon ab, wieviel Zeit seit der Behandlung vergangen ist. Allerdings ist der Mitoseindex für Suspensionskulturen vertretbar, bei denen andere Methoden zur Toxizitätsbestimmung möglicherweise umständlich oder unpraktisch sind. Informationen über die Zellzykluskinetik, z. B. die mittlere Generationszeit (MGZ), könnten als zusätzliche Angaben herangezogen werden. Bei der MGZ handelt es sich jedoch um einen Gesamtdurchschnittswert, der nicht immer das verspätete Auftreten von Teilpopulationen erkennen läßt, und schon ein leichter Anstieg der mittleren Generationszeit kann eine erhebliche Verzögerung des Zeitpunkts der optimalen Ausbeute an Aberrationen zur Folge haben.

Bei relativ nichtzytotoxischen Substanzen sollte die Höchstkonzentration bei Versuchen 5 µl/ml, 5 mg/ml oder 0.01 M betragen, je nachdem, welcher Wert am niedrigsten ist.

Im Falle relativ unlöslicher Substanzen, die bei Konzentrationen unterhalb der unlöslichen Konzentration nicht toxisch sind, sollte die höchste verwendete Dosis eine Konzentration oberhalb der Löslichkeitsgrenze im Endmedium nach Ablauf der Behandlungszeit sein. In bestimmten Fällen (z. B. wenn die Toxizität nur bei einer Konzentration auftritt, die über der geringsten unlöslichen Konzentration liegt) ist es ratsam, die Prüfung bei mehr als einer Konzentration mit sichtbarer Ausfällung vorzunehmen. Möglicherweise ist es sinnvoll, die Löslichkeit zum Anfang und Abschluß der Behandlung zu bestimmen, da sich die Löslichkeit im Versuchssystem während der Exposition aufgrund des Vorhandenseins von Zellen, S9, Serum usw. verändern kann. Die Unlöslichkeit ist mit dem bloßen Auge erkennbar. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

##### 1.4.2.3. Negativ- und Positivkontrollen

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit und ohne Zusatz eines Stoffwechsellaktivierungssystems anzulegen. Bei Stoffwechsellaktivierung sollte die Positivkontrollsubstanz jene Substanz sein, die zur mutagenen Reaktion eine Aktivierung benötigt.

Zur Positivkontrolle sollte ein bekanntes Clastogen in Expositionskonzentrationen verwendet werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems demonstrieren läßt.

Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

Stoffwechselaktivierungsstatus	Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
Ohne exogene Stoffwechselaktivierung	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Mit exogener Stoffwechselaktivierung	Benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
	Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	

Es können auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen verwendet werden. Gegebenenfalls sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören wie der Prüfstoff.

Bei jedem Gewinnungszeitpunkt sind Negativkontrollen hinzuzuziehen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel oder Vehikel enthält und die auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

### 1.4.3. Verfahren

#### 1.4.3.1. Behandlung mit der Prüfsubstanz

Proliferierende Zellen werden mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Behandlung der Lymphozyten sollte ca. 48 Stunden nach der mitogenen Stimulierung beginnen.

1.4.3.2. Im Normalfall sollten für jede Konzentration zwei parallele Kulturen verwendet werden, die auch nachdrücklich für Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollkulturen empfohlen werden. Läßt sich anhand von historischen Daten nachweisen, daß zwischen den Zweifachkulturen nur eine minimale Abweichung besteht (13) (14), so ist ggf. die Verwendung von Einfachkulturen für jede Konzentration vertretbar.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z. B. in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (15) (16).

#### 1.4.3.3. Zeitpunkt der Gewinnung der Kulturen

Beim ersten Versuch sollten die Zellen 3 bis 6 Stunden lang mit und ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt werden, wobei eine Aufarbeitung nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus nach Behandlungsbeginn entspricht (12). Ergibt dieses Protokoll sowohl mit als auch ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems negative Ergebnisse, so sollte ein weiterer Versuch ohne Aktivierung vorgenommen werden, bei dem eine kontinuierliche Behandlung bis hin zur Probenahme nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht. Bestimmte Stoffe sind möglicherweise leichter nachweisbar, wenn der Zeitraum für die Behandlung/Probenahme mehr als die 1,5fache Dauer des normalen Zellzyklus beträgt. Negative Befunde bei Zusatz eines Metabolisierungssystems bedürfen der Bestätigung durch Einzelfallprüfung. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Befunde nicht für erforderlich gehalten wird, ist eine Begründung anzugeben.

#### 1.4.3.4. Chromosomenpräparation

Die Zellkulturen werden vor der Gewinnung in der Regel ein bis drei Stunden lang mit Colcemid® oder Colchicin behandelt. Für die Chromosomenpräparation wird jede Zellkultur gesondert gewonnen und aufgearbeitet. Zur Chromosomenpräparation gehören die Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung, die Fixierung und Färbung.

#### 1.4.3.5. Analyse

Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die bei allen Zelltypen dem Modalwert  $\pm 2$  entspricht. Es sind mindestens 200 gut gespreitete Metaphasen je Konzentration und Kontrolle zu analysieren und bei Zweifachkulturen gleichmäßig auf diese zu verteilen. Eine Reduzierung dieser Zahl ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird.

Obwohl es bei der Prüfung um den Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen geht, ist das Auftreten von Polyploidie und Endoreduplikation unbedingt zu vermerken.

## 2. DATEN

### 2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Versuchseinheit ist die Zelle, und daher ist der Anteil der Zellen mit struktureller Chromosomenaberration bzw. strukturellen Chromosomenaberrationen zu bewerten. Für die Versuchs- und Kontrollkulturen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Gaps werden getrennt erfaßt und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt.

Zu erfassen sind auch Maßnahmen, die in den Hauptprüfungen auf Aberrationen gleichzeitig zur Bestimmung der Zytotoxizität aller behandelten und Negativkontrollkulturen durchgeführt werden.

Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefaßt werden.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Die Notwendigkeit der Bestätigung negativer Ergebnisse wurde in 1.4.3.3 dargelegt. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen und die Stoffwechselaktivierungsbedingungen.

### 2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine konzentrationsbezogene Zunahme oder reproduzierbare Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (3) (13). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Eine zahlenmäßige Zunahme der polyploiden Zellen deutet möglicherweise darauf hin, daß die Prüfsubstanz mitotische Prozesse zu hemmen und numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag. Eine zahlenmäßige Zunahme der Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (17) (18).

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt in diesem System als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde beim In-vitro-Chromosomenaberrationstest deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz in kultivierten somatischen Säugetierzellen strukturelle Chromosomenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen in kultivierten somatischen Säugetierzellen hervorruft.

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

#### Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

#### Zellen:

- Typ und Herkunft der Zellen;
- Karyotypmerkmale und Eignung des verwendeten Zelltyps;
- ggf. Nichtvorhandensein von Mycoplasma;
- Angaben über die Dauer des Zellzyklus;
- Geschlecht der Blutspender, Vollblut oder separierte Lymphozyten, verwendetes Mitogen;
- ggf. Passagenanzahl;
- ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- Modalwert der Chromosomen.

#### Prüfbedingungen:

- Bezeichnung der Spindelgifte, deren Konzentration und Dauer der Zellexposition;
- Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze, falls vorhanden;
- Medienzusammensetzung, ggf. CO<sub>2</sub>-Konzentration;
- Konzentration der Prüfsubstanz;
- Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfsubstanz;
- Inkubationstemperatur;
- Inkubationszeit;
- Behandlungsdauer;
- ggf. Zelldichte bei der Beimpfung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien;
- Positiv- und Negativkontrollen;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers;
- Kriterien für die Auswertung der Aberrationen;

- Anzahl der analysierten Metaphasen;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen, z. B. Konfluenzgrad, Angaben zum Zellzyklus, Zellzahlen, Mitoseindex;
- Ausfällungszeichen;
- Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;
- Begriffsbestimmungen für Aberrationen, einschließlich Lücken;
- Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen mit getrennter Angabe des Chromosomenaberrationstyps für jede behandelte Kultur und Kontrollkultur;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen Mittelwerten und Standardabweichungen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. LITERATURHINWEISE

- (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., Rimpou, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatid 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*, J. 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., Berid, 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., Iven, 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 for 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.
-

## ANHANG 4B

**„B.11. MUTAGENITÄT — IN-VIVO-TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN IN SÄUGETIERKNOCHENMARKZELLEN****1. METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

**1.1. EINLEITUNG**

Der In-Vivo-Test auf Chromosomenaberrationen in Säugetierzellen dient zum Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen, die von der Prüfsubstanz im Knochenmark von Säugetieren, in der Regel Nagetieren, ausgelöst werden (1) (2) (3) (4). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomen- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Eine Zunahme der Polyploidie ist möglicherweise ein Hinweis darauf, daß ein chemischer Stoff numerische Aberrationen hervorzurufen vermag. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagenen sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, daß Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge, die Änderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen auslösen, an der Entstehung von Krebs bei Menschen und in Versuchssystemen beteiligt sind.

Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nagetiere eingesetzt. Zielgewebe ist dabei das Knochenmark, da es sich dabei um ein gefäßreiches Gewebe mit einer Population rasch proliferierender Zellen handelt, die sich leicht isolieren und aufarbeiten lassen. Andere Versuchstiere und Zielgewebe sind nicht Gegenstand dieser Methode.

Dieser Chromosomenaberrationstest ist insbesondere für die Bewertung der mutagenen Eigenschaften von Relevanz, da er die Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht, auch wenn diese bei den einzelnen Spezies und Geweben unterschiedlich sind. Ein In-vivo-Test ist auch für die weitere Untersuchung einer bei In-vitro-Prüfungen festgestellten mutagenen Wirkung von Nutzen.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, daß die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. DEFINITIONEN**

**Chromatidentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion zwischen Chromatiden.

**Chromosomentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

**Endoreduplikation:** Prozeß, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft, sondern in eine weitere S-Phase eintritt. Das Ergebnis sind Chromosomen mit 4, 8, 16 ... Chromatiden.

**Gap:** achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatide(n).

**Numerische Aberration:** Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Zellen charakteristisch ist.

**Polyploidie:** Vorhandensein von mehr als zwei haploiden Chromosomensätzen (n) (z. B. 3n, 4n, usw.).

**Strukturelle Aberration:** Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intra-chromosalen oder reziproken Translokationen.

### 1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz mittels einer geeigneten Expositionsform verabreicht und werden zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin oder Colcemid®) behandelt. Aus den Knochenmarkzellen werden dann Chromosomen präpariert und gefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

### 1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.4.1. **Vorbereitungen**

##### 1.4.1.1. *Versuchstiere*

Gewöhnlich werden Ratten, Mäuse und chinesische Hamster verwendet, doch kommen auch andere geeignete Säugetierarten in Frage. Es sollten gesunde und geschlechtsreife junge Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als  $\pm 20\%$  betragen.

##### 1.4.1.2. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der Allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert um 50-60% anzustreben.

##### 1.4.1.3. *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, daß sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

##### 1.4.1.4. *Vorbereitung der Dosierung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

#### 1.4.2. **Prüfbedingungen**

##### 1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

##### 1.4.2.2. *Kontrollen*

Für jeden Versuch und jedes Geschlecht sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel/Vehikel-)Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der behandelten Gruppen.

Die Positivkontrollen sollten in vivo strukturelle Aberrationen bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, daß die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Probenahme erfolgt. Ggf. könnte eine zusätzliche

Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen vorliegen. Erfolgt bei den Negativkontrollen nur eine einzige Probenahme, so ist dafür die erste Probenahme der günstigste Zeitpunkt. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

## 1.5. VERFAHREN

### 1.5.1. Anzahl und Geschlecht der Tiere

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muß pro Geschlecht mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen. Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, daß zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

### 1.5.2. Behandlungsplan

Die Prüfsubstanzen sind möglichst auf einmal zu verabreichen. Die Gabe kann aber auch in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt. Andere Verabreichungsschemata sollten wissenschaftlich begründet sein.

Wenn die Testsubstanz an einem Tag verabreicht wird, sollte zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten aufgearbeitet werden. Bei Nagern erfolgt die erste Probenahme im Anschluß an die Behandlung nach Ablauf eines Zeitraums, der der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus (der in der Regel 12 bis 18 Std. dauert) entspricht. Da die für die Aufnahme und Metabolisierung der Prüfsubstanz sowie für die Wirkung auf die Zellzykluskinetik benötigte Zeit den optimalen Zeitpunkt für die Feststellung von Chromosomenaberrationen beeinflussen kann, wird empfohlen, 24 Stunden nach der ersten Aufarbeitung eine weitere Aufarbeitung vorzunehmen. Werden Verabreichungsschemata gewählt, die über einen Tag hinausgehen, sollte die Probenahme im Anschluß an die letzte Behandlung nach Ablauf eines Zeitraums erfolgen, der der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht.

Vor der Tötung wird den Tieren intraperitoneal eine geeignete Dosis eines Spindelgiftes (z. B. Colcemid® oder Colchicin) verabreicht. Die Tiere werden dann zu einem geeigneten Zeitpunkt aufgearbeitet. Bei Mäusen beträgt der Zeitabstand ca. 3 bis 5 Stunden, beim chinesischen Hamster ca. 4 bis 5 Stunden. Aus dem Knochenmark werden Zellen gewonnen und auf Chromosomenaberrationen untersucht.

### 1.5.3. Dosierungen

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (5). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Aufarbeitung drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Aufarbeitung muß nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, daß höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität im Knochenmark hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Mitoseindex um mehr als 50%).

### 1.5.4. Limit-Test

Verursacht die Prüfung bei einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Gentoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Bei Studien von längerer Dauer beträgt die Limit-Dosis 2 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von bis zu 14 Tagen und 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von mehr als 14 Tagen. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

### 1.5.5. Verabreichung

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von reizenden oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Minimum zu reduzieren, daß eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

### 1.5.6. Chromosomenpräparation

Unmittelbar nach der Tötung wird das Knochenmark gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und fixiert. Die Zellen werden dann auf Objektträger aufgetropft und gefärbt.

### 1.5.7. Analyse

Bei allen behandelten Tieren (einschließlich der Positivkontrollen) und unbehandelten Tieren der Negativkontrollgruppe ist der Mitoseindex als Gradmesser der Zytotoxizität in mindestens 1 000 Zellen pro Tier zu bestimmen.

Bei jedem Tier sind mindestens 100 Zellen zu analysieren. Eine Reduzierung dieser Zahl ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird. Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die der Zahl  $2n \pm 2$  entspricht.

## 2. DATEN

### 2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier sind die Anzahl der bewerteten Zellen, die Zahl der Aberrationen pro Zelle und der Anteil der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen anzugeben. Für die Versuchs- und Kontrollgruppen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Gaps werden getrennt erfaßt und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt. Gibt es keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Reaktionen der Geschlechter, so können die Daten für beide Geschlechter zur statistischen Analyse zusammengefaßt werden.

## 2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen oder eine eindeutige Zunahme der Anzahl der Zellen mit Aberrationen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (6). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine zahlenmäßige Zunahme der Polyploidie deutet möglicherweise darauf hin, daß die Prüfsubstanz numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag. Eine zahlenmäßige Zunahme der Endoreduplikation ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (7) (8).

Eine Prüfsubstanz, bei denen die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt in diesem System als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde des In-vivo-Chromosomenaberrationstests deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz im Knochenmark der untersuchten Spezies Chromosomenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen im Knochenmark der untersuchten Spezies hervorruft.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in den allgemeinen Blutkreislauf bzw. in das spezifische Zielgewebe gelangen (z. B. systemische Toxizität).

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel:

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe;

Prüfbedingungen:

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;

- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für den Verabreichungsweg;
- ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;
- ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Bezeichnung des Spindelgifts, Konzentration und Behandlungsdauer;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers;
- Kriterien zur Bewertung von Aberrationen;
- Anzahl der analysierten Zellen pro Tier;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Mitoseindex;
- Typ und Anzahl der Aberrationen, für jedes Tier gesondert anzugeben;
- Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen;
- Daten zu historischen Negativkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. LITERATURHINWEISE

- (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., 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, 157—165.

- (3) Richold, M., Chandly, 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 Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.
  - (4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, 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., Alleen, 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. 1363—1364.“
-

## ANHANG 4C

## „B.12. MUTAGENITÄT — IN-VIVO-ERYTHROZYTEN-MIKROKERNTEST BEI SÄUGERN

## 1. METHODE

Die Methode entspricht der OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

## 1.1. EINLEITUNG

Der In-vivo-Mikrokerntest bei Säugern dient zum Nachweis einer von der Prüfsubstanz in den Chromosomen oder im mitotischen Apparat von Erythroblasten hervorgerufenen Schädigung durch Analyse der Erythrozyten aus dem Knochenmark und/oder dem peripheren Blut von Tieren, in der Regel Nagern.

Zweck des Mikrokerntests ist der Nachweis von Substanzen, die zytogenetische Schäden hervorrufen, durch die es zur Bildung von Mikrokernen mit zurückgebliebenen Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen kommt.

Wenn sich ein Knochenmarkerythroblast zu einem polychromatischen Erythrozyten entwickelt, wird der Hauptkern ausgestoßen. Dabei kann aber ein möglicherweise entstandener Mikrokern im ansonsten entkerneten Zytoplasma verbleiben. Die Sichtbarmachung der Mikrokerne wird in diesen Zellen dadurch erleichtert, daß sie keinen Hauptkern aufweisen. Eine Zunahme der Häufigkeit von polychromatischen mikrokernhaltigen Erythrozyten in behandelten Tieren deutet auf die Verursachung einer Chromosomenschädigung hin.

Routinemäßig wird bei diesem Test das Knochenmark von Nagern verwendet, da in diesem Gewebe polychromatische Erythrozyten erzeugt werden. Zur Bestimmung von nicht ausgereiften (polychromatischen) mikrokernhaltigen Erythrozyten im peripheren Blut kann aber auch jede Spezies herangezogen werden, bei der erwiesenermaßen die Milz keine mikrokernhaltigen Erythrozyten abzubauen vermag oder eine ausreichende Sensibilität für den Nachweis von Agenzien, die strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen verursachen, gegeben ist. Mikrokerne lassen sich mit Hilfe einer Reihe von Kriterien differenzieren. Dazu zählen die Feststellung des Vorhandenseins oder Fehlens einer Kinetochor- bzw. Zentromer-DNA in den Mikrokernen. Hauptendpunkt ist die Häufigkeit der nicht ausgereiften (polychromatischen) mikrokernhaltigen Erythrozyten. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, kommt aber auch der Anteil der Mikrokerne enthaltenden ausgereiften (normochromatischen) Erythrozyten an einer bestimmten Zahl ausgereifter Erythrozyten im peripheren Blut als Endpunkt des Tests in Betracht.

Der In-vivo-Mikrokerntest bei Säugetieren ist für die Bewertung des mutagenen Risikos von besonderer Bedeutung, da er die Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht, auch wenn diese bei den einzelnen Spezies, Gewebearten und genetischen Endpunkten unterschiedlich sind. Ein In-vivo-Versuch ist auch für weitere Untersuchungen der mittels In-vitro-System festgestellten mutagenen Wirkungen von Nutzen.

Gibt es Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2. DEFINITIONEN

**Zentromer (Kinetochor):** Region(en) eines Chromosoms, an die während der Zellteilung die Spindelfasern anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.

**Mikrokern:** kleine Kerne zusätzlich zu den Hauptkernen der Zellen und von diesen getrennt, die während der Telophase der Mitose (Meiose) durch zurückgebliebene Chromosomenteile oder ganze Chromosomen gebildet werden.

**Normochromatischer Erythrozyt:** reifer Erythrozyt, der keine Ribosomen aufweist und sich von unreifen polychromatischen Erythrozyten mit Hilfe ribosomenselektiver Farbstoffe unterscheiden läßt.

**Polychromatischer Erythrozyt:** unreifer Erythrozyt, der sich in seiner Zwischenstufe der Entwicklung befindet und noch Ribosomen enthält, so daß er sich mit Hilfe ribosomenselektiver Farbstoffe von reifen normochromatischen Erythrozyten unterscheiden läßt.

### 1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Prüfsubstanz wird den Tieren über einen geeigneten Applikationsweg verabreicht. Bei Verwendung von Knochenmark werden sie zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Das Knochenmark wird entnommen, präpariert und gefärbt (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Findet peripheres Blut Verwendung, so wird es zu geeigneten Zeitpunkten nach der Behandlung entnommen, und es werden Ausstrichpräparate hergestellt und gefärbt (4) (8) (9) (10). Bei Versuchen mit peripherem Blut sollte zwischen der letzten Exposition und der Zellgewinnung möglichst wenig Zeit vergehen. Die Präparate werden auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht.

### 1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.4.1. **Vorbereitungen**

##### 1.4.1.1. *Versuchstiere*

Bei Verwendung von Knochenmark ist der Einsatz von Mäusen oder Ratten zu empfehlen, doch kommt jede geeignete Säugerspezies in Betracht. Wird peripheres Blut verwendet, so empfiehlt sich der Einsatz von Mäusen. Es kommt aber auch jede andere geeignete Säugerspezies in Frage, wenn es sich um eine Spezies handelt, bei der erwiesenermaßen die Milz keine mikrokernhaltigen Erythrozyten abbaut oder eine ausreichende Empfindlichkeit für den Nachweis von Agenzien, die strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen verursachen, gegeben ist. Es sollten junge gesunde Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert möglichst gering sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als  $\pm 20\%$  betragen.

##### 1.4.1.2. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der Allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50-60% anzustreben.

##### 1.4.1.3. *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so anzuordnen, daß sich ihre Position möglichst wenig auswirkt.

##### 1.4.1.4. *Vorbereitung der Dosierung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

#### 1.4.2. **Prüfbedingungen**

##### 1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht in Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

##### 1.4.2.2. *Kontrollen*

Bei jedem Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativkontrollen für jedes Geschlecht anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die Positivkontrollen sollten in vivo Mikrokerne bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, daß die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Aufarbeitung erfolgt. Gegebenenfalls könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-ethyl-N-nitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel oder Vehikel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Mikrokerneln vorliegen. Erfolgt bei den Negativkontrollen nur eine einzige Aufarbeitung, so ist dafür die erste Aufarbeitung der günstigste Zeitpunkt. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

Bei Verwendung von peripherem Blut ist als gleichzeitige Negativkontrolle möglicherweise auch eine vor der Behandlung entnommene Probe vertretbar, jedoch nur bei Kurzzeitstudien an peripherem Blut (z. B. 1 bis 3 Gaben) und unter der Voraussetzung, daß sich die gewonnenen Daten in dem Bereich bewegen, den die historische Kontrolle erwarten läßt.

## 1.5. VERFAHREN

### 1.5.1. Anzahl und Geschlecht der Tiere

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muß pro Geschlecht mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen (11). Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, daß zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

### 1.5.2. Behandlungsplan

Es läßt sich kein Standard-Behandlungsplan (d. h. 1, 2 oder mehr Gaben im Abstand von 24 Stunden) empfehlen. Die bei längerer Verabreichung entnommenen Stichproben sind akzeptabel, solange für diese Studie ein positives Ergebnis nachgewiesen wurde bzw. solange bei einer negativen Studie Toxizität nachgewiesen oder die Limit-Testdosis verwendet wurde und die Verabreichung bis zum Zeitpunkt der Probenahme erfolgt. Die Gabe kann aber auch in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt.

Die Prüfung kann auf zweierlei Weise durchgeführt werden:

- a) Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz einmal. Knochenmark wird mindestens zweimal aufgearbeitet, wobei die erste Aufarbeitung frühestens 24 Stunden nach Applikation und die letzte spätestens 48 Stunden nach Applikation erfolgen muß. Zwischen den Aufarbeitungsweiten müssen angemessene Abstände sein. Wird eine Probe bereits früher als 24 Stunden nach der Behandlung entnommen, so ist dies zu begründen. Bei

Verwendung peripheren Bluts werden mindestens zweimal Proben entnommen, wobei die erste Probenahme frühestens 36 Stunden nach der Behandlung und die letzte spätestens 72 Stunden nach der Behandlung zu erfolgen hat und nach der ersten Probenahme entsprechende Abstände einzuhalten sind. Wird bei einer Probenahme eine positive Reaktion verzeichnet, so ist die Entnahme weiterer Proben nicht erforderlich.

- b) Bei zwei oder mehr Gaben pro Tag (d. h. zwei oder mehr Gaben im Abstand von 24 Stunden) sind die Proben bei der Verwendung von Knochenmark einmal zwischen 18 und 24 Stunden nach der letzten Gabe und bei Verwendung von peripherem Blut einmal zwischen 36 und 48 Stunden nach der letzten Gabe zu entnehmen (12).

Bei Bedarf können zu anderen Zeitpunkten weitere Probenahmen erfolgen.

### 1.5.3. Dosierungen

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (13). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Probenahme drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Probenahme muß nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, daß höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität im Knochenmark hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Anteils unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten im Knochenmark oder peripheren Blut).

### 1.5.4. Limit-Test

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist eine Gentoxizität angesichts von Daten für strukturverwandte Substanzen nicht zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Bei Studien von längerer Dauer beträgt die Limit-Dosis 2 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von bis zu 14 Tagen und 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von mehr als 14 Tagen. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

### 1.5.5. Verabreichung

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von reizenden oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Minimum zu reduzieren, daß eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

### 1.5.6. Knochenmark-/Blutpräparation

Die Knochenmarkszellen werden in der Regel unmittelbar nach der Tötung aus den Oberschenkel- oder Schienbeinknochen gewonnen. Dabei werden die Zellen gewöhnlich aus den Oberschenkel- oder Schienbeinknochen entnommen und unter Verwendung erprobter Methoden präpariert und gefärbt. Das periphere Blut wird aus der Schwanzvene oder einem anderen geeigneten Blutgefäß entnommen. Die Blutzellen werden sofort supravital gefärbt (8) (9) (10), oder es werden Ausstrichpräparate hergestellt und dann gefärbt. Durch Verwendung eines DNA-spezifischen Farbstoffs (z. B. Acridin Orange (14) oder Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) lassen sich bestimmte Artefakte vermeiden, die bei Verwendung eines nicht DNA-spezifischen Farbstoffs auftreten. Trotz dieses Vorteils ist aber die Verwendung herkömmlicher Farbstoffe (z. B. Giemsa) nicht ausgeschlossen. Zusätzliche Systeme (z. B. Cellulosesäulen zur Entfernung kernhaltiger Zellen (16)) können ebenfalls verwendet werden, falls sich diese Systeme nachweislich bei der Mikrokernpräparation im Labor bewährt haben.

### 1.5.7. Analyse

Der Anteil unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl (unreife + reife Erythrozyten) wird für jedes Tier bestimmt, indem bei Verwendung von Knochenmark mindestens 200 Erythrozyten und bei Verwendung von peripherem Blut mindestens 1 000 Erythrozyten gezählt werden (17). Alle Objektträger, auch die für Positiv-

und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Analyse von unabhängiger Seite zu kodieren. Je Tier werden mindestens 2 000 unreife Erythrozyten auf das Vorhandensein von unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten untersucht. Zusätzlichen Aufschluß kann die Untersuchung reifer Erythrozyten auf Mikrokerne geben. Bei der Analyse der Objektträger sollte der Anteil der unreifen Erythrozyten nicht weniger als 20% des Kontrollwertes betragen. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, können auch mindestens 2 000 reife Erythrozyten pro Tier auf das Vorhandensein von Mikrokerne untersucht werden. Automatisierte Analyseysteme (Bildanalyse und Zellsuspensions-Durchflußzytometrie) stellen bei entsprechender Begründung und Validierung vertretbare Alternativen zur manuellen Auswertung dar.

## 2. DATEN

### 2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier gesondert sind die Anzahl der bewerteten unreifen Erythrozyten, die Anzahl der unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten und der Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamterythrozytenzahl anzugeben. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, sollten auch die Daten über die reifen Erythrozyten angegeben werden, wenn sie erfaßt wurden. Für jedes Tier wird der Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamterythrozytenzahl und ggf. der Anteil der mikrokernhaltigen Erythrozyten angegeben. Gibt es keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Reaktionen der Geschlechter, so können die Daten für beide Geschlechter zur statistischen Analyse zusammengefaßt werden.

### 2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl von Mikrokernzellen oder eine deutliche Zunahme der Anzahl von Mikrokernzellen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (18) (19). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Test als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Ergebnisse des Mikrokerntests deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz Mikrokerne verursacht, die infolge einer Chromosomenschädigung oder einer Schädigung des mitotischen Apparats in den Erythroblasten der geprüften Spezies entstehen. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen in den unreifen Erythrozyten der geprüften Spezies keine Mikrokerne verursacht.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in den allgemeinen Blutkreislauf oder in das spezifische Zielgewebe gelangen (z. B. systemische Toxizität).

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

## Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe;

## Prüfbedingungen:

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für den Verabreichungsweg;
- ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;
- ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Kriterien zur Bewertung unreifer mikrokernhaltiger Erythrozyten;
- Zahl der analysierten Zellen pro Tier;
- Kriterien zur Bewertung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

## Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten;
- Anzahl der unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten, für jedes Tier gesondert anzugeben;
- Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten je Gruppe;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- verwendete statistische Analysen und Methoden;
- Daten zu gleichzeitigen und historischen Negativkontrollen;
- Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

## 4. LITERATURHINWEISE

- (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—112.
- (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-Coated 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., Pacchicotti, 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  $30 \pm 6$  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.

## ANHANG 4D

**„B.13/14. MUTAGENITÄT — RÜCKMUTATIONSTEST UNTER VERWENDUNG VON BAKTERIEN****1. METHODE**

Diese Methode entspricht den OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

**1.1. EINLEITUNG**

Beim Rückmutationstest an Bakterien werden Stämme von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*, die Aminosäure benötigen, zum Nachweis von Punktmutationen verwendet, die Substitution, Addition oder Deletion eines oder mehrerer DNA-Basenpaare umfassen (1) (2) (3). Der unter Verwendung von Bakterien durchgeführte Rückmutationstest beruht auf dem Nachweis von Mutationen, durch die Mutationen in den entsprechenden Stämmen rückgängig gemacht und die funktionale Kapazität der Bakterien zur Synthetisierung einer essentiellen Aminosäure wiederhergestellt wird. Die Revertanten-Bakterien lassen sich an ihrer Fähigkeit zum Wachstum ohne die vom Elternstamm benötigte Aminosäure erkennen.

Punktmutationen sind die Ursache für zahlreiche humangentische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, daß Punktmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen somatischer Zellen an der Entstehung von Krebs bei Menschen und Versuchstieren beteiligt sind. Der Rückmutationstest an Bakterien ist wenig zeitaufwendig, kostengünstig und relativ leicht durchzuführen. Viele Versuchsstämme weisen mehrere Merkmale auf, die ihnen eine größere Empfindlichkeit beim Nachweis von Mutationen verleihen, darunter reaktive DNA-Sequenzen an den Reversionsorten, erhöhte Zelldurchlässigkeit gegenüber großen Molekülen und Eliminierung von DNA-Reparatursystemen oder Anstieg der fehlerhaften DNA-Reparaturprozesse. Die Spezifität der Versuchsstämme kann wertvollen Aufschluß über die Typen der von gentoxischen Agenzien ausgelösten Mutationen liefern. Für Rückmutationstests unter Verwendung von Bakterien steht ein sehr umfangreicher Bestand an Ergebnissen für eine Vielzahl von Strukturen zur Verfügung, und es wurden gründlich erprobte Methoden zur Prüfung von Chemikalien mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, darunter flüchtige Verbindungen, entwickelt.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. DEFINITIONEN**

**Ein Rückmutationstest** bei *Salmonella typhimurium* oder *Escherichia coli* dient zum Nachweis von Mutationen, die in einem Stamm auftreten, der eine Aminosäure (Histidin bzw. Tryptophan) benötigt, und zur Bildung eines Stammes führen, der nicht auf eine Aminosäurezufuhr von außen angewiesen ist.

**Basenpaaraustauschmutagene** sind Agenzien, die in DNA eine Basenveränderung verursachen. Bei einem Reversionstest kann diese Veränderung am Ort der ursprünglichen Mutation oder an einem zweiten Ort des bakteriellen Genoms auftreten.

**Rasterschubmutagene** sind Agenzien, die eine Addition oder Deletion von einem oder mehreren Basenpaaren in der DNA verursachen, wodurch sich der Leseraster der RNS verändert.

**1.3. AUSGANGSÜBERLEGUNGEN**

Beim Rückmutationstest an Bakterien werden prokaryotische Zellen verwendet, die sich im Hinblick auf Faktoren wie Aufnahme, Stoffwechsel, Chromosomenstruktur und DNA-Reparaturprozesse von Säugetierzellen unterscheiden. In vitro durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit einem In-vitro-Metabolisierungssystem lassen sich aber die In-vivo-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Der Test gibt daher keinen direkten Aufschluß über das mutagene und kanzerogene Potential einer Substanz bei Säugetieren.

Der unter Verwendung von Bakterien durchgeführte Rückmutationstest dient in der Regel zur Erstuntersuchung auf gentoxische Aktivität, insbesondere auf Punktmutationen. Aus dem umfangreichen Datenbestand geht hervor, daß sich zahlreiche chemische Stoffe, die bei diesem Test einen positiven Befund ergeben, auch bei anderen Prüfungen als mutagen erweisen. Es gibt allerdings Beispiele dafür, daß mutagene Agenzien nicht durch diesen Test nachgewiesen werden. Zurückzuführen ist dies auf die spezifische Art des ermittelten End-

punkts und auf Unterschiede in der Stoffwechselaktivierung bzw. in der Bioverfügbarkeit. Andererseits können Faktoren, die eine verstärkte Empfindlichkeit des Rückmutationstests an Bakterien bewirken, zu einer Überbewertung der mutagenen Wirkung führen.

Der Rückmutationstest an Bakterien eignet sich möglicherweise nicht zur Bewertung bestimmter Klassen von chemischen Substanzen, so etwa von stark bakteriziden Verbindungen (z. B. bestimmten Antibiotika) und Stoffen, die vermutlich (oder nachweislich) in das Zellreplikationssystem von Säugetieren eingreifen (z. B. bestimmten Topoisomerasehemmern und Nucleosidanalogen). In diesen Fällen sind wohl Mutationstests an Säugetieren eher angebracht.

Zahlreiche Verbindungen, die bei diesem Test einen positiven Befund ergeben, haben zwar eine kanzerogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation. Ausschlaggebend ist die chemische Klasse, und bestimmte Kanzerogene sind durch diesen Test nicht nachweisbar, weil ihre Wirkung auf anderen, nicht genotoxischen Mechanismen oder in Bakterienzellen fehlenden Mechanismen beruht.

#### 1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Suspensionen von Bakterienzellen werden mit und ohne ein exogenes Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfsubstanz behandelt. Bei der Platteninkorporationsmethode werden die Suspensionen mit Schichtagar vermischt und unmittelbar danach auf einem Minimalmedium ausgestrichen. Bei der Vorinkubationsmethode wird das Prüfgemisch bebrütet und dann mit Schichtagar vermischt, bevor es auf einem Minimalmedium ausgestrichen wird. Bei beiden Verfahren wird nach einer Inkubationszeit von zwei oder drei Tagen die Anzahl der Revertanten-Kolonien bestimmt und mit der Anzahl der spontan Revertanten-Kolonien auf den Lösungsmittel-Kontrollplatten verglichen.

Es wurden verschiedene Verfahren zur Durchführung des Rückmutationstests an Bakterien beschrieben. Zu den gebräuchlichsten Verfahren zählen die Platteninkorporationsmethode (1) (2) (3) (4), die Vorinkubationsmethode (2) (3) (5) (6) (7) (8), die Fluktuationmethode (9) (10) und die Suspensionsmethode (11). Beschrieben wurden auch Abänderungen zur Untersuchung von Gasen oder Dämpfen (12).

Die hier beschriebenen Verfahren beziehen sich im wesentlichen auf die Platteninkorporations- und Vorinkubationsmethode. Beide sind für die Durchführung von Versuchen mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem geeignet. Einige Substanzen lassen sich möglicherweise besser mit der Vorinkubationsmethode nachweisen. Sie gehören chemischen Klassen an, zu denen unter anderem kurzkettenige aliphatische Nitrosamine, bivalente Metalle, Aldehyde, Azofarbstoffe und Diazoverbindungen, Pyrollizidinalkaloide, Allylverbindungen und Nitroverbindungen zählen (3). Dabei wird berücksichtigt anerkannt, daß bestimmte Klassen von Mutagenen bei Anwendung von Standardverfahren wie der Platteninkorporations- oder Vorinkubationsmethode nicht immer nachweisbar sind. Diese sind als ‚Sonderfälle‘ anzusehen, zu deren Nachweis unbedingt alternative Verfahren eingesetzt werden sollten. Es könnten sich die folgenden ‚Sonderfälle‘ ergeben (mit Beispielen für möglicherweise geeignete Nachweisverfahren): Azofarbstoffe und Diazoverbindungen (3) (5) (6) (13), Gase und flüchtige chemische Stoffe (12) (14) (15) (16) sowie Glycoside (17) (18). Abweichungen von den Standardverfahren sind wissenschaftlich zu begründen.

#### 1.5. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

##### 1.5.1. Vorbereitungen

###### 1.5.1.1. Bakterien

Frische Bakterienkulturen sollten bis zur späten exponentiellen oder frühen stationären Wachstumsphase kultiviert werden (ca.  $10^9$  Zellen pro ml). Kulturen, die sich im Spätstadium der stationären Phase befinden, sind nicht heranzuziehen. Entscheidend ist dabei, daß die zur Prüfung verwendeten Kulturen einen hohen Anteil an lebensfähigen Bakterien enthalten. Der Anteil läßt sich entweder anhand historischer Kontrolldaten über Wachstumskurven bestimmen oder aber für jeden Versuch gesondert durch Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Zellen mittels eines Plattentests.

Die empfohlene Inkubationstemperatur beträgt 37°C.

Es sind mindestens fünf Bakterienstämme zu verwenden. Dazu sollten vier Stämme von *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 oder TA97a oder TA97; TA98; und TA100) gehören, die erwiesenermaßen zuverlässige und in anderen Labors reproduzierbare Ergebnisse liefern. Diese vier Stämme von *S. typhimurium* weisen an primären Reversionslocus GC-Basenpaare auf. Bekannt ist, daß möglicherweise bestimmte oxidierende Mutagenen, cross-linking induzierende Agenzien und Hydrazine damit nicht nachzuweisen sind. Diese Substanzen lassen sich durch Stämme von *E. Coli* WP2 oder *S. typhimurium* TA102 (19) nachweisen, die am primären Reversionslocus ein AT-Basenpaar aufweisen. Empfohlen wird daher eine Kombination folgender Stämme:

- *S. typhimurium* TA 1535 und
- *S. typhimurium* TA 1537 oder TA97 oder TA97a und
- *S. typhimurium* TA 98 und
- *S. typhimurium* TA100 und
- *E. coli* WP2 *uvrA* oder *E. coli* WP2 *uvrA* (pKM101) oder *S. typhimurium* TA102.

Zum Nachweis cross-linking induzierender Mutagene ist es vielleicht ratsam, TA102 einzubeziehen oder einen reparatur-profizienten Stamm von *E. coli* (z. B. *E. coli* WP 2 oder *E. coli* WP2 (pKM101)) hinzuzugeben.

Zur Vorbereitung der Stammkulturen, zur Verifizierung der Marker und zur Lagerung sollten bewährte Verfahren verwendet werden. Der wachstumsbedingte Aminosäurebedarf ist für jedes tiefgefrorene Stammkulturpräparat nachzuweisen (Histidin bei Stämmen von *S. typhimurium* und Tryptophan bei Stämmen von *E. coli*). Auch andere phänotypische Merkmale sind zu überprüfen, so ggf. das Vorhandensein oder Fehlen von R-Faktor-Plasmiden (d. h. die Ampicillinresistenz bei den Stämmen TA98, TA100 und TA97a oder TA97, WP2 *uvrA* und WP2 *uvrA* (pKM101) und die Ampicillin- + Tetracyclinresistenz bei den Stämmen TA102); das Vorhandensein charakteristischer Mutationen (d. h. *rfa*-Mutation bei *S. typhimurium* durch Empfindlichkeit gegenüber Kristallviolett und *uvrA*-Mutation bei *E. coli* oder *uvrB*-Mutation bei *S. typhimurium* durch Empfindlichkeit gegenüber ultraviolettem Licht) (2) (3). Zudem sollten die Stämme eine Anzahl von Spontan-Revertanten-Kolonien in Häufigkeitsbereichen aufweisen, die anhand der historischen Kontrolldaten des Labors zu erwarten sind, und möglichst innerhalb des in der Literatur angegebenen Bereichs liegen.

#### 1.5.1.2. *Medium*

Verwendet werden geeigneter Minimalagar (z. B. aus Vogel-Bonner-Minimalmedium E und Glucose) und Schichtagar mit Histidin und Biotin oder Tryptophan, damit mehrere Zellteilungen erfolgen können (1) (2) (9).

#### 1.5.1.3. *Stoffwechselaktivierung*

Die Behandlung der Bakterien mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (1) (2) oder einem Gemisch aus Phenobarbital und  $\beta$ -Naphthoflavon (18) (20) (21) vorbehandelt wurden. Die post-mitochondriale Fraktion wird im S9-Gemisch in der Regel in Konzentrationen von 5 bis 30% v/v verwendet. Wahl und Status des Stoffwechselaktivierungssystems sind möglicherweise von der geprüften chemischen Klasse abhängig. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der post-mitochondrialen Fraktion zu verwenden. Bei Azofarbstoffen und Diazoverbindungen ist möglicherweise eher der Einsatz eines reduktiven Stoffwechselaktivierungssystems angebracht (6) (13).

#### 1.5.1.4. *Prüfsubstanz/Zubereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Behandlung der Bakterien in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und es sollte mit dem Überleben der Bakterien und der S9-Aktivität kompatibel sein (22). Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein.

### 1.5.2. **Prüfbedingungen**

#### 1.5.2.1. *Versuchsstämme* (siehe 1.5.1.1)

#### 1.5.2.2. *Expositionskonzentrationen*

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfsubstanz zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität und die Löslichkeit im Endgemisch.

Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Unlöslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen. Aufschluß über die Zytotoxizität geben der zahlenmäßige Rückgang der Revertanten-Kolonien, der Wegfall bzw. die Verkleinerung des Hintergrundrasens oder die Überlebensrate der behandelten Kulturen. Die Zytotoxizität einer Substanz verändert sich möglicherweise bei Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems. Die Unlöslichkeit sollte als Ausfällung im Endgemisch unter realen Prüfbedingungen ermittelt werden und mit dem bloßen Auge erkennbar sein.

Bei löslichen nicht zytotoxischen Substanzen wird eine maximale Prüfkonzentration von 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte empfohlen. Im Falle nicht zytotoxischer Substanzen, die bei 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte nicht löslich sind, sollte eine oder mehrere der geprüften Konzentrationen im Endgemisch unlöslich sein. Prüfsubstanzen, die sich bereits unter 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte als zytotoxisch erweisen, sind bis zu einer zytotoxischen Konzentration zu prüfen. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

Es sind mindestens fünf verschiedene analysierbare Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden, wobei beim ersten Versuch der Abstand zwischen den Prüfpunkten etwa eine halbe Log-Phase (d. h.  $\sqrt{10}$ ) beträgt. Kleinere Abstände sind ggf. angebracht, wenn eine Konzentrations-Effekt-Beziehung untersucht wird. Bei der Bewertung von Substanzen, die größere Mengen an potentiell mutagenen Verunreinigungen enthalten, ist die Prüfung bei Konzentrationen über 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte in Betracht zu ziehen.

### 1.5.2.3. *Negativ- und Positivkontrollen*

Für jeden Versuch sind gleichzeitig stammspezifische Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit oder ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems anzulegen. Für die Positivkontrollen sind Konzentrationen zu wählen, die die Wirksamkeit des jeweiligen Versuchs belegen.

Bei Versuchen mit Stoffwechselaktivierungssystem sollten die Positivkontrollsubstanzen anhand der verwendeten Bakterienstämme ausgewählt werden.

Die folgenden Substanzen gelten als Beispiele für geeignete Positivkontrollen bei Versuchen mit Stoffwechselaktivierung:

Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
9,10-Dimethylantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-Dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracen	57-97-6	200-359-5
Benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
2-Aminoantracen	613-13-8	210-330-9
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	

Die folgende Substanz eignet sich als Positivkontrolle bei der reduktiven Stoffwechselaktivierungsmethode

Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
Kongorot	573-58-0	209-358-4

2-Aminoantracen sollte nicht als alleiniger Gradmesser für die Wirksamkeit des S9-Gemischs dienen. Bei Verwendung von 2-Aminoantracen sollte jede Charge von S9 ebenfalls durch ein Mutagen gekennzeichnet sein, das eine Stoffwechselaktivierung durch mikrosomale Enzyme, z. B. Benzo[a]pyren oder Dimethylbenzanthracen, erfordert.

Die folgenden Substanzen sind Beispiele für stammspezifische Positivkontrollen bei Versuchen ohne exogenes Stoffwechselaktivierungssystem:

Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer	Stamm
Natriumazid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 und TA 100
2-Nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-Aminoacridin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 und TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 und TA 97a
Cumolhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA und TA 102
N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA und WP2uvrA(pKM101)
4-Nitroquinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA und WP2uvrA(pKM101)
Furylfuramid (AF2)	3688-53-7		Plasmide enthaltende Stämme

Es können auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen verwendet werden. Ggf. sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören wie der Prüfstoff.

Es sind Negativkontrollen, die allein aus dem Lösungsmittel oder Vehikel ohne Prüfsubstanz bestehen und auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden, anzulegen. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

### 1.5.3. Verfahren

Bei der Platteninkorporationsmethode (1) (2) (3) (4) ohne Stoffwechselaktivierung werden gewöhnlich 0,05 ml oder 0,1 ml Prüflösung, 0,1 ml frische Bakterienkultur (mit ca.  $10^8$  lebensfähigen Zellen) und 0,5 ml sterile Pufferlösung mit 2,0 ml Schichtagar vermischt. Für Ansätze mit Stoffwechselaktivierung werden gewöhnlich 0,5 ml Stoffwechselaktivierungsgemisch, das eine ausreichende Menge post-mitochondrialer Fraktion (im Bereich von 5 bis 30% v/v im Stoffwechselaktivierungsgemisch) enthält, mit Schichtagar (2,0 ml) und zugleich mit den Bakterien und der Prüfsubstanz/Prüflösung vermischt. Der Inhalt jedes Röhrchens wird vermischt und auf der Oberfläche einer Minimalagarplatte ausgegossen. Vor der Inkubation läßt man den Schichtagar verfestigen.

Bei der Vorinkubationsmethode (2) (3) (5) (6) wird die Prüfsubstanz/Prüflösung ca. 20 Minuten oder länger bei 30—37°C mit dem Versuchsstamm (der ca.  $10^8$  lebensfähige Zellen enthält) und der sterilen Pufferlösung oder dem Stoffwechselaktivierungssystem (0,5 ml) vorinkubiert, bevor sie mit dem Schichtagar vermischt und auf der Oberfläche einer Minimalagarplatte ausgegossen wird. Gewöhnlich werden 0,05 oder 0,1 ml Prüfsubstanz/Prüflösung, 0,1 ml Bakterien und 0,5 ml S9-Gemisch oder sterile Pufferlösung mit 2,0 ml Schichtagar vermischt. Die Röhrchen sind während der Vorinkubation mit Hilfe eines Schüttlers zu belüften.

Um die Schwankungsbreite hinreichend beurteilen zu können, sind für jede Dosisstufe drei Platten anzulegen. Die Verwendung von zwei Platten ist vertretbar, wenn dies wissenschaftlich begründet wird. Durch den gelegentlichen Verlust einer Platte wird der Versuch nicht zwangsläufig entwertet.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z. B. in hermetisch verschlossenen Gefäßen (12) (14) (15) (16).

#### 1.5.4. Inkubation

Sämtliche Platten des jeweiligen Versuchs sind 48 bis 72 Stunden bei 37°C zu bebrüten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte ermittelt.

### 2. DATEN

#### 2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten sind als Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte anzugeben. Die Anzahl der Revertanten-Kolonien sowohl auf den Negativkontrollplatten (Lösungsmittelkontrolle und ggf. unbehandelte Kontrolle) als auch auf den Positivkontrollplatten ist ebenfalls zu dokumentieren. Für die Prüfsubstanz und die Positivkontrollen sowie Negativkontrollen (unbehandelte und/oder Lösungsmittelkontrollen) sind die Zahlenwerte der einzelnen Platten, die mittlere Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte und die Standardabweichung aufzuführen.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Negative Befunde sind durch Einzelfallprüfung zu bestätigen. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Befunde nicht für notwendig erachtet wird, ist dies zu begründen. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen, die Prüfmethode (Platteninkorporation oder flüssige Vorinkubation) und der Stoffwechselaktivierungsstatus.

#### 2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine konzentrationsbezogene Zunahme im Prüfbereich und/oder eine reproduzierbare Zunahme der Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte bei einer oder mehreren Konzentrationen in mindestens einem Stamm mit oder ohne Stoffwechselaktivierungssystem (23). Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (24). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Versuch als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde beim Rückmutationstest an Bakterien deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz durch Basenaustausch oder Rasterverschiebungen Punktmutationen im Genom von *Salmonella typhimurium* und/oder *Escherichia coli* hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen bei den geprüften Spezies keine mutagene Wirkung auslöst.

### 3. ABSCHLUSSBERICHT

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt.

Stämme:

- verwendete Stämme;
- Anzahl der Zellen je Kultur;
- Merkmale des Stammes.

## Prüfbedingungen:

- Menge der Prüfsubstanz je Platte (mg/Platte oder µl/Platte) mit Begründung für die Wahl der Dosis und Anzahl der Platten je Konzentration;
- verwendete Medien;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien;
- Behandlungsverfahren.

## Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Ausfällungszeichen;
- Zählwerte der einzelnen Platten;
- mittlere Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte und Standardabweichung;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen.

## Diskussion der Ergebnisse.

## Schlußfolgerungen.

**4. LITERATURHINWEISE**

- (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, *Mutations 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), Vaporisation 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., Tatehouse, 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.

## ANHANG 4E

**„B.17. MUTAGENITÄT — IN-VITRO-GENMUTATIONSTEST AN SÄUGETIERZELLEN****1. METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 476, In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

**1.1. EINLEITUNG**

Der In-Vitro-Genmutationstest an Säugetierzellen kann zum Nachweis von chemisch induzierten Genmutationen herangezogen werden. Zu den geeigneten Zelllinien gehören Maus-Lymphomazellen L5178Y, die Zelllinien CHO, CHO-AS52 und V79 des chinesischen Hamsters und menschliche Lymphoblastoidzellen TK6 (1). Mit diesen Zelllinien werden in den gebräuchlichsten Systemen Mutationen an den Loci für Thymidinkinase (TK) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) sowie für ein Transgen von Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XPRT) nachgewiesen. Durch den TK-, HPRT- und XPRT-Mutationstest lassen sich unterschiedliche Spektren genetischer Ereignisse ermitteln. Die Autosomenlokation von TK und XPRT ermöglicht ggf. den Nachweis genetischer Ereignisse (z. B. großer Deletionen), die nicht am HPRT-Locus auf den X-Chromosomen feststellbar sind (2) (3) (4) (5) (6).

Beim In-vitro-Genmutationstest an Säugetierzellen können Kulturen von etablierten Zelllinien oder Zellstämmen zum Einsatz kommen. Die verwendeten Zellen werden unter dem Gesichtspunkt der Wachstumsfähigkeit in Kultur und der Stabilität der Spontanmutationshäufigkeit ausgewählt.

In vitro durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem System lassen sich aber die In-vivo-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, bei denen positive Ergebnisse auftreten, die nicht die intrinsische Mutagenität widerspiegeln und möglicherweise aus Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität oder hochgradiger Zytotoxizität herrühren (7).

Dieser Test dient zum Nachweis möglicher Mutagene und Karzinogene in Säugetierzellen. Viele chemische Verbindungen, bei denen der Test positiv ausfällt, haben eine karzinogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation zwischen Test und Karzinogenität. Die Korrelation ist von der chemischen Klasse abhängig, und es gibt zunehmende Anzeichen dafür, daß bestimmte Karzinogene durch diesen Test nicht nachweisbar sind, da ihre Wirkung anscheinend auf anderen, nicht genotoxischen Mechanismen oder in Bakterienzellen fehlenden Mechanismen beruht (6).

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. DEFINITIONEN**

**Vorwärtsmutation:** Genmutation vom Elterntyp zur mutierten Form, die eine Veränderung oder den Ausfall der Enzymaktivität der Funktion des kodierten Proteins bewirkt.

**Basenpaaraustauschmutagene:** Agenzien, die den Austausch eines oder mehrerer Basenpaare in der DNA verursachen.

**Rasterschubmutagene:** Agenzien, die die Addition oder Deletion von einem oder mehreren Basenpaaren im DNA-Molekül verursachen.

**Expressionszeit des Phänotyps:** Zeitraum, in dem aus neumutierten Zellen unveränderte Genprodukte abgebaut werden.

**Mutantenhäufigkeit:** Verhältnis der Anzahl der mutierten Zellen zur Anzahl der lebensfähigen Zellen.

**Relative Gesamtwachstumsrate:** Anstieg der Zellpopulation im Zeitverlauf gegenüber einer Kontrollzellpopulation; ermittelt durch Multiplikation der Suspensionswachstumsrate im Verhältnis zur Negativkontrolle mit der Klonierungseffizienz im Verhältnis zur Negativkontrolle.

**Relative Suspensionswachstumsrate:** Anstieg der Zellpopulation während der Expressionszeit gegenüber der Negativkontrolle.

**Lebensfähigkeit:** Klonierungseffizienz der behandelten Zellen zum Zeitpunkt der Ausplattierung unter selektiven Bedingungen nach der Expressionszeit.

**Überlebensrate:** Klonierungseffizienz der behandelten Zellen beim Ausplattieren nach Ablauf der Behandlungszeit; die Überlebensrate wird gewöhnlich in Relation zur Überlebensrate der Kontrollzellpopulation angegeben.

### 1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Zellen, die infolge der Mutation  $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$  keine Thymidinkinase (TK) enthalten, sind gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Pyrimidinanalogs Trifluorthymidin (TFT) resistent. Bei Anwesenheit von Thymidinkinase sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TFT, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. So können die Mutantenzellen bei Anwesenheit von TFT proliferieren, während die normalen Zellen, die Thymidinkinase enthalten, nicht dazu in der Lage sind. In ähnlicher Weise werden HPRT- oder XPRT-defiziente Zellen durch Resistenz gegenüber 6-Thioguanin (TG) oder 8-Azaguanin (AG) selektiert. Die Eigenschaften der Prüfsubstanz sind sorgfältig zu beachten, wenn bei einem Genmutatontest an Säugetierzellen ein mit dem selektierenden Agens verwandtes Basenanalogen bzw. eine damit verwandte Verbindung geprüft wird. Beispielsweise sollte jedem Verdacht auf selektive Toxizität der Prüfsubstanz bei mutierenden und nichtmutierenden Zellen nachgegangen werden. Bei der Prüfung von Chemikalien, die strukturell mit dem selektierenden Agens verwandt sind, muß die Leistungsfähigkeit des Selektivsystems bzw. des selektierenden Agens bestätigt werden (8).

Zellen in Suspensions- oder Monoschichtkultur werden über einen angemessenen Zeitraum mit und ohne Metabolisierungssystem mit der Prüfsubstanz behandelt und subkultiviert, um die Zytotoxizität zu bestimmen und vor der Mutantenselektion die Expression des Phänotyps zu ermöglichen (9) (10) (11) (12) (13). Die Zytotoxizität wird gewöhnlich durch Bestimmung der relativen Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder des relativen Gesamtwachstums der Kulturen nach Ablauf der Behandlungszeit ermittelt. Die behandelten Kulturen werden für einen ausreichenden Zeitraum, der für den jeweils gewählten Locus und Zelltyp charakteristisch ist, in einem Wachstumsmedium gehalten, um eine annähernd optimale phänotypische Expression der induzierten Mutationen zu ermöglichen. Die Mutantenhäufigkeit wird bestimmt, indem man eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit dem selektierenden Agens zur Bestimmung der Mutantenzahl und auf ein Medium ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Lebensfähigkeit) aufimpft. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird aus der Anzahl der Mutantenkolonien im selektiven Medium und der Anzahl der Kolonien im nichtselektiven Medium berechnet.

### 1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.4.1. Vorbereitungen

##### 1.4.1.1. Zellen

Für diesen Versuch stehen eine Reihe von Zelltypen zur Verfügung. Dazu gehören Subklone von L5178Y, CHO-, CHO-AS52-, V79- oder TK6-Zellen. Die bei diesem Test verwendeten Zelltypen sollten nachweislich eine Empfindlichkeit für chemische Mutagene, eine hohe Klonierungseffizienz und eine geringe Spontanmutationshäufigkeit aufweisen. Die Zellen sind auf Mycoplasma-Verunreinigung zu überprüfen und bei Verunreinigung nicht heranzuziehen.

Der Test sollte so angelegt werden, daß er ausreichende Sensitivität hat. Die Anzahl der Zellen, die verwendeten Kulturen und Konzentrationen der Prüfsubstanz sollten den vorgegebenen Parametern entsprechen (14). Die Mindestzahl der lebensfähigen Zellen, die die Behandlung überstehen und im jeweiligen Stadium der Prüfung verwendet werden, sollte auf der Spontanmutationshäufigkeit beruhen. Als allgemeine Faustregel gilt die Verwendung einer Anzahl von Zellen, die mindestens dem Zehnfachen des reziproken Wertes der Spontanmutationshäufigkeit entspricht. Es wird aber empfohlen, mindestens  $10^6$  Zellen zu verwenden. Es sollten angemessene historische Daten zum verwendeten Zellsystem vorhanden sein, um die durchgängige Aussagefähigkeit des Tests zu belegen.

##### 1.4.1.2. Kulturmedien und Inkubationsbedingungen

Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße,  $CO_2$ -Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu verwenden. Die Medien sind entsprechend dem beim Test verwendeten Selektivsystem und Zelltyp auszuwählen. Vor allem ist für Inkubationsbedingungen zu sorgen, die ein optimales Zellwachstum während der Expressionszeit und die Fähigkeit der mutierenden und nichtmutierenden Zellen zur Koloniebildung gewährleisten.

#### 1.4.1.3. Vorbereitung der Kulturen

Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen, auf das Kulturmedium aufgeimpft und bei 37°C inkubiert. Vor der Verwendung bei diesem Test sind die Kulturen ggf. von bereits vorhandenen Mutantenzellen zu reinigen.

#### 1.4.1.4. Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Bakterien mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Metabolisierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) oder einem Gemisch aus Phenobarbiton und  $\beta$ -Naphthoflavon (19) (20) vorbehandelt wurde.

Im Endmedium wird die post-mitochondriale Fraktion in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 10% v/v verwendet. Wahl und Bedingungen des Metabolisierungssystems können von der geprüften chemischen Klasse abhängig sein. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der postmitochondrialen Fraktion zu verwenden.

Eine Reihe von Entwicklungen, darunter die Herstellung gentechnisch veränderter Zelllinien zur Expression spezifischer Aktivierungsenzyme, eröffnen vielleicht die Möglichkeit für eine endogene Aktivierung. Die Wahl der verwendeten Zelllinien sollte wissenschaftlich begründet sein (z. B. durch die Relevanz des Isoenzym Cytochrom P450 für den Stoffwechsel der Prüfsubstanz).

#### 1.4.1.5. Prüfsubstanz/Zubereitung

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

### 1.4.2. Prüfbedingungen

#### 1.4.2.1. Lösungsmittel/Vehikel

Die Lösungsmittel/Vehikel sollten nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und sie sollten mit dem Überleben der Zellen und der S9-Aktivität kompatibel sein. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein. Das Wasser läßt sich durch Zusatz eines Molekularsiebs entfernen.

#### 1.4.2.2. Expositionskonzentrationen

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität, die Löslichkeit im Versuchssystem und die Veränderungen des pH-Wertes oder der Osmolalität.

Die Zytotoxizität sollte im Hauptversuch mit und ohne Stoffwechselaktivierung unter Verwendung eines geeigneten Indikators für Zellintegrität und -wachstum wie relative Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder relatives Gesamtwachstum bestimmt werden. Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Löslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen.

Es sind mindestens vier analysierbare Konzentrationen zu verwenden. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten diese Konzentrationen den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Im Normalfall bedeutet dies, daß sich die Konzentrationen maximal um einen Faktor zwischen 2 und  $\sqrt{10}$  unterscheiden. Beruht die höchste Konzentration auf der Zytotoxizität, sollte sie eine relative Überlebensrate (relative Klonierungseffizienz) oder relative Gesamtwachstumsrate von ca. 10 bis 20% (aber mindestens 10%) ergeben. Bei relativ nichtzytotoxischen Substanzen sollte die maximale Prüfkonzentration 5 mg/ml, 5  $\mu$ l/ml oder 0,01 M betragen, je nachdem, welcher Wert am niedrigsten ist.

Relativ unlösliche Substanzen sind unter Kulturbedingungen bis zur Löslichkeitsgrenze und darüber hinaus zu testen. Eine etwaige Unlöslichkeit ist im Endmedium zu bestimmen, dem die Zellen ausgesetzt werden. Möglicherweise ist es sinnvoll, die Löslichkeit zum Anfang und Abschluß der Behandlung zu bewerten, da sich die Löslichkeit im Versuchssystem während der Exposition aufgrund des Vorhandenseins von Zellen, S9, Serum usw. verändern kann. Die Unlöslichkeit ist mit dem bloßen Auge erkennbar. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

1.4.2.3. *Kontrollen*

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit oder ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems anzulegen. Bei Stoffwechselaktivierung sollte die Positivkontrollsubstanz jene Substanz sein, die zur mutagenen Reaktion eine Aktivierung benötigt.

Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

Stoffwechselaktivierungsstatus	Ort	Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
Ohne exogene Stoffwechselaktivierung	HPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
	TK (kleine und große Kolonien)	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
Mit exogener Stoffwechselaktivierung	HPRT	3-Methylcholanthren	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimethylamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimethylbenzanthracen	57-97-6	200-359-5
	TK (kleine und große Kolonien)	Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
		Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
		Benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-Methylcholanthren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimethylamin (für hohe Konzentrationen von S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5

Es kommen auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen in Betracht. Wenn z. B. ein Labor über historische Datenbestände zu 5-Bromo 2'-deoxyuridin (CAS-Nummer 59-14-3, EINECS-Nummer 200-415-9) verfügt, könnte auch diese Bezugssubstanz zum Einsatz kommen. Gegebenenfalls sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören wie der Prüfstoff.

Es sind Negativkontrollen zu verwenden, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel oder Vehikel enthält und die auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

1.4.3. **Verfahren**1.4.3.1. *Behandlung mit der Prüfsubstanz*

Proliferierende Zellen werden mit und ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Exposition sollte über einen geeigneten Zeitraum (gewöhnlich 3 bis 6 Stunden) erfolgen. Die Expositionszeit kann sich über einen oder mehrere Zellzyklen erstrecken.

Es sollten für jede überprüfte Konzentration behandelte Zweifach- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Bei Einfachkulturen ist die Anzahl der Konzentrationen zu erhöhen, damit eine ausreichende Anzahl von Kulturen zur Analyse vorliegt (d. h. mindestens 8 analysierfähige Konzentrationen). Es sind zweifache Negativ- (Lösungsmittel-)Kontrollkulturen zu verwenden.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z. B. in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (21) (22).

#### 1.4.3.2. Bestimmung der Überlebensrate, der Lebensfähigkeit und der Mutantenhäufigkeit

Am Ende der Expositionszeit werden die Zellen gewaschen und kultiviert, um die Überlebensrate zu bestimmen und die Expression des Mutantenphänotyps zu ermöglichen. Die Bestimmung der Zytotoxizität durch Ermittlung der relativen Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder des relativen Gesamtwachstums der Kulturen erfolgt in der Regel nach Ablauf der Behandlungszeit.

Jeder Locus hat eine bestimmte Mindestzeit, um eine annähernd optimale phänotypische Expression der neu induzierten Mutanten zu ermöglichen (HPRT und XPRT benötigen mindestens 6 bis 8 Tage, TK mindestens 2 Tage). Die Zellen werden in Medien mit und ohne selektierende Agenzien kultiviert, um die Mutantenzahl bzw. die Klonierungseffizienz zu bestimmen. Die Bestimmung der Lebensfähigkeit (zur Berechnung der Mutantenhäufigkeit) erfolgt nach dem Ablauf der Expressionszeit durch Ausplattieren in einem nicht selektierenden Medium.

Wenn die Prüfsubstanz im L5178Y TK<sup>+/-</sup>-Test einen positiven Befund ergibt, sollte zumindest bei einer der Prüfkulturen (der höchsten positiven Konzentration) und bei den Negativ- und Positivkontrollen eine Größeneinteilung der Kolonien erfolgen. Ergibt die Prüfsubstanz beim L5178Y TK<sup>+/-</sup>-Test einen negativen Befund, so ist eine Koloniegroßeneinstufung bei den Negativ- und Positivkontrollen durchzuführen. Eine Koloniegroßeneinstufung ist ggf. auch bei Studien mit TK6TK<sup>+/-</sup> vorzunehmen.

## 2. DATEN

### 2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Anzugeben sind die Zytotoxizität, die Lebensfähigkeit, die Koloniezahlen und die Mutantenhäufigkeit für die Prüf- sowie Kontrollkulturen. Ergibt der L5178Y TK<sup>+/-</sup>-Test einen positiven Befund, werden die Kolonien bei mindestens einer Konzentration der Prüfsubstanz (der höchsten positiven Konzentration) sowie bei den Negativ- und Positivkontrollen nach dem Kriterium kleine oder große Kolonie ausgewertet. Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit von Mutanten mit Bildung großer und Mutanten mit Bildung kleiner Kolonien ist gründlich erforscht (23) (24). Beim TK<sup>+/-</sup>-Test werden die Kolonien nach dem Kriterium normal wachsende (große) oder langsam wachsende (kleine) Kolonie eingestuft (25). Mutantenzellen mit einer erheblichen genetischen Schädigung weisen eine längere Generationszeit auf und bilden daher kleine Kolonien. Die Schädigung kann vom Verlust eines kompletten Gens bis zu karyotypisch erkennbaren Chromosomenaberrationen reichen. Mutanten mit der Bildung kleiner Kolonien treten vor allem bei Chemikalien auf, die starke Chromosomenaberrationen hervorrufen (26). Weniger stark betroffene Mutantenzellen wachsen in ähnlichem Tempo wie die Elternzellen und bilden große Kolonien.

Es ist die Überlebensrate (relative Klonierungseffizienz) oder das relative Gesamtwachstum anzugeben. Unter der Mutantenhäufigkeit ist der zahlenmäßige Anteil der Mutantenzellen an den überlebenden Zellen zu verstehen.

Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefaßt werden.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Negative Ergebnisse sind durch Einzelfallprüfung zu bestätigen. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Ergebnisse nicht für notwendig erachtet wird, ist dies zu begründen. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen und der Stoffwechselaktivierungsstatus.

### 2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine konzentrationsbezogene Zunahme und/oder eine reproduzierbare Zunahme der Mutationsrate. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen. Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem System als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Ergebnisse aus dem In-vitro-Genmutationstest an Säugetierzellen deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz in den verwendeten kultivierten Säugetierzellen Genmutationen hervorruft. Eine reproduzierbare positive Relation zwischen Konzentration und Wirkung ist sehr bedeutsam. Negative Ergebnisse sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen in den verwendeten kultivierten Säugetierzellen keine Genmutation auslöst.

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel:

- Begründung für die Wahl des Vehikels/Lösungsmittels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt.

Zellen:

- Typ und Herkunft der Zellen;
- Anzahl der Zellkulturen;
- ggf. Passagenanzahl;
- ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- Nichtvorhandensein von Mycoplasma.

Prüfbedingungen:

- Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze, falls vorhanden;
- Medienzusammensetzung, CO<sub>2</sub>-Konzentration;
- Konzentration der Prüfsubstanz;
- Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfsubstanz;
- Inkubationstemperatur;
- Inkubationszeit;
- Behandlungsdauer;
- Zelldichte während der Behandlung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien;
- Positiv- und Negativkontrollen;
- Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel);
- selektierende Agenzien;
- Kriterien zur Einstufung der Tests als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

- Methoden zur Zählung der lebensfähigen und mutierten Zellen;
- Angaben zur Berücksichtigung der Kolonien nach Größe und Typ (ggf. einschließlich Kriterien für ‚kleine‘ und ‚große‘ Kolonien).

Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Ausfällungszeichen;
- Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;
- Koloniegröße, falls bewertet, zumindest für Negativ- und Positivkontrollen;
- ggf. Voraussetzungen des Labors zur Bestimmung von Mutanten mit geringer Koloniebildung durch das L5178Y TK<sup>+</sup>-System;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Mutantenhäufigkeit.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. LITERATURHINWEISE

- (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 Malling, 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. Environment 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., O'Neill, 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., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK<sup>+</sup> — TK<sup>-</sup> 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<sup>+</sup> 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., Elcome, 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, F. 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<sup>r</sup>) and Mutants of L5178Y/TK<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609—614.

## ANHANG 4F

**„B.23. SPERMATOGONIEN-CHROMOSOMENABERRATIONSTEST BEI SÄUGETIEREN****1. METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

**1.1. EINLEITUNG**

Der In-vivo-Spermatogenientest auf Chromosomenaberrationen bei Säugetieren dient zum Nachweis von Agenzien, die bei Säugetieren strukturelle Chromosomenaberrationen in den Spermatogonien auslösen (1) (2) (3) (4) (5). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Allerdings ist diese Methode nicht zur Messung numerischer Aberrationen bestimmt und wird folglich auch nicht routinemäßig dafür eingesetzt. Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen.

Mit diesem Test werden Chromosomenveränderungen in Spermatogonien ermittelt, so daß Prognosen zur Auslösung vererbbarer Mutationen in Keimzellen möglich sind.

Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nagetiere eingesetzt. Mit diesem zytogenetischen In-vivo-Test werden Chromosomenaberrationen in Mitosen von Spermatogonien ermittelt. Andere Zielzellen sind nicht Gegenstand dieser Methode.

Zum Nachweis von Chromatidentypaberrationen in Spermatogonien ist die erste mitotische Zellteilung nach der Behandlung zu untersuchen, bevor diese Läsionen bei anschließenden Zellteilungen verlorengehen. Die meiotische Chromosomenanalyse der Spermatozyten in der Diakinese-Metaphase I auf Chromosomenaberrationen nach Behandlung der Spermatogoniestammzellen kann weitere nützliche Informationen liefern.

Mit dem In-vivo-Test soll ermittelt werden, ob Mutagene für somatische Zellen auch in Keimzellen aktiv sind. Darüber hinaus ist der Keimzellentest für die Bewertung des mutagenen Risikos von Relevanz, da er die Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht.

In den Hoden finden sich mehrere Generationen von Spermatogonien mit einem Spektrum der Empfindlichkeit gegenüber chemischer Behandlung. Die festgestellten Aberrationen stellen also eine Gesamtreaktion der behandelten Spermatogonipopulationen dar, wobei die zahlreicheren differenzierten Spermatogonien dominieren. Je nach ihrer Position im Hoden sind einzelne Generationen von Spermatogonien dem allgemeinen Kreislauf ausgesetzt oder nicht, und zwar wegen der physischen und physiologischen Sertoli-Zellen-Schranke und der Blut-Hoden-Schranke.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, daß die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. DEFINITIONEN**

**Chromatidentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion von Chromatiden.

**Chromosomentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

**Lücke:** achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatiden.

**Numerische Aberration:** Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Tiere charakteristisch ist.

**Polyploidie:** Vorhandensein von mehr als zwei haploiden Chromosomensätzen (n) (z. B. 3n, 4n usw.).

**Strukturelle Aberration:** Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen, intrachromosalen oder reziproken Translokationen.

### 1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz mittels einer geeigneten Expositionsform verabreicht und werden zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin oder Colcemid®) behandelt. Aus den Keimzellen werden dann Chromosomen präpariert und gefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

### 1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.4.1. Vorbereitungen

##### 1.4.1.1. Versuchstiere

Gewöhnlich werden männliche chinesische Hamster und Mäuse verwendet, doch kommen auch männliche Tiere anderer geeigneter Säugetierarten in Frage. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und nicht mehr als  $\pm 20\%$  betragen.

##### 1.4.1.2. Haltungs- und Fütterungsbedingungen

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der Allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50-60% anzustreben.

##### 1.4.1.3. Vorbereitung der Tiere

Gesunde und geschlechtsreife junge Männchen werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, daß sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden vor Beginn der Studie über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

##### 1.4.1.4. Vorbereitung der Dosierung

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

#### 1.4.2. Prüfbedingungen

##### 1.4.2.1. Lösungsmittel/Vehikel

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

##### 1.4.2.2. Kontrollen

Für jeden Versuch und jedes Geschlecht sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die Positivkontrollen sollten in vivo strukturelle Chromosomenaberrationen in Spermatozoen hervorrufen, wenn sie in Expositionskonzentrationen verabreicht werden, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben.

Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, daß die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Probenahme erfolgt. Gegebenenfalls könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Cyclohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomeres Acrylamid	79-06-1	201-173-7
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die lediglich ein Lösungsmittel oder Vehikel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen vorliegen. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

## 1.5. VERFAHREN

### 1.5.1. Anzahl der Tiere

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muß mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen.

### 1.5.2. Behandlungsplan

Die Prüfsubstanzen sind möglichst als Einmal- oder Zweimalgabe zu verabreichen. Die Gabe kann in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt. Andere Verabreichungsschemata sollten wissenschaftlich begründet sein.

In der Gruppe mit der höchsten Dosis wird nach der Behandlung zu zwei verschiedenen Zeitpunkten eine Stichprobe entnommen. Da die Zellzykluskinetik von der Prüfsubstanz beeinflusst werden kann, erfolgt eine Probenahme ca. 24 Stunden und die andere ca. 48 Stunden nach der Behandlung. Bei den übrigen Dosen sollte die Probenahme 24 Stunden nach der Behandlung oder nach Ablauf eines Zeitraums erfolgen, der der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht, wenn nicht ein anderer Zeitpunkt erwiesenermaßen zur Feststellung von Effekten günstiger ist (6).

Für die Probenahme kommen auch andere Zeitpunkte in Frage. Bei Chemikalien, die eine Chromosomenverzögerung bewirken oder S-unabhängige Effekte auslösen können, ist möglicherweise eine Probenahme zu einem früheren Zeitpunkt angebracht (1).

Die Zweckmäßigkeit einer wiederholten Behandlung ist im Einzelfall zu prüfen. Bei wiederholter Behandlung sind die Tiere 24 Stunden (1,5facher Zellzyklus) nach der letzten Gabe zu töten. Ggf. sind zusätzliche Zeiten für die Probenahme vorzusehen.

Vor der Tötung wird den Tieren intraperitoneal eine geeignete Dosis eines Spindelgiftes (z. B. Colcemid® oder Colchicin) verabreicht. Eine Stichprobe wird den Tieren danach zu einem geeigneten Zeitpunkt entnommen. Bei Mäusen beträgt der Zeitabstand ca. 3 bis 5 Stunden, bei chinesischen Hamstern ca. 4 bis 5 Stunden.

### 1.5.3. Dosierungen

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (7). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Probenahme drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Probenahme muß nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, daß höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen.

Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität in den Spermatogonien hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Verhältnisses der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase; diese Reduzierung sollte nicht mehr als 50% betragen).

### 1.5.4. Limit-Test

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Gentoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

### 1.5.5. Verabreichung

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von Reizstoffen oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfolumens dadurch auf ein Mindestmaß zu reduzieren, daß eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

### 1.5.6. Chromosomenpräparation

Unmittelbar nach der Tötung werden aus einem oder beiden Hoden Zellsuspensionen gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und fixiert. Die Zellen werden dann auf Objektträger aufgetropft und gefärbt.

### 1.5.7. Analyse

Es sind mindestens 100 gut gespreitete Metaphasen je Tier (d. h. mindestens 500 Metaphasen je Gruppe) zu analysieren. Eine zahlenmäßige Reduzierung ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird. Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die bei allen Zelltypen der Zahl  $2n \pm 2$  entspricht.

## 2. DATEN

### 2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier sind die Anzahl der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen und die Anzahl der Chromosomenaberrationen je Zelle anzugeben. Für die Versuchs- und Kontrollgruppen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Lücken werden getrennt erfaßt und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt.

Wird Mitose sowie Meiose beobachtet, ist das Verhältnis der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase als Gradmesser der Zytotoxizität bei allen behandelten Tieren und Tieren der Negativkontrolle in einer Gesamtstichprobe von 100 sich teilenden Zellen zu bestimmen, um eine mögliche zytotoxische Wirkung festzustellen. Wird nur Mitose beobachtet, so ist der Mitoseindex für mindestens 1 000 Zellen je Tier zu bestimmen.

## 2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen oder eine eindeutige Zunahme der Anzahl der Zellen mit Aberrationen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (8). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Versuch als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde des In-vivo-Keimzellentests auf Chromosomenaberrationen deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz in den Keimzellen der untersuchten Spezies Chromosomenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen in den Keimzellen der untersuchten Spezies hervorruft.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in das spezifische Zielgewebe gelangen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

#### Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt.

#### Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl und Alter der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

#### Prüfbedingungen:

- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Begründung für den Verabreichungsweg;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für die Tötungszeiten;

- ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Bezeichnung des Spindelgifts, Konzentration und Behandlungsdauer;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers;
- Kriterien zur Bewertung von Aberrationen;
- Anzahl der analysierten Zellen pro Tier;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Mitoseindex;
- Verhältnis der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase;
- Typ und Anzahl der Aberrationen, für jedes Tier gesondert anzugeben;
- Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe;
- Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen;
- Daten zu historischen Negativkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. LITERATURHINWEISE

- (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), Cytogenic 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., 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 Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184—232.
-

## ANHANG 4G

**„B.39. IN-VIVO-TEST ZUR UNPLANMÄSSIGEN DNA-SYNTHESE (UDS) IN SÄUGETIERLEBERZELLEN****1. METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo (1997).

**1.1. EINLEITUNG**

Der In-vivo-Test zur unplanmäßigen DNA-Synthese in Säugetierleberzellen dient zum Nachweis von Agenzien, die in den Leberzellen der behandelten Tiere eine DNA-Reparatur auslösen (1) (2) (3) (4).

Dieser In-vivo-Test ermöglicht die Untersuchung der genotoxischen Wirkung von Chemikalien in der Leber. Der ermittelte Endpunkt deutet auf eine DNA-Schädigung und anschließende Reparatur in Leberzellen hin. Die Leber ist in der Regel Hauptort des Stoffwechsels der resorbierten Verbindungen. Sie eignet sich also gut zur In-vivo-Bestimmung einer DNA-Schädigung.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, daß die Prüfsubstanz das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Der Endpunkt der unplanmäßigen DNA-Synthese (UDS) wird durch die Bestimmung der Aufnahme markierter Nucleoside in Zellen, die keine planmäßige (S-Phasen-) DNA-Synthese durchlaufen, ermittelt. Das gängigste Verfahren ist die Bestimmung der Aufnahme von tritiummarkiertem Thymidin (<sup>3</sup>H-TdR) durch Autoradiographie. Für In-vivo-UDS-Tests wird vorzugsweise die Leber von Ratten verwendet. Neben Lebergewebe kann auch anderes Gewebe Verwendung finden, doch ist dieses nicht Gegenstand dieser Methode.

Der Nachweis einer UDS-Reaktion hängt von der Zahl der ausgeschnittenen und ersetzten DNA-Basen am Ort der Schädigung ab. Der UDS-Test eignet sich daher insbesondere zum Nachweis der von einer Substanz induzierten ‚Long-patch‘-Reparatur (20—30 Basen). Die ‚Short-patch‘-Reparatur (1—3 Basen) läßt sich hingegen nur mit einem wesentlich geringeren Empfindlichkeitsgrad feststellen. Zudem können mutagene Ereignisse aus der Nichtreparatur, fehlerhaften Reparatur oder fehlerhaften Replikation der DNA-Läsionen herrühren. Das Ausmaß der UDS-Reaktion gibt keinen Aufschluß über die Genauigkeit des Reparaturprozesses. Darüber hinaus ist es möglich, daß ein Mutagen mit der DNA reagiert, die DNA-Schädigung aber nicht über einen Exzisionsreparaturprozeß behoben wird. Die Tatsache, daß der UDS-Test keine spezifischen Informationen zur mutagenen Aktivität liefert, wird durch die potentielle Empfindlichkeit dieses Endpunktes kompensiert, denn er wird im gesamten Genom ermittelt.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. DEFINITIONEN**

**In Reparatur befindliche Zellen:** Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG) oberhalb eines vorher festgelegten Schwellenwerts, der von dem jeweiligen Labor zu begründen ist.

**Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG):** quantitative Maßzahl der UDS-Aktivität von Zellen bei autoradiographischen UDS-Tests, errechnet durch Subtraktion der durchschnittlichen Körnerzahl über kernäquivalenten Bereichen des Zytoplasmas (CG) von der Körnerzahl über dem Zellkern (NG):  $NNG = NG - CG$ . Die NNG wird für einzelne Zellen bestimmt, dann für alle Zellen in einer Kultur, in Parallelkulturen usw.

**Unplanmäßige DNA-Synthese (UDS):** DNA-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen des Abschnitts eines DNA-Stranges, der eine Region mit einer durch chemische Substanzen oder physikalische Agenzien induzierten Schädigung enthält.

**1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

Der In-vivo-UDS-Test an Säugetierleberzellen erbringt den Nachweis einer DNA-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen eines DNA-Abschnittes, der eine Region mit einer durch chemische Substanzen oder physikalische Agenzien induzierten Schädigung enthält. Der Test beruht gewöhnlich auf dem Einbau von <sup>3</sup>H-TdR in die DNA von Leberzellen, wo sich nur wenige Zellen in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die Aufnahme von <sup>3</sup>H-TdR wird in der Regel durch Autoradiographie bestimmt, da dieses Verfahren nicht so anfällig für eine Einwirkung durch S-Phasen-Zellen ist wie beispielsweise die Flüssigkeitsszintillationszählung (LSC).

## 1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitungen**1.4.1.1. *Versuchstiere*

Gewöhnlich werden Ratten verwendet, doch kommen auch andere geeignete Säugetierarten in Frage. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als  $\pm 20\%$  betragen.

1.4.1.2. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der Allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50—60% anzustreben.

1.4.1.3. *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, daß sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Vor Beginn der Studie werden die Tiere in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

1.4.1.4. *Prüfsubstanz/Vorbereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, wenn die Stabilitätsdaten gegen eine Lagerung sprechen.

1.4.2. **Prüfbedingungen**1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

1.4.2.2. *Kontrollen*

Für jeden gesondert vorgenommenen Teil des Versuchs sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die als Positivkontrollen verwendeten Substanzen sollten erwiesenermaßen eine UDS bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Positivkontrollen, die eine Stoffwechselaktivierung benötigen, sollten in Dosen verwendet werden, die eine mäßige Reaktion hervorrufen (4). Die Dosen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

Zeitpunkt der Probenahme	Substanz	CAS-Nr.	EINECS-Nr.
Früh (2—4 Std.)	N-Nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Spät (12—16 Std.)	N-2-Fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen kommen in Betracht. Es ist vertretbar, daß die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird.

## 1.5. VERFAHREN

### 1.5.1. Anzahl und Geschlecht der Tiere

Es ist eine ausreichende Anzahl von Tieren zu verwenden, um die natürliche biologische Schwankungsbreite der Testreaktion zu berücksichtigen. Jede Gruppe sollte mindestens 3 analysierbare Tiere umfassen. Liegt ein größerer Bestand an historischen Daten vor, so sind für die gleichzeitigen Negativ- und Positivkontrollgruppen nur 1 oder 2 Tiere erforderlich.

Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, daß zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines — vorzugsweise des männlichen — Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

### 1.5.2. Behandlungsplan

Die Prüfsubstanzen werden in der Regel als Einmalgabe verabreicht.

### 1.5.3. Dosierungen

Im Normalfall sind mindestens zwei Dosisstufen zu verwenden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, daß höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Die geringere Dosis sollte in der Regel 50% bis 25% der hohen Dosis entsprechen.

Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen.

Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität in der Leber hervorruft (z. B. pyknotische Kerne).

### 1.5.4. Limit-Test

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Gentoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie verzichtet werden. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

### 1.5.5. Verabreichung

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Eine intraperitoneale Injektion ist allerdings nicht zu empfehlen, da die Leber damit möglicherweise der Prüfsubstanz direkt und nicht über das Kreislaufsystem ausgesetzt wird. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von Reizstoffen oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Mindestmaß zu reduzieren, daß eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

### 1.5.6. Präparation der Leberzellen

Die Präparation der Leberzellen behandelter Tiere erfolgt in der Regel 12—16 Stunden nach der Verabreichung. Im allgemeinen ist zusätzlich eine frühere Aufarbeitung (gewöhnlich 2—4 Stunden nach der Behandlung) erforderlich, wenn nicht nach 12—16 Stunden eine eindeutige positive Reaktion vorliegt. Auf der Grundlage der toxikokinetischen Daten sind aber bei entsprechender Begründung auch Aufarbeitungen zu anderen Zeitpunkten möglich.

Kurzzeitkulturen von Säugetier-Leberzellen werden in der Regel dadurch angelegt, daß eine Perfusion der Leber in situ mit Collagenase erfolgt und es frisch gewonnenen Leberzellen ermöglicht wird, sich an eine geeignete Wachstumsfläche festzuheften. Die Leberzellen von Tieren der Negativkontrollgruppe sollten eine Lebensfähigkeit (5) von mindestens 50% aufweisen.

#### 1.5.7. Bestimmung der UDS

Frisch isolierte Säugetier-Leberzellen werden über einen angemessenen Zeitraum, z. B. 3—8 Stunden, in einem  $^3\text{H-TdR}$  enthaltenden Medium inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit sollte das Medium aus den Zellen entfernt werden, die dann mit einem überschüssiges unmarkiertes Thymidin enthaltenden Medium inkubiert werden können, um die nicht inkorporierte Radioaktivität zu verringern („cold chase“). Anschließend werden die Zellen gewaschen, fixiert und getrocknet. Bei längeren Inkubationszeiten ist eine „cold chase“ möglicherweise nicht erforderlich. Die Objektträger werden in Autoradiographieemulsion getaucht, im Dunkeln „belichtet“ (z. B. gekühlt für 7—14 Tage), entwickelt und gefärbt, und es werden die belichteten Silberkörner gezählt. Von jedem Tier werden zwei bis drei Objektträger hergestellt.

#### 1.5.8. Analyse

Die Objektträgerpräparate sollten eine ausreichende Anzahl von morphologisch normalen Zellen enthalten, um eine aussagefähige Bewertung der UDS zu ermöglichen. Die Präparate werden mikroskopisch auf Zeichen offener Zytotoxizität (z. B. Pyknose, verringerte Werte der radioaktiven Markierung) untersucht. Vor der Bestimmung der Körnerzahl sind die Objektträger zu kodieren. In der Regel werden je Tier 100 Zellen von mindestens zwei Objektträgern ausgewertet. Die Auswertung von weniger als 100 Zellen/Tier ist zu begründen. Bei der Körnerzahlbestimmung erfolgt keine Zählung der S-Phasen-Kerne, doch kann der Anteil der S-Phasen-Zellen erfaßt werden.

Das Ausmaß des  $^3\text{H-TdR}$ -Einbaus im Zellkern und Zytoplasma morphologisch normaler Zellen, das an der Ablagerung von Silberkörnern ablesbar ist, sollte durch geeignete Verfahren ermittelt werden.

Die Körnerzahl wird über dem Zellkern (NG) und über kernäquivalenten Bereichen des Zytoplasmas (CG) ermittelt. Als CG-Wert kommt entweder die für den am stärksten markierten Bereich des Zytoplasmas ermittelte Körnerzahl oder der Durchschnittswert von zwei bis drei nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Bereichen in Nähe des Zellkerns in Frage. Auch andere Zählverfahren (z. B. Ganzzellenzählung) können bei entsprechender Begründung angewendet werden (6).

## 2. DATEN

### 2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Es sind die Daten für die einzelnen Objektträger und Tiere zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefaßt werden. Die Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG) ist für jede Zelle, für jedes Tier und für jede Dosis und jeden Zeitpunkt zu bestimmen, indem der CG-Wert vom NG-Wert subtrahiert wird. Werden die „in Reparatur befindlichen Zellen“ gezählt, so sollten die Kriterien für die Definition der „in Reparatur befindlichen Zellen“ begründet werden und auf historischen oder gleichzeitigen Negativkontrolldaten beruhen. Numerische Ergebnisse können mit Hilfe statistischer Verfahren bewertet werden. Kommen statistische Tests zur Anwendung, so sind sie vor Durchführung der Studie auszuwählen und zu begründen.

### 2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Als Beispiele für Kriterien zur Bestimmung positiver/negativer Reaktionen seien genannt:

- positiv (i) NNG-Werte oberhalb eines vorher festgelegten Schwellenwerts, der auf der Grundlage von historischen Daten des Labors zu begründen ist;
- oder (ii) NNG-Werte, die deutlich über den Werten der gleichzeitigen Kontrolle liegen;
- negativ (i) NNG-Werte, die unterhalb des historisch begründeten Schwellenwerts liegen;
- oder (ii) NNG-Werte, die nicht wesentlich über den Werten der gleichzeitigen Kontrolle liegen.

Es ist die biologische Relevanz der Daten zu untersuchen, d. h. es sind Parameter wie Variabilität der Tiere, Dosis-Wirkungs-Verhältnis und Zytotoxizität zu berücksichtigen. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen. Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Ein positiver Befund des In-vivo-UDS-Tests an Säugetierleberzellen deutet darauf hin, daß die Prüfsubstanz in vivo bei Säugetierleberzellen eine DNA-Schädigung hervorruft, die in vitro durch unplanmäßige DNA-Synthese repariert werden kann. Ein negativer Befund ist ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine mit diesem Test nachweisbare DNA-Schädigung induziert.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Prüfsubstanz in den allgemeinen Blutkreislauf bzw. in das spezifische Zielgewebe gelangt (z. B. systemische Toxizität).

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

#### Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

#### Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

#### Prüfbedingungen:

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für den Verabreichungsweg;
- ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;
- ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Methoden zur Leberzellenpräparation und -kultur;
- verwendetes autoradiographisches Verfahren;

- Anzahl der präparierten Objektträger und der ausgewerteten Zellen;
- Bewertungskriterien;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

- Mittelwerte der Körnerzahlen über dem Zellkern und über dem Zytoplasma sowie der Nettokörnerzahlen über dem Zellkern für jeden einzelnen Objektträger, jedes Tier und jede Gruppe;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Auswertung;
- Toxizitätszeichen;
- Daten zur gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Anzahl der ‚in Reparatur befindlichen Zellen‘, falls ermittelt;
- Anzahl der S-Phasen-Zellen, falls ermittelt;
- Lebensfähigkeit der Zellen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. LITERATURHINWEISE

- (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*, *Mutations 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.“

## ANHANG 5

SV:

3.2.3. *Farligt*

R65 Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.

Flytande ämnen och beredningar som på grund av sin låga viskositet utgör en fara för människa vid aspiration

- a) För ämnen och beredningar som innehåller alifatiska, alicykliska och aromatiska kolväten i en total koncentration av 10 % eller mer och
- har en flödestid mindre än 30 sekunder, uppmätt med en 3 mm utloppsbägare enligt ISO 2431, eller
  - har en kinematisk viskositet lägre än  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s vid 40 °C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas, enligt ISO 3104 och ISO 3105, eller
  - har en kinematisk viskositet lägre än  $7 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s vid 40 °C, bestämd från rotationsviskosimetri enligt ISO 3219.

Ämnen och beredningar, som uppfyller dessa kriterier, behöver dock inte klassificeras om de har en genomsnittlig ytspänning högre än 33 mN/m vid 25 °C, uppmätt med du Noüy tensiometer eller enligt de testmetoder som finns beskrivna i bilaga V del A.5.

- b) För ämnen och beredningar, baserat på praktiska erfarenheter från människa.

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DE-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die IT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

FI:

3.2.6.1 *Ihon tulehtuminen*

Seuraava vaaraa osoittava lauseka määräytyy alla esiteltävien perusteitten mukaan:

R38 Ärsyttää ihoa

- Aineet ja valmisteet aiheuttavat ihon merkittävän tulehtumisen enintään neljän tunnin altistuksessa määritettynä kanilla liitteessä V mainitulla ihoärsyttestillä. Tulehdus kestää vähintään 24 tuntia.

Ihon tulehdus on merkittävää, jos:

- a) punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo laskettuna kaikista koe-eläimistä on vähintään 2;
- b) tai kun liitteessä V tarkoitettua testiä on täydennetty käyttämällä kolmea koe-eläintä, vähintään kahden koe-eläimen ihon punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo on, jokaiselle koe-eläimelle laskettuna erikseen, vähintään 2.

Kummassakin tapauksessa keskiarvojen lasekmiseen on käytettävä kaikkia niitä lukuarvoja, jotka saadaan arvioitaessa vaikutusta 24 tunnin, 48 tunnin ja 72 tunnin välein.

Tulehdusta pidetään myös merkittävänä, jos ihon tulehtuminen jatkuu ainakin kahdella koe-elämellä havainnointiajan päättymiseen asti. Erityiset vaikutukset kuten esimerkiksi hyperplasia, hilseileminen, värin muutokset, halkeamat, ruvet ja karvojenlähtö on otettava huomioon.

Tähän liittyviä tietoja voidaan saada myös eläimillä tehtävistä ei-akuuttisista altistuskokeista (katso lauseketta R48 koskevat huomautukset jaksossa 2.d). Vaikutuksia pidetään merkittävänä, jos ne vastaavat edellä kuvattuja vaikutuksia.

- Aineet ja valmisteet, jotka aiheuttavat ihmisillä merkittävää ihotulehdusta, kun kosketus on ollut välitön, jatkuva tai toistuva.
- Orgaaniset peroksidit, paitsi jos on olemassa näyttöä siitä, että tällaista vaikutusta ei ole.

Tuntoharha ('paresthesia'):

Pyretroiditorjunta-aineen ihokosketuksen aiheuttamaa tuntoharhaa ihmisessä ei pidetä ärsytysvaikutuksena, joka oikeuttaisi luokituksen Xi; R38. S-lauseketta S24 on kuitenkin sovellettava aineisiin, joilla on tällainen vaikutus.

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DE-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die IT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die SV-Sprachfassung)

In Ziffer 6.2 (Sicherheitsratschläge für Stoffe und Zubereitungen):

DE:

**S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abwaschen** (vom Hersteller anzugeben)

- Anwendungsbereich:
  - sehr giftige, giftige oder ätzende Stoffe und Zubereitungen;
- Verwendung:
  - obligatorisch für sehr giftige Stoffe und Zubereitungen;
  - empfohlen für sonstige obengenannte Stoffe und Zubereitungen, insbesondere, wenn Wasser nicht die geeignete Spülflüssigkeit ist;
  - empfohlen für ätzende Stoffe und Zubereitungen, die an die allgemeine Öffentlichkeit abgegeben werden.

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die IT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FI-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die SV-Sprachfassung)

FI:

**S 29 Ei saa tyhjentää viemäriin**

— Soveltamisala:

- erittäin helposti syttyvät tai helposti syttyvät veteen sekoittumattomat nesteet,
- erittäin myrkylliset tai myrkylliset aineet ja valmisteet,
- ympäristölle vaaralliset aineet.

— Käytön perusteet:

- *pakollinen* yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville ympäristölle vaarallisille ja tunnuksella N luokitelluille aineille, jollei kyseessä ole aineen tarkoitettu käyttö,
- suositeltava yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville muille edellä mainituille aineille tai valmisteille, jollei kyseessä ole kemikaalin tarkoitettu käyttö.

(Betrifft nicht die ES-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DA-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die DE-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die EN-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die FR-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die IT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die NL-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die PT-Sprachfassung)

(Betrifft nicht die SV-Sprachfassung)

—

## ANHANG 6

## „ANHANG IX

## TEIL A

**Vorschriften für kindergesicherte Verschlüsse**

Zusätzlich zu den Bestimmungen in Artikel 22 Absatz 1 Buchstabe e) dieser Richtlinie müssen Behälter jeden Fassungsvermögens, die Stoffe enthalten, bei denen eine Aspirationsgefahr besteht (Xn; R65) und die gemäß Ziffer 3.2.3 des Anhangs VI dieser Richtlinie eingestuft und gekennzeichnet sind — abgesehen von Stoffen, die als Aerosole oder in Behältern mit einer versiegelten Sprühvorrichtung in Verkehr gebracht werden —, kindergesicherte Verschlüsse aufweisen.

1. *Wiederverschließbare Verpackungen*

Kindergesicherte Verschlüsse von wiederverschließbaren Verpackungen müssen der ISO-Norm 8317 (Ausgabe vom 1. Juli 1989) über ‚kindergesicherte Verpackungen — Anforderungen und Prüfverfahren für wiederverschließbare Verpackungen, angenommen durch die International Standard Organisation (ISO)‘ entsprechen.

2. *Nichtverschließbare Verpackungen*

Kindergesicherte Verschlüsse von nichtverschließbaren Verpackungen müssen der CEN-Norm EN 862 (Ausgabe vom März 1997) über ‚kindergesicherte Verpackungen — Anforderungen und Prüfverfahren für nichtverschließbare Verpackungen anderer Erzeugnisse als Arzneimittel‘, angenommen durch das Europäische Komitee für Normung (CEN), entsprechen.

3. *Bemerkungen*

1. Nur Laboratorien, die nachweislich den europäischen Normen der Serie 45 000 entsprechen, sind zur Bescheinigung der Übereinstimmung mit der obenerwähnten Norm befugt.

2. *Sonderfälle*

Ist eine Verpackung offensichtlich in ausreichendem Maße kindergesichert, weil deren Inhalt Kindern ohne Werkzeug nicht zugänglich ist, so kann die Probe unterlassen werden.

In allen anderen Fällen und bei berechtigten Zweifeln an der Wirksamkeit des kindergesicherten Verschlusses kann die einzelstaatliche Behörde von dem für das Inverkehrbringen Verantwortlichen eine Bescheinigung nachstehender Punkte durch ein den Bestimmungen gemäß Ziffer 3.1 entsprechendes Laboratorium anfordern:

- Der verwendete Verschuß ist so beschaffen, daß er keine Prüfung nach den obenerwähnten ISO- bzw. CEN-Normen erfordert, oder
- der betreffende Verschuß ist den in den obenerwähnten Normen vorgesehenen Prüfungen unterworfen worden und entspricht den geltenden Vorschriften.

## TEIL B

**Vorschriften für tastbare Warnzeichen**

Die technischen Spezifikationen für tastbare Warnzeichen müssen der EN/ISO-Norm 11683 (Ausgabe 1997) über ‚Verpackung — Tastbare Gefahrenhinweise — Anforderungen‘ entsprechen.“

---