

---

**Mutageniteitstests met reporter genen  
bij dieren**

---

**The use of reporter genes for mutagenicity  
testing in animals**

---

**G**





Aan de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport

---

Onderwerp : aanbieding advies over mutageniteitstests met reporter genen bij dieren  
Uw kenmerk : GZB/C&O/2268208  
Ons kenmerk : U-1715/EvV/RA/246-D10  
Bijlagen : 2  
Datum : 24 januari 2005

Mijnheer de minister,

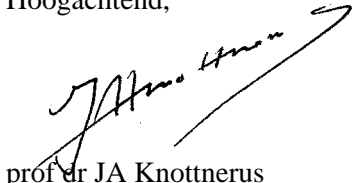
Hierbij bied ik u een advies aan over mutageniteitstests met reporter genen bij dieren. Het is op verzoek van uw ambtsvoorganger opgesteld door de Commissie Beoordeling Carcinogeniteit van Stoffen. Het is beoordeeld door de Beraadsgroep Gezondheid en Omgeving, en enkele buitenlandse en Nederlandse deskundigen van buiten de Gezondheidsraad.

De commissie concludeert dat testsystemen met reporter genen bij dieren op dit moment niet geschikt zijn om chemische stoffen gestandaardiseerd te onderzoeken op genotoxische eigenschappen. Wel ziet zij op dit moment reeds mogelijkheden om de variatie in de wijze waarop tests met deze systemen worden uitgevoerd te verkleinen. Deze schetst ze op hoofdlijnen. De verdere uitwerking kan naar haar mening het beste geschieden in OESO-verband.

Vorbereidingen voor uitwerking van de voorschriften door de OESO worden reeds getroffen. Ook in het kader van het *International Programme on Chemical Safety* van de WHO wordt een rapport over mutageniteitstests met reporter genen bij dieren opgesteld. Ik geef u ter overweging het advies ter kennisname aan deze organisaties aan te bieden.

Ik heb dit advies vandaag ook aangeboden aan de staatssecretaris van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.

Hoogachtend,



prof. dr JA Knottnerus



---

# **Mutageniteitstests met reporterogenen bij dieren**

---

---

aan:

de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport  
de staatssecretaris van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer

---

Nr 2005/01, Den Haag, 24 januari 2005

---

---

De Gezondheidsraad, ingesteld in 1902, is een adviesorgaan met als taak de regering en het parlement ‘voor te lichten over de stand der wetenschap ten aanzien van vraagstukken op het gebied van de volksgezondheid’ (art. 21 Gezondheidswet).

De Gezondheidsraad ontvangt de meeste adviesvragen van de bewindslieden van Volksgezondheid, Welzijn & Sport; Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening & Milieubeheer; Sociale Zaken & Werkgelegenheid en Landbouw, Natuur & Voedselkwaliteit. De raad kan ook eigener beweging adviezen uitbrengen. Het gaat dan als regel om het signaleren van ontwikkelingen of trends die van belang kunnen zijn voor het overheidsbeleid.

De adviezen van de Gezondheidsraad zijn openbaar en worden in bijna alle gevallen opgesteld door multidisciplinaire commissies van – op persoonlijke titel benoemde – Nederlandse en soms buitenlandse deskundigen.



De Gezondheidsraad is lid van het International Network of Agencies for Health Technology Assessment (INAHTA). INAHTA bevordert de uitwisseling en samenwerking tussen de leden van het netwerk.

---

U kunt het advies downloaden van [www.gr.nl](http://www.gr.nl).

---

Deze publicatie kan als volgt worden aangehaald:  
Gezondheidsraad. Mutageniteitstests met reportergenen bij dieren. Den Haag: Gezondheidsraad, 2005; publicatie nr 2005/01.

Preferred citation:  
Health Council of the Netherlands. The use of reporter genes for mutagenicity testing in animals. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2005; publication no. 2005/01.

---

auteursrecht voorbehouden

all rights reserved

---

ISBN: 90-5549-552-2

---

---

# Inhoud

---

Samenvatting *9*

---

1 Inleiding *15*

1.1 Vraagstelling en commissie *15*

1.2 Verantwoording *15*

1.3 Indeling van het advies *16*

---

2 Testen op mutageniteit *17*

2.1 Invloed op erfelijk materiaal *17*

2.2 Detecteren van wijzigingen in het DNA *18*

2.3 Nieuwe mutageniteitstests *19*

---

3 Resultaten van nieuwe tests *21*

3.1 Selectie van testsystemen *21*

3.2 Classificatie van stoffen op basis van klassieke tests *22*

3.3 Uitslagen van nieuwe tests *24*

3.4 Bijzonderheden in de testopzet *25*

3.5 Testprestaties en reproduceerbaarheid van testuitslagen *27*

---

---

4	Conclusies en aanbevelingen	29
4.1	Betrouwbaarheid	29
4.2	Bruikbaarheid voor risicobeoordeling	33
4.3	Aanbevelingen voor verdere validatie en standaardisatie	34
4.4	Aanbevelingen voor inpassing in de gangbare teststrategie	36

---

Literatuur 39

---

Bijlagen 53

A	Adviesaanvraag	55
B	Commissie	57
C	Begrippenlijst	59
D	Overzicht van stoffen en hun testuitslagen	61

---

Engelse vertaling 71



---

# Samenvatting

---

## Adviesvraag over nieuwe testmethode

Chemische stoffen die het erfelijk materiaal (DNA) in het lichaam kunnen veranderen hebben zogenoemde genotoxische eigenschappen. Wanneer wijzigingen in het DNA onomkeerbaar worden, is er sprake van mutaties. In alle soorten lichaamscellen kunnen deze leiden tot kanker; in geslachtscellen kunnen mutaties bovendien worden doorgegeven aan volgende generaties. Het onderzoek naar genotoxische eigenschappen van chemische stoffen vormt de basis voor maatregelen om die risico's te reduceren.

Genotoxiciteit is vast te stellen met verschillende tests. Belangrijk zijn de mutageniteitstests: daarmee kunnen veranderingen in het DNA opgespoord worden. Bij in vivo tests worden proefdieren blootgesteld aan de te onderzoeken stof, in vitro zijn dit cellen of micro-organismen. Als in vitro en in vivo onderzoek tegenstrijdige uitslagen laten zien, geven de bevindingen uit proefdieronderzoek doorgaans de doorslag, omdat dit dichterbij de mens staat. Verder worden ook indirecte aanwijzingen voor genotoxiciteit uit onder meer (in vitro of in vivo) onderzoek op de vorming van DNA-adducten (covalente binding aan DNA) meegewogen in het oordeel over genotoxiciteit. In dit advies zijn de in vivo gegevens eveneens beslissend en staat (niet-)genotoxisch voor (niet-)genotoxisch in vivo.

Mutageniteit kan zich uiten in de vorm van chromosoomafwijkingen en genmutaties. Deze treden op als het DNA niet voldoende kan worden hersteld voor de celdeling. Tot op heden zijn er gestandaardiseerde en praktische in vitro genotoxiciteitstests voor chromosoomafwijkingen, genmutaties en DNA-herstel. De eerste twee zijn mutageni-

---

teitstests; met de laatste wordt indirect bepaald of een stof al dan niet genotoxisch is. Voor chromosoomafwijkingen en voor DNA-herstel zijn er daarnaast in vivo pendanten. Een gestandaardiseerde en praktische in vivo test voor genmutaties bestaat echter nog niet.

Wel zijn er inmiddels nieuwe in vivo tests ontwikkeld voor het opsporen van stoffen die genmutaties kunnen veroorzaken. Bij de nieuwe tests worden genmutaties gedetecteerd met reporter genen. Dit betekent dat een bepaald gen (drager van een erfelijke eigenschap), en niet het totale DNA, op genmutaties wordt onderzocht. De reporter genen zijn van endogene oorsprong, dat wil zeggen van nature aanwezig, of ze zijn transgeen, dat wil zeggen soortvreemd en via genetische modificatie ingevoegd in het endogene DNA.

De minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport heeft de Gezondheidsraad gevraagd of deze nieuwe genmutatietests met dieren geschikt zijn om te gebruiken in het routineveiligheidsonderzoek naar chemische stoffen. Een commissie van de Raad heeft beoordeeld of ze de genoemde lacune in het veiligheidsonderzoek van stoffen kunnen dichten. Voor haar advies heeft zij enkele Nederlandse en buitenlandse deskundigen van buiten de Raad geconsulteerd.

---

### **Werkwijze van de commissie**

Om te beoordelen of de mutageniteitstests met reporter genen in proefdieren betrouwbare resultaten geven, heeft de commissie de resultaten uit die nieuwe tests vergeleken met de conclusie uit het eerder beschreven klassieke onderzoek op genotoxiciteit. Overeenkomende resultaten geven een indicatie van het vermogen van de nieuwe test om genotoxiciteit of het ontbreken hiervan vast te stellen.

De commissie heeft zich beperkt tot uitspraken over tests met proefdieren met twee verschillende transgene reporter genen, omdat alleen daarvoor testuitslagen van voldoende stoffen openbaar zijn om verantwoord conclusies te kunnen trekken over testprestaties als gevoeligheid (kans dat een genotoxische stof positief scoort) en specificiteit (kans dat een niet-genotoxische stof negatief scoort).

De proefdieren met transgene reporter genen waarvoor testresultaten van genoeg stoffen zijn gerapporteerd in de literatuur die toegankelijk is via Medline, zijn de ratten- en muizenstammen Big Blue® en de muizenstam Muta™Mouse. Er zijn testuitslagen van in totaal 64 genotoxische en niet-genotoxische stoffen. De tests zijn echter op uiteenlopende wijze gedaan. Zo verschillen ze bijvoorbeeld qua blootstellingsniveau en -duur en qua geanalyseerde organen.

---

## Oordeel over betrouwbaarheid van nieuwe tests

De commissie concludeert uit de testprestaties dat tests met reporter genen bij de geselecteerde ratten- en muizenstammen in beginsel geschikt zijn om stoffen te onderzoeken op hun vermogen genmutaties te veroorzaken. De betrouwbaarheid van de tests is echter (nog) onvoldoende voor routinematige toepassing. Ten eerste laten de gegevens geen afleiding toe van een standaardvoorschrift, waarin de wijze van uitvoering in grote lijnen is vastgelegd. Verder zijn de testkenmerken gevoeligheid en specificiteit wel hoog, maar deze getallen zijn ontoereikend onderbouwd en daarom voorlopig.

De stoffen waarop de getallen berusten zijn namelijk niet representatief. Er zijn relatief weinig niet-genotoxische stoffen getest en bij de genotoxische stoffen zijn sterk genotoxische stoffen oververtegenwoordigd. Aan de berekende testkenmerken kent de commissie daarom slechts indicatieve waarde toe. Verder is de reproduceerbaarheid van positieve en negatieve uitslagen onvoldoende onderzocht.

De testkarakteristieken geven de commissie geen aanleiding te veronderstellen dat de genoemde muizen- en rattenstammen van elkaar verschillen in geschiktheid om genotoxische en niet-genotoxische stoffen te onderscheiden.

Er zijn foutnegatieve én foutpositieve uitslagen opgetreden. De oorzaak van de foutnegatieve resultaten kan liggen in de wijze waarop de test is gedaan, bijvoorbeeld met te korte blootstelling of expressietijd. Anderzijds zouden deze bevindingen ook verklaard kunnen worden met relatief lage gevoeligheid van de methode. Beide verklaringen wijzen op falen van de nieuwe test.

Bij de foutpositieve scores zoekt de commissie de verklaring in het tekortschieten van de onderzoeksmethoden die tezamen als norm hebben gediend. Met de nieuwe test-systemen kan worden bepaald of stoffen in staat zijn genmutaties in vivo te veroorzaken. Dit laat zich niet vaststellen met de methoden waarmee ze vergeleken zijn. Daarom neemt de commissie aan dat het om stoffen gaat die genotoxisch zijn, maar met de gebruikelijke in vivo tests niet als zodanig zijn herkend. Zij beveelt aan voorlopig een positieve score in de nieuwe testsystemen te beschouwen als teken van genotoxische eigenschappen, maar een negatieve score niet als bewijs voor het ontbreken hiervan.

De foutnegatieve scores bij de voortplantingsorganen vormen een geval apart. De testsystemen zijn niet geschikt om stoffen op mutageniteit te onderzoeken in geslachtscellen in bepaalde stadia van rijping. Dit heeft een technische reden: met een reporter gen is het niet mogelijk om mutagene werking aan te tonen in de stadia na de meiose (reductiedeling). Stoffen die enkel mutageen zijn in deze stadia scoren daarom negatief in geslachtscellen.

---

## Oordeel over bruikbaarheid in routineveiligheidsonderzoek

De in vivo testsystemen met transgene reporter genen zijn zeer flexibel. Ze onderscheiden zich van de bestaande, gestandaardiseerde in vivo testsystemen doordat in principe cellen in alle organen kunnen worden onderzocht behalve in de voortplantingsorganen de geslachtscellen in een laat stadium van ontwikkeling. Dit maakt maatwerk mogelijk, waardoor de opzet van de proef kan aansluiten bij eerdere toxicologische bevindingen over de stof. Dit verkleint de kans op foutnegatieve uitslagen. Routinematige toepassing veronderstelt echter een standaardvoorschrift. De beschikbare gegevens laten volgens de commissie het opstellen van een dergelijk protocol op dit moment niet toe.

De commissie concludeert dan ook dat de testsystemen met de genoemde transgene dieren (nog) niet gestandaardiseerd inzetbaar zijn. Wel vindt zij de kennis voldoende om tests met deze systemen op ad hoc basis toe te laten, mits de opzet ervan goed wordt beargumenteerd. De werkwijze moet dus worden afgestemd op de reeds beschikbare kennis over de toxiciteit van de te testen stof. Afgezien van geslachtscellen in een laat stadium van ontwikkeling komen cellen uit elk orgaan of weefsel in aanmerking voor onderzoek.

---

## Aanbevelingen voor verder onderzoek

De toekomst zal moeten leren of de tests op den duur met grotere betrouwbaarheid kunnen worden uitgevoerd en volgens een standaardprotocol, of anders in ieder geval met minder variatie in werkwijze. De commissie doet enige suggesties voor een proefopzet die dit doel naderbij kan brengen. In eerste instantie zou het voorschrift op onderdelen vast moeten komen te liggen, bijvoorbeeld welke organen geanalyseerd dienen te worden bij welke blootstellingsroute. Zo worden de verschillen in proefopzet enigermate gereduceerd en wordt het voorschrift bruikbaar voor een breed scala aan stoffen waarvan de veiligheid niet of zeer summier is onderzocht. Bij stoffen waarover gegevens voorhanden zijn die meer aanknopingspunten bieden voor de proefopzet dient het voorlopig mogelijk te blijven hiervan af te wijken om de proefopzet nauwkeuriger bij deze data aan te laten sluiten. De werkwijze moet dus voorlopig in alle gevallen door de onderzoeker gemotiveerd worden. Het uitwerken van het protocol kan volgens de commissie het beste in OESO-verband geschieden. Van een volgens OESO-protocol uitgevoerde test wordt de uitslag namelijk erkend door alle bij de OESO aangesloten landen.

Voor het vergroten van de betrouwbaarheid van de testsystemen is het ook nodig meer stoffen te testen. Hierbij denkt de commissie aan stoffen waarvan vaststaat dat ze zwak genotoxisch zijn. Ook denkt ze aan erkende niet-genotoxische stoffen. Deze twee categorieën lopen in aantallen namelijk nog ver achter.

---

---

## **Aanbevelingen voor inpassing in veiligheidsonderzoek**

De in vivo tests met transgene reportergenen kunnen hun nut bewijzen als onderdeel van het genotoxiciteitsonderzoek dat de EU tegenwoordig voorschrijft. De EU verlangt een dossier met standaard-toxicologische gegevens van de producent of degene die de stof voor commerciële doeleinden gebruikt of in de handel brengt. Bij het onderdeel genotoxiciteit worden de resultaten van stapsgewijs uitgevoerde in vitro en in vivo tests gevraagd. Welke genotoxiciteitstests in de verschillende stappen toegestaan of verplicht zijn, wordt bepaald door het productievolume en de toepassing van de stof (bijvoorbeeld gewasbescherming).

Ondanks deze verschillen in teststrategie vindt de commissie inzet van de nieuwe testsystemen voor alle beleidsterreinen met stoffenregelgeving het overwegen waard. Op enkele hiervan is de test reeds toegestaan mits er sprake is van een goed gemotiveerde proefopzet. Voor de overige terreinen beveelt de commissie aan de test met dezelfde randvoorwaarden toe te laten.

De test vormt een waardevolle aanvulling op het gangbare testrepertoire, maar is in verhouding tot de ingeburgerde tests bewerkelijk en tijdrovend. Bovendien ontbreekt standaardisatie, een belangrijke voorwaarde voor validatie. Daarom vindt de commissie hem vooralsnog geschikt voor ad hoc aanvulling op de gangbare tests.



# Inleiding

---

## 1.1 Vraagstelling en commissie

Mutageniteitstests vormen een vast onderdeel bij het onderzoeken van schadelijke eigenschappen van chemische stoffen<sup>1-3</sup>. Met mutageniteitstests worden wijzigingen in erfelijk materiaal geconstateerd die zijn opgetreden na blootstelling aan deze stoffen. Deze wijzigingen kunnen tot onder meer kanker leiden.

Voormalig minister Borst van Volksgezondheid, Welzijn en Sport heeft de Gezondheidsraad om advies gevraagd over de bruikbaarheid van een nieuw type mutageniteits-test (zie bijlage A). Bij dit type test wordt niet het gehele DNA onderzocht, maar slechts een deel: het zogenoemde reporter-gen.

De voorzitter van de raad heeft de Commissie Beoordeling Carcinogeniteit van Stoffen – in dit advies verder aangeduid met ‘de commissie’ – verzocht deze adviesaanvraag te beantwoorden. De huidige samenstelling van de commissie staat vermeld in bijlage B.

---

## 1.2 Verantwoording

De wetenschappelijke basis van het advies wordt gevormd door publicaties verkregen met on-line zoeken in PubMed (Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Gezocht is met de trefwoorden ‘mutagens’, ‘mutagenicity tests’, ‘knockout mice’, ‘reporter genes’ en ‘genetically modified animals’. Uit de resulterende lijst zijn de overzichtsartikelen geselecteerd die een beschouwing bevatten over de bruikbaarheid

---

van de methode voor het routine toxicologisch onderzoek. Zo nodig zijn in die publicaties aangehaalde literatuurbronnen geraadpleegd. Ook geraadpleegd zijn een overzichtsrapport van RIVM en TNO, alsmede publicaties van recente datum die niet in de overzichten zijn verwerkt. Het literatuuronderzoek is afgesloten op 15 oktober 2004. De commissie heeft voor haar advies verder enkele Nederlandse en buitenlandse deskundigen van buiten de Gezondheidsraad geconsulteerd.

De omschrijvingen van de sleutelbegrippen in het advies, genotoxiciteit en mutageniteit, zijn aan internationale afspraken ontleend. In het verleden heeft de commissie eigen definities gehanteerd <sup>2,3</sup>. Inmiddels geeft zij echter de voorkeur aan in internationaal verband overeengekomen begripsomschrijvingen. De OESO en het *International Programme on Chemical Safety* van de WHO hebben een gezamenlijke begrippenlijst voor risicobeoordeling <sup>4</sup>. De genoemde begrippen zijn echter nog niet opgenomen in deze lijst. Ook het *Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals* van de VN is incompleet <sup>5</sup>. Daarom heeft de commissie besloten de definitie van genotoxiciteit en die van mutageniteit van de EU over te nemen.

---

### 1.3 Indeling van het advies

Het advies is als volgt opgebouwd. In hoofdstuk 2 wordt achtergrondinformatie gegeven over mutageniteit en de testmethoden om die op het spoor te komen. Hoofdstuk 3 bevat een beschrijving van nieuwe mutageniteitstests met zogenoemde reporter genen en geeft een overzicht van wat bekend is over de testeigenschappen gevoeligheid, specificiteit en voorspellende waarde. Daarna wordt in hoofdstuk 4 de bruikbaarheid van de nieuwe mutageniteitstests voor routine-onderzoek beoordeeld, en worden aanbevelingen gedaan voor verdere validatie en standaardisatie en inpassing in het veiligheidsbeleid van de EU voor chemische stoffen. Daarmee is dan de adviesvraag beantwoord.



---

## Testen op mutageniteit

---

### 2.1 Invloed op erfelijk materiaal

Veranderingen in het erfelijk materiaal van organismen, DNA, zijn potentieel nadelig. Dergelijke veranderingen kunnen niet alleen spontaan ontstaan, maar ook door bepaalde chemische stoffen en sommige vormen van straling teweeg worden gebracht. Deze agentia worden daarom genotoxisch genoemd: ze bezitten het vermogen om potentieel schadelijke veranderingen in het DNA aan te brengen <sup>6</sup>.

Veranderingen in het DNA zijn omkeerbaar totdat het DNA voorafgaand aan de celdeling wordt verdubbeld. Tot dat moment kunnen de veranderingen namelijk nog door zogenoemde DNA-herstelenzymen ongedaan worden gemaakt. Als herstel niet voor de verdubbeling van het DNA plaatsvindt, wordt een wijziging onomkeerbaar en vervolgens, bij celdeling, doorgegeven aan dochtercellen.

Is een verandering in het DNA eenmaal onomkeerbaar, dan spreekt men van een mutatie. Hieronder verstaat de commissie een permanente, overdraagbare wijziging in de hoeveelheid of structuur van het erfelijk materiaal van cellen of organismen <sup>6</sup>. Mutaties in het DNA kunnen in alle lichaamcellen tot kanker leiden. In geslachtscellen kunnen ze bovendien aan volgende generaties worden doorgegeven.

Mutageen wordt een stof genoemd wanneer uit een test gebleken is dat hij mutaties kan veroorzaken. Een dergelijke stof is per definitie genotoxisch. Genotoxiciteit kan echter ook blijken uit bijvoorbeeld vorming van DNA-adducten (covalente binding aan DNA), een indirecte aanwijzing dat de stof DNA kan beschadigen.

---

Of stoffen al dan niet genotoxische eigenschappen bezitten is van belang voor het beleid. Van genotoxische stoffen wordt aangenomen dat ze geen drempel kennen: een blootstellingsniveau waar beneden geen nadelige gezondheidseffecten te verwachten zijn <sup>2,3</sup>. Niet-genotoxische stoffen worden geacht wel zo'n drempel te kennen. De indeling van stoffen in genotoxisch en niet-genotoxisch is daarom een van de pijlers van het stoffenbeleid op nationaal en EU-niveau.

Genotoxiciteit is een sterke aanwijzing dat de stof ook kankerverwekkend (carcinoogeen) is. Geconstateerde genotoxiciteit kan daarom reden zijn om onderzoek naar carcinogeniteit achterwege te laten en van verdere toepassing van de stof af te zien. Indien de stof niet gemist kan worden, volgt onderzoek op carcinogeniteit. Bij een positieve uitslag wordt vervolgens een risicoschatting gemaakt om een bovengrens aan de blootstelling te stellen. Via de genotoxische eigenschappen zijn niet alle veroorzakers van kanker te herkennen. Er zijn namelijk ook stoffen waarvan de carcinogeniteit op andere mechanismen berust dan wijziging van het erfelijk materiaal. Dit zijn de zogenoemde niet-genotoxische carcinogenen.

Bewijs voor genotoxiciteit in geslachtscellen vormt de basis voor specifieke overheidsmaatregelen. Zo is toepassing van een stof in consumentenproducten verboden als is aangetoond dat deze mutageen is én de voortplantingsorganen van de blootgestelde kan bereiken <sup>7</sup>. Gebruik voor dat doel is ook niet geoorloofd wanneer de mutageniteit rechtstreeks in geslachtscellen is gedemonstreerd.

---

## 2.2 Detecteren van wijzigingen in het DNA

De genotoxische werking van een stof detecteren onderzoekers met genotoxiciteitstests. Die vallen uiteen in twee groepen: tests waarmee men mutageniteit aantoonst en tests waarmee andere variabelen dan mutaties worden gedetecteerd. Tot de laatste behoort bijvoorbeeld een test op Unscheduled DNA Synthesis (UDS). Die detecteert DNA-herstelsynthese – een indirect bewijs voor genotoxiciteit.

Tests waarmee mutageniteit kan worden vastgesteld zijn er in soorten en maten: in vitro, met cellen of micro-organismen, en in vivo, met proefdieren. Eventueel kunnen de tests in stappen worden uitgevoerd. Dit wil zeggen dat na een beperkt aantal tests kan worden besloten een stof niet verder te onderzoeken wanneer de resultaten erop wijzen dat de stof genotoxisch is en daarom wordt besloten de stof niet te gebruiken of het gebruik ervan te staken. Bij tegenstrijdige uitslagen in vitro en in vivo geven de laatste in het algemeen de doorslag, omdat ze meer over de mens zeggen <sup>2</sup>. De reden is dat in het laatste geval proefdieren worden blootgesteld en niet slechts cellen van mens of dier, of micro-organismen. Zo worden ook stoffen herkend die zelf niet genotoxisch zijn, maar in voornamelijk de lever worden omgezet in metabolieten die dat wel zijn. Bovendien worden lichaamscellen op fysiologische wijze blootgesteld.

---

Mutageniteitstests verschillen in de aard van de mutaties die ermee wordt aangetoond. Mutaties zijn onder te verdelen in genmutaties en chromosoomafwijkingen<sup>2</sup>. Genmutaties zijn veranderingen binnen een gen\*, zoals basepaarssubstituties (vervanging van baseparen in het DNA door andere baseparen) en kleine deleties (verlies van stukjes DNA). Chromosoomafwijkingen zijn het gevolg van breuken in de chromosomen of van een onjuiste verdeling van de chromosomen tussen de dochtercellen tijdens de celdeling.

Voor een beperkt aantal mutageniteitstests heeft de EU de wijze van uitvoering in het kader van haar stoffenbeleid vastgelegd in voorschriften, die vrijwel allemaal zijn overgenomen van de OESO. Van een volgens OESO-protocol uitgevoerde test wordt de uitslag erkend door alle bij de OESO aangesloten landen, dus door onder meer de lidstaten van de EU, de VS, Canada, Australië en Japan. OESO-voorschriften zijn er voor diverse in vitro tests op genmutaties en chromosoomafwijkingen. Ze bestaan ook voor enkele in vivo tests, zoals de micronucleustest, die chromosoombreuken en -verlies detecteert, en de reeds genoemde test op UDS.

Tot nu toe zijn er echter geen gestandaardiseerde in vivo tests voor genmutaties. Een uitzondering is de vlekentest\*\*. Deze test vergt echter veel proefdieren en is daarom niet in zwang. In plaats hiervan doet men vaak de test op UDS. De tests die in dit advies centraal staan lijken in de lacune van de in vivo test voor genmutaties te kunnen voorzien. In de volgende paragrafen worden ze geïntroduceerd, waarna in hoofdstuk 3 de testprestaties worden besproken en in hoofdstuk 4 een oordeel wordt gegeven over de bruikbaarheid voor de risicobeoordeling.

---

### 2.3 Nieuwe mutageniteitstests

Er zijn verscheidene nieuwe in vivo tests met muizen en ratten voor het aantonen van genmutaties. Een overzicht hiervan geeft een recent RIVM/TNO-rapport<sup>8</sup>. Kenmerkend voor de tests is dat een specifiek gen, het zogenoemde reportergen, op mutaties wordt onderzocht, en niet het totale DNA. Op grond van het soort reportergen kunnen de tests worden ingedeeld in twee groepen, die hier beide besproken worden. Het ene type test maakt gebruik van endogene reportergenen, die van nature in de proefdieren aanwezig zijn, het andere van vreemde (transgene) reportergenen, die via genetische modificatie in het normale DNA zijn ingevoegd.

---

\* drager van een erfelijke eigenschap

\*\* genmutaties worden gedetecteerd als vlekken in de vacht met afwijkende kleur

---

## Endogene reportergenen

Bij tests gebaseerd op endogene reportergenen gaat het in de meeste gevallen om genen die coderen voor de enzymen hypoxantine-fosforibosyl-transferase (HPRT), thymidine-kinase (TK) en adenosine-fosforibosyl-transferase (APRT). De detectie van mutaties berust op het verloren gaan van de enzymfunctie door de mutatie.

Het HPRT-gen ligt op het X-chromosoom. Aangezien mannelijke en vrouwelijke cellen beide één actief allel bevatten, kan detectie geschieden met normale, niet genetisch gemodificeerde muizen- of rattenstammen. De TK- en APRT-genen daarentegen liggen op andere chromosomen dan de geslachtschromosomen. Van deze genen zijn beide allelen actief. Aangezien mutaties in deze genen recessief overerven, zijn met de zogenoemde knockouttechniek muizenstammen gecreëerd die in alle lichaamscellen nog slechts een van de twee actieve allelen bezitten. Met deze stammen kunnen eveneens mutaties worden gedetecteerd doordat werkzaam enzym ontbreekt. In dat geval is er dus sprake van een endogeen reporter-gen én genetische modificatie van de proefdieren.

De mutatiefrequentie, dat wil zeggen het aantal mutaties per reportergenkopie, wordt bepaald in organen of weefsels waarvan de cellen in kweek kunnen worden gehouden, zoals de milt. Hiertoe worden de cellen gekweekt op een voedingsbodem met een substraat dat door het enzym HPRT, TK of APRT wordt omgezet tot een toxisch product. Cellen met mutaties produceren het desbetreffende enzym niet en kunnen dus overleven, ongemuteerde cellen produceren het wel en gaan dood.

## Transgene reportergenen

Het andere type test maakt gebruik van muizen- en rattenstammen met een transgeen reporter-gen van bacteriële oorsprong. Dit gen zit in alle lichaamscellen. Om de mutatiefrequentie te bepalen wordt het totale DNA uit een orgaan of weefsel geïsoleerd. Hierna wordt het reporter-gen geïsoleerd en 'verpakt' in een bacteriofaag of plasmide. Vervolgens wordt dit pakket in een bacteriestam gebracht die het bewuste reporter-gen mist. De bacteriën worden onderworpen aan een kleurtest waarin alleen bacteriën met een gemuteerd reporter-gen kleuren, of dat juist niet doen. Ook kunnen ze op een voedingsbodem worden gezet waarop alleen de mutanten kunnen overleven. Aangezien DNA kan worden gewonnen uit elk orgaan, kent deze variant in beginsel geen weefselrestrictie.

Voor dit type test zijn het meest in zwang Muta<sup>TM</sup>Mouse (MM), een muizenstam met het reporter-gen lacZ, en Big Blue<sup>®</sup> -muizen en -ratten (BB), dragers van het reporter-gen lacI.

## **Resultaten van nieuwe tests**

---

Uit de beschikbare wetenschappelijke literatuur kan worden afgeleid in hoeverre stoffen met en stoffen zonder genotoxische eigenschappen te herkennen zijn met de nieuwe mutageniteitstests op basis van reporter genen. De resultaten van deze twee groepen stoffen in de bewuste tests kunnen namelijk vergeleken worden met wat al uit klassiek onderzoek bekend is over de genotoxiciteit. Voordat de commissie in dit hoofdstuk bespreekt tot welke bevindingen ze met deze werkwijze is gekomen, verantwoordt ze eerst nog welke testsystemen op basis van reporter genen ze heeft beoordeeld.

---

### **3.1 Selectie van testsystemen**

De testsystemen met van nature aanwezige en ingebrachte reporter genen hebben beide voor- en nadelen. Bij endogene reporter genen kan men alleen organen bestuderen waarvan de cellen kunnen worden gekweekt. Daartegenover staat het voordeel van een lage frequentie van spontane mutaties.

De transgene systemen hebben als belangrijkste voordeel dat in beginsel alle organen en orgaansystemen voor analyse in aanmerking komen. Wel verschillen ze in het gemak waarmee het DNA daaruit kan worden gewonnen en de hoeveelheid van het reporter gen die kan worden verkregen. De keuzevrijheid bij organen kan van belang zijn als men op grond van voorkennis over een stof het onderzoek op bepaalde organen wil richten.

Het voornaamste nadeel van transgene systemen is een hoog aantal spontane mutaties per kopie van het – in elke lichaamscel in veelvoud aanwezige – reporter gen. Dit

---

kan wellicht als volgt verklaard worden. Bij transgene systemen wordt de mutatiefrequentie uiteindelijk afgelezen in bacteriën. In de bacteriën kan het reporter-gen nog mutaties oplopen<sup>9,10</sup>. Bij endogene systemen ontbreekt de stap met de bacteriën. Dit verklaart waarschijnlijk waarom de transgene systemen een hogere spontane mutatiefrequentie vertonen dan de endogene. Mogelijk kunnen ze hierdoor een kleiner percentage genotoxische stoffen detecteren. Onderzocht is dit echter niet.

Hoewel ze tijdrovender en bewerkelijker zijn dan de gebruikelijke in vivo mutageniteitstests, vindt de commissie de nieuwe methodieken met reporter-genen veelbelovend voor het onderzoek naar de genotoxische eigenschappen van stoffen. In beginsel zijn alle varianten geschikt voor dit doel. Er zijn geen wetenschappelijke redenen om bepaalde varianten uit te sluiten.

Toch heeft de commissie niet alle genetisch gemodificeerde muizen- en rattenstammen beoordeeld waarmee een genmutatietest kan worden uitgevoerd. Ze bespreekt alleen de testresultaten met genetisch gemodificeerde muizen- en rattenstammen waarin voldoende stoffen zijn getest om verantwoord conclusies te kunnen trekken. Dit bleek slechts voor de transgene BB en MM te gelden. Hiervoor zijn testuitslagen beschikbaar van circa honderd stoffen<sup>11-13</sup>. Voor dit advies vallen onder BB en MM de commercieel verkrijgbare stammen en de ouderlijnen waarvan deze nakomelingen zijn. In enkele overzichtsartikelen wordt hun betekenis voor het opsporen van carcinogene eigenschappen besproken<sup>11,13</sup>. De commissie concentreert zich echter op de genotoxische eigenschappen. De reden is dat de testsystemen mutageniteit detecteren en dat het verband tussen carcinogeniteit en (deze uiting van) genotoxiciteit niet één op één is. Er zijn immers ook niet-genotoxische carcinogenen.

Verder heeft de commissie een beperking aangebracht in het aantal stoffen waaraan zij haar conclusies ontleent. Er zijn testuitslagen beschikbaar van zo'n honderd stoffen<sup>11-13</sup>. De commissie heeft zich echter uitsluitend een oordeel gevormd op basis van de stoffen waarvoor proefopzet en uitslag gerapporteerd zijn in de literatuur die toegankelijk is via Medline. Voorwaarde was adequate uitvoering en rapportage. Mengsels en ioniserende straling zijn buiten beschouwing gelaten.

Tot slot is de evaluatie beperkt tot de lacI- en lacZ-genen van BB respectievelijk MM. Het vreemde DNA van BB en van de MM-variant met een bacteriofaag als vector bevat nog wel een tweede reporter-gen: cII. Dit gen heeft de commissie echter buiten beschouwing gelaten, omdat het bij slechts een vijftiental stoffen op genmutaties is onderzocht. Bij lacI en lacZ ligt dat aantal op minstens veertig.

---

### **3.2 Classificatie van stoffen op basis van klassieke tests**

Bijlage D geeft een overzicht van de 85 stoffen die de commissie heeft gebruikt als toetssteen voor de betrouwbaarheid van de nieuwe testsystemen met reporter-genen. In

---

de tabel zijn weergegeven de uitkomst van het traditionele onderzoek naar de genotoxiciteit en de carcinogeniteit en de resultaten in tests met de proefdierstammen BB en MM. Genotoxiciteit in vitro, in vivo en in totaal zijn vermeld. Bij dit totaaloordeel geven, zoals eerder uiteen is gezet, de in vivo bevindingen de doorslag. De eindconclusie '(niet-)genotoxisch' is daarom synoniem met '(niet-)genotoxisch in vivo'. Het oordeel of een stof genotoxisch is, is niet alleen gebaseerd op zijn scores\* in gangbare genotoxiciteitstests. Ook de resultaten van onderzoek dat indirecte informatie verschaft over mogelijke genotoxische eigenschappen zijn in het oordeel betrokken. Bijvoorbeeld onderzoek naar de vorming van DNA-adducten.

Het oordeel over de genotoxiciteit dient als maatstaf voor de prestaties van BB en MM als testsysteem voor mutageniteit. Het is ontleend aan eerdere adviezen van de Gezondheidsraad of aan rapporten van de voormalige Werkgroep van Deskundigen van het Ministerie van Sociale Zaken en Werkgelegenheid, die in 1995 is opgegaan in de Gezondheidsraad. Bij het ontbreken hiervan is de conclusie gebaseerd op een monografie van het 'International Agency for Research on Cancer (IARC)' in Lyon. Als ook een dergelijk document ontbreekt, berust het oordeel op de originele publicaties. Indien er een IARC-document is, staat in de kolom 'carcinogeniteit' naast de score ook vermeld de bewijskracht dat het om een carcinogeen gaat.

Sommige van de geraadpleegde overzichtsdOCUMENTEN zijn van ouder datum. Dit is in de meeste gevallen geen bezwaar, omdat het om publicaties gaat waaruit genotoxische eigenschappen gebleken zijn. Het oordeel 'genotoxisch' zou door nieuwere rapportages niet herzien worden. In de overige gevallen is de recente literatuur geraadpleegd voor aanvullende (in vivo) gegevens. Dit deed zich voor bij 4-aminobifenyyl, 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indool, asbest, 4-chloor-*o*-fenyleendiamine, isopropylmethaansulfoonaat (IPMS), 7-methoxy-2-nitronaftho[2,1-*b*]furaan, 2-nitro-*p*-fenyleendiamine en quinoline. Indien de in vivo genotoxiciteit niet of niet voldoende is onderzocht, ontbreekt een eindoordeel en is de stof ondergebracht in de restcategorie.

Uiteindelijk zijn dus drie groepen onderscheiden: genotoxische stoffen, niet-genotoxische stoffen en een restgroep waarvan, als gevolg van hiaten in de gegevens, volgens de commissie niet met voldoende zekerheid te bepalen is of ze genotoxische eigenschappen bezitten. Op grond van de geschetste criteria voor genotoxiciteit heeft zij 52 stoffen genotoxisch bevonden en 12 niet-genotoxisch. Eenentwintig heeft zij niet ingedeeld.

---

\* positief wil zeggen mutageen/genotoxisch, negatief niet mutageen/genotoxisch

---

---

### 3.3 Uitslagen van nieuwe tests

#### Uitvoering van de tests en interpretatie van de resultaten

De proeven zijn op uiteenlopende wijze uitgevoerd. Zo varieert de blootstelling qua route, schema en niveau. Ook verschilt bijvoorbeeld de expressietijd (de tijd tussen het beëindigen van de blootstelling en het doden van de dieren en uitnemen van hun organen), en zijn verschillende organen onderzocht. Het aantal onderzochte organen bijvoorbeeld varieert van een tot elf. En het aantal dieren per groep loopt uiteen van twee tot tien.

Bijlage D laat de verschillen in proefopzet niet zien, met uitzondering van de organen die zijn onderzocht. Achter elk orgaan is de uitkomst vermeld, uitgedrukt als de mutatiefrequentie van behandelde dieren gedeeld door die van controledieren. Dit quotiënt loopt uiteen van 0,5 tot 90. De stoffen scoren dus van negatief tot zeer sterk positief. Doorgaans zijn de overeenkomstige organen van de verschillende dieren in een groep afzonderlijk geanalyseerd en zijn de resultaten statistisch bewerkt. In een aantal gevallen zijn ze echter gepoold onderzocht of ontbreekt informatie waaruit kan worden afgeleid hoe de onderzoekers tot hun eindconclusies zijn gekomen. Dan is het, zeker bij de quotiënten tot zo'n twee, niet mogelijk vast te stellen of het om een reële verhoging gaat. De commissie beschouwt getallen tot twee als niet verhoogd, tenzij ze statistisch significant zijn bevonden.

De resultaten van de tests in BB en MM zijn als volgt verkregen. Een stof is in een orgaan (of weefsel) als genotoxisch beoordeeld wanneer hij de mutatiefrequentie verhoogt ten opzichte van de controlegroep. De stof heeft een positieve score gekregen als hij in minstens een van de onderzochte organen (of weefsels) – bij enige dosis, tijdsduur, et cetera – een verhoogde mutatiefrequentie liet zien. De score is negatief als in geen van de geteste organen extra mutaties zijn opgetreden. Bij BB is aangegeven of ratten of muizen voor de test zijn gebruikt.

#### Testresultaten voor genotoxische stoffen

Wat zijn de resultaten van de nieuwe tests als het gaat om het detecteren van genotoxiciteit? Van de 52 genotoxische stoffen scoren er 49 positief. Dus ondanks de uiteenlopende proefopzet worden genotoxische stoffen vrijwel allemaal als zodanig herkend. De drie negatief scorende genotoxische stoffen – arseentrioxide, methylbromide en hydrazinesulfaat – zijn eenmaal getest, in vier, respectievelijk drie en twee organen. Van de overige 49 is ruim de helft meermaals getest. De meeste hiervan vertonen consistent positieve scores. Zes echter laten tegenstrijdige bevindingen zien: acrylamide, afla-

---



toxine, cyclofosfamide, ethylmethaansulfonaat (EMS), N-hydroxy-2-acetylaminofluoreen en methylmethaansulfonaat (MMS).

Verscheidene stoffen in deze groep zijn sterk genotoxisch. Een deel hiervan is ook sterk positief gebleken in een reeks organen van BB of MM. Enkele worden inmiddels als positieve controle ingezet. Als gevolg hiervan zijn er van deze stoffen extra veel testuitslagen bekend. N-ethyl-N-nitroso-ureum (ENU) is hiervan een voorbeeld.

### Testresultaten voor niet-genotoxische stoffen

Hoe presteren de nieuwe testsystemen bij het herkennen van niet-genotoxische stoffen? Zeven van de twaalf niet-genotoxische stoffen laten negatieve scores zien. Vijf hebben positief gescoord. Hieronder is fenobarbital, dat vier maal is getest. Het scoorde drie keer negatief en eenmaal (zwak) positief. Ook methylclofenapaat en tetrachloormethaan zijn herhaald getest. Beide zijn negatief gebleken in twee proeven.

---

## 3.4 Bijzonderheden in de testopzet

### Selectie van organen

Hét kenmerk van de proefdierstammen BB en MM is dat men de te analyseren organen kan kiezen. Dit wordt weerspiegeld in het scala aan organen dat is onderzocht. Bij de orgaankeuze is rekening gehouden met onder meer de wijze van toediening. In het geval van inhalatieproeven bijvoorbeeld zijn in elk geval de longen onderzocht. Een ander criterium was bijvoorbeeld de mogelijkheid te vergelijken met gestandaardiseerde tests: beenmerg (micronucleustest) of lever (UDS). Bij carcinogene stoffen zijn meestal de organen onderzocht waarvan bekend is dat de stof er tumoren kan doen ontstaan. Dit geldt zowel bij de genotoxische als bij de niet-genotoxische carcinogenen.

Maar ook niet-doelorganen zijn bestudeerd. Bij de onderzochte niet-genotoxische stoffen ontstaan de tumoren in de meeste gevallen in de lever; dit orgaan is bij deze groep dan ook het meest onderzocht. In het algemeen kunnen genotoxische stoffen tumoren doen ontstaan in diverse organen. Bij deze categorie zijn ook gemiddeld meer organen onderzocht. De geanalyseerde organen weerspiegelen dus in belangrijke mate de aanwezige voorkennis.

Door de grote variatie in de onderzochte organen zijn geen algemene conclusies over de orgaanscores te trekken.

## Detectie in geslachtscellen

Bij de onderzochte organen nemen de voortplantingsorganen een bijzondere plaats in, omdat mutaties in geslachtscellen aan volgende generaties kunnen worden doorgegeven. Bewijs dat een stof mutageen is in geslachtscellen leidt daarom tot strengere beperkingen aan het gebruik ervan dan mutageniteit in andere celtypen.

De geslachtscellen van mannelijke dieren zijn door hun veel grotere celdelingscapaciteit meer geëigend voor onderzoek van stoffen op mutagene eigenschappen dan geslachtscellen van vrouwelijke dieren. Daarom is van diverse stoffen het effect op de mutatiefrequentie in de voortplantingsorganen van mannelijke dieren onderzocht. De mutatiefrequentie is bepaald in testis (zaadbal) en epididymis (bijbal), of hieruit gewonnen zaadkanalen of zaadcellen. Deze preparaten bevatten geslachtscellen en steunweefsel (stroma) in verschillende verhoudingen. Veiligheidshalve behandelt de commissie de uitslagen van al deze preparaten als afkomstig van geslachtscellen.

Onder de onderzochte stoffen zijn bewezen geslachtscelmutagenen bij de muis als ENU, EMS, IPMS, MMS en MNU. Deze stoffen zijn sterk positief gebleken in klassieke in vivo genotoxiciteitstests gericht op geslachtscellen, zoals de specifieke-locustest en de dominant-letaaltest (zie onder meer <sup>14-21</sup>).

ENU, IPMS en MMS zijn het uitvoerigst getest. ENU en IPMS hebben steeds positief gescoord. MMS is in de overgrote meerderheid van de tests negatief gebleken; slechts eenmaal scoorde het (zwak) positief. EMS en MNU zijn beide eenmaal getest en daarbij positief gebleken. Dus van de genoemde geslachtscelmutagenen valt er één op door (veelvuldig) negatief te scoren.

## Detectie in proefdierstammen BB versus MM

Van de genotoxische stoffen zijn er 17 in BB én MM getest. N-hydroxy-2-acetyl-aminofluoreen is de enige hiervan die een discrepantie tussen beide testsystemen laat zien (positief in BB, negatief in MM).

Van de niet-genotoxische stoffen zijn er drie in beide diersoorten getest. Twee waren consistent negatief; de derde, fenobarbital, was negatief in BB, maar (zwak) positief in een van de twee tests in MM. De mutatiefrequentie was 1,4 maal verhoogd, wat in dit geval statistisch significant was.

## Detectie in BB-ratten versus BB-muizen

Vijf genotoxische stoffen zijn getest in BB-ratten en -muizen. Daarvan scoorden er vier positief in beide. De vijfde, aflatoxine, bleek positief in ratten en negatief in muizen.

Niet-genotoxische stoffen die in beide systemen zijn getest, zijn er niet.

---

---

### 3.5 Testprestaties en reproduceerbaarheid van testuitslagen

#### Testprestaties

De commissie heeft voor BB-ratten en -muizen en voor MM afzonderlijk de testkenmerken gevoeligheid, specificiteit en positieve en negatieve voorspellende waarde geanalyseerd. Met gevoeligheid wordt de kans bedoeld dat een genotoxische stof positief scoort, met specificiteit de kans dat een niet-genotoxische stof negatief is. Een hoge gevoeligheid betekent dat er weinig foutnegatieve uitkomsten zijn; bij een hoge specificiteit zijn er weinig foutpositieve bevindingen. De positieve voorspellende waarde is de kans dat een stof die positief scoort ook daadwerkelijk genotoxisch is. De negatieve voorspellende waarde ten slotte is de kans dat een negatieve score betekent dat de stof niet genotoxisch is.

De testkenmerken zijn samengevat in tabel 1. De aantallen stoffen vond de commissie te klein om berekeningen voor BB-rat en -muis apart te maken. Daarom zijn bij BB de gegevens van muis en rat tezamen gebruikt. Diverse stoffen zijn meermaals getest en laten tegenstrijdige uitkomsten zien. Aangezien deze stoffen op één na allemaal genotoxisch zijn, zouden de testprestaties bij het eindoordeel ‘positief’ aanzienlijk gunstiger uitvallen dan bij ‘negatief’. Voor het samenstellen van de tabel zijn daarom berekeningen met beide uitkomsten gemaakt. Er is dus niet gewerkt met de resultaten van de afzonderlijke tests. Dan zouden stoffen die vaak zijn onderzocht namelijk extra zwaar meetellen. De stoffen met tien of meer scores zijn allemaal genotoxisch en de groep van de genotoxische stoffen domineert de testkarakteristieken toch al.

Uit de tabel blijkt dat de testsystemen BB en MM worden gekenmerkt door hoge gevoeligheid en redelijk hoge specificiteit. Verder is de positieve voorspellende waarde van tests met deze dieren groot. Hun negatieve voorspellende waarde daarentegen loopt sterk uiteen. Hoe bij tegenstrijdige testuitkomsten de eindscore luidt is van invloed op de getallen. De meeste percentages zijn wat lager bij ‘negatief’ dan bij ‘positief’.

Tabel 1 Karakteristieken van de tests met BB en MM voor het herkennen van genotoxische en niet-genotoxische stoffen

Karakteristiek	Uitkomst							
	BB (n=43) <sup>a</sup>				MM (n=40)			
	%		fractie		%		fractie	
gevoeligheid	100 <sup>b</sup>	(91)	32/32	(29/32)	89	(81)	32/36	(29/36)
specificiteit	64	(64)	7/11	(7/11)	75	(100)	3/4	(4/4)
positieve voorspellende waarde	89	(91)	32/36	(29/33)	97	(100)	32/33	(29/29)
negatieve voorspellende waarde	100	(70)	7/7	(7/10)	43	(36)	3/7	(4/11)

<sup>a</sup> aantal stoffen

<sup>b</sup> stoffen met tegenstrijdige testuitslagen gescoord als positief. Tussen haakjes: dezelfde stoffen gescoord als negatief

### Reproduceerbaarheid van testuitslagen

In hoeverre de stoffen reproduceerbare scores in BB en MM geven is reeds besproken. Gezien de verschillen in proefopzet gaat het daarbij om reproduceerbaarheid in de ruimste zin van het woord. Van reproduceerbaarheid in engere zin spreekt de commissie wanneer identiek uitgevoerde proeven dezelfde resultaten te zien geven. Slechts één artikel levert hierover informatie.

In drie laboratoria is bepaald of dimethylnitrosamine bij BB-muizen en MM genotoxisch is in de lever <sup>22</sup>. Na blootstelling van de verschillende groepen dieren kreeg elk laboratorium stukjes van hun levers ter analyse. In alledrie de laboratoria waren beide tests positief.

## Conclusies en aanbevelingen

---

Zijn de nieuwe typen mutageniteitstests met transgene reporter genen bruikbaar bij de beoordeling van de genotoxiciteit van chemische stoffen? Uit het literatuuroverzicht in hoofdstuk 3 blijkt dat stoffen waarvan vaststaat of ze genotoxische eigenschappen hebben in voldoende aantallen getest zijn om conclusies te trekken over de bruikbaarheid van BB en MM. Het feit dat ze commercieel verkrijgbaar zijn verklaart ongetwijfeld voor een belangrijk deel waarom zoveel testuitslagen van stoffen in deze stammen zijn gepubliceerd en waarom reviews met risicobeoordeling van stoffen als invalshoek vooral op deze dieren zijn gericht.

Om de bruikbaarheid van de nieuwe tests te beoordelen gaat de commissie eerst in op de betrouwbaarheid (paragraaf 4.1). Betrouwbaarheid van de testresultaten is immers een belangrijke voorwaarde voor een bruikbare test. Daarna volgt een oordeel over de bruikbaarheid (paragraaf 4.2). Vervolgens geeft de commissie aanbevelingen voor onderzoek om de bruikbaarheid te verbeteren (paragraaf 4.3). Het hoofdstuk sluit af met suggesties voor inpassing in het gangbare toxicologische onderzoek (paragraaf 4.4).

---

### 4.1 **Betrouwbaarheid**

#### Algemeen oordeel

Hoe betrouwbaar zijn de uitkomsten van de nieuwe mutageniteitstests? In totaal zijn de resultaten van 64 stoffen, 52 genotoxische en 12 niet-genotoxische, geschikt bevonden om hierover te oordelen.

---

De gevoeligheid, specificiteit en positieve voorspellende waarde van de tests blijken hoog te zijn (minstens 64 procent). De negatieve voorspellende waarde is aanzienlijk lager (minstens 36 procent). Deze testprestaties zijn bemoedigend, zeker gezien de variatie in de wijze waarop de tests zijn gedaan. Ze geven geen aanleiding aan te nemen dat BB en MM door de hoge spontane mutatiefrequentie in het reporter-gen ongeschikt zijn als testsysteem. Het is overigens ook mogelijk dat de goede testprestaties juist het gevolg zijn van de variatie in de proefopzet. Deze is immers stofs specifiek.

De commissie vindt het aantal tests te klein om de waargenomen verschillen in testprestaties tussen BB en MM (of tussen BB-ratten en -muizen) als reëel te beschouwen. In theorie zouden de reporter-genen ook niet tot verschillen mogen leiden. Mede daarom acht de commissie de twee testsystemen vooralsnog even geschikt om genotoxische eigenschappen of het ontbreken hiervan aan te tonen.

De commissie vindt de testprestaties weliswaar goed, maar beschouwt de cijfers als voorlopig, met als belangrijkste argument dat de onderzochte stoffen niet representatief zijn. Het percentage genotoxische stoffen is namelijk onevenredig hoog. Bovendien zijn binnen deze groep sterk genotoxische stoffen oververtegenwoordigd. Dit verklaart voor een groot deel de goede testprestaties. Ook is te summier onderzocht in hoeverre positieve en negatieve scores kunnen worden herhaald.

### Verklaring voor foutnegatieve en foutpositieve uitslagen

Verscheidene genotoxische stoffen zijn als negatief uit de test naar voren gekomen en verscheidene niet-genotoxische stoffen als positief. De commissie heeft geen aanwijzingen dat de desbetreffende experimenten niet correct zijn uitgevoerd. Evenmin zijn gemiddeld kleinere groepen proefdieren gebruikt dan bij de proeven met de juiste uitslagen. Daarom legt de commissie de uitkomsten uit als werkelijk verschillend van de resultaten die het klassieke genotoxiciteitsonderzoek heeft opgeleverd.

Een voor de hand liggende verklaring voor de foutnegatieve scores is volgens de commissie dat de stoffen de onderzochte organen niet hebben bereikt als gevolg van tekortkomingen in de proefopzet. Te denken valt aan bijvoorbeeld te korte blootstelling. Of wellicht hebben de stoffen de organen wel bereikt, maar was de expressietijd niet optimaal. De geconstateerde foutnegatieve uitslagen zouden dus voor rekening van verschillen in proefopzet kunnen komen, behalve misschien bij aflatoxine en N-hydroxy-2-acetylaminofluoreen. Deze twee verbindingen zijn beide negatief gebleken bij muizen, maar hebben positief gescoord in ratten. Van aflatoxine staat vast dat ratten er gevoeliger voor zijn dan muizen. Of bij N-hydroxy-2-acetylaminofluoreen ook sprake is van een dergelijk verschil in gevoeligheid is onbekend.

Zijn er andere verklaringen mogelijk? Kan het werkingsmechanisme van de genotoxische stoffen de negatieve uitslag in de nieuwe tests verklaren? De commissie meent

van niet, omdat alle genotoxische stoffen, in meer of mindere mate, het vermogen bezitten genmutaties te induceren. In het verleden bestond het beeld dat genotoxische stoffen óf genmutaties óf chromosoomafwijkingen kunnen veroorzaken. Dit is inmiddels door de feiten achterhaald. In het algemeen bezitten genotoxische stoffen het vermogen beide soorten mutaties te veroorzaken, maar in verschillende mate. Daarom is het niet aanneemelijk dat de negatief scorende genotoxische stoffen op grond van hun werkingsmechanisme door het testsysteem worden gemist.

De commissie acht het eerder een kwestie van lage gevoeligheid van de testsystemen, waardoor genotoxische stoffen die relatief weinig genmutaties induceren negatief scoren in de test. De resultaten van ENU, MNU, IPMS, EMS en MMS wijzen in deze richting. Deze stoffen zijn allemaal alkylerende verbindingen, die dezelfde soort DNA-adducten en dus ook dezelfde genmutaties kunnen veroorzaken<sup>23,24</sup>. De eerste drie vormen veel van deze mutagene adducten per eenheid DNA, de laatste twee aanzienlijk minder. Dit tweetal geeft (lang) niet altijd een positieve score in BB en MM, de andere drie stoffen doen dat wel. Dit kan een aanwijzing zijn dat de test met deze dieren minder gevoelig is dan het klassieke genotoxiciteitsonderzoek.

Wat kan een verklaring zijn voor de foutpositieve testuitkomsten? Bij de niet-genotoxische stoffen met positieve scores zou het om stoffen kunnen gaan die met de traditionele tests zijn gemist en dus ten onrechte het predikaat niet-genotoxisch hebben gekregen. Dit is zeker niet denkbeeldig wanneer de doelorganen en de uitslagen van de traditionele en van de nieuwe tests in ogenschouw worden genomen. Hiervoor heeft de commissie bovendien een argument van theoretische aard: het feit dat met de nieuwe testsystemen in vivo genmutaties worden aangetoond, iets wat voorheen niet mogelijk was. Ook bij sommige stoffen uit de restgroep in bijlage D, waarvan niet vaststaat of ze genotoxisch zijn, zou een positieve score in deze testsystemen op genotoxiciteit kunnen wijzen.

### Betekenis van afwijkende uitslagen

Het is gebruikelijk om een nieuwe onderzoeksmethode te valideren door de uitkomsten van onderzoek met methoden die zich reeds hebben bewezen als maatstaf te nemen. De reden is het ontbreken van een goed alternatief. Daarom berust de validatie van een nieuwe test doorgaans op vergelijking met ingeburgerde onderzoeksmethoden. In dit advies is dat het totaal van de andere, ten dele gevalideerde en gestandaardiseerde mutageniteitstests en andere types onderzoek, zoals cohortonderzoek naar bijvoorbeeld chromosoomafwijkingen in het perifere bloed als gevolg van blootstelling aan de bewuste stof. Aan een dergelijke afhankelijkheid valt niet te ontkomen. De afwijkende uitslagen van de nieuwe tests moeten dan ook in dit licht worden beoordeeld.

Er zijn twee mogelijke verklaringen voor de afwijkende resultaten: óf het klassieke genotoxiciteitsonderzoek heeft een correcte uitkomst gegeven, óf de nieuwe test. Bij de foutnegatieve scores denkt de commissie, gezien de bewijskracht voor genotoxiciteit uit het traditionele genotoxiciteitsonderzoek, aan een uit proefopzet en proefdier te verklaren uitslag – en dus aan de eerste verklaring. Bij de foutpositieve ligt het anders. Aangezien het testsysteem op genmutaties in vivo is gericht, dus op een ander eindpunt dan de traditionele testsystemen, vindt zij het in die gevallen raadzaam van genotoxiciteit uit te gaan. Tot slot merkt zij op dat een incidentele op toeval berustende foute uitslag niet kan worden uitgesloten.

De commissie vindt nader onderzoek wenselijk om beter inzicht te krijgen in de gevoeligheid en specificiteit van de testsystemen. Allereerst zijn meer uitslagen nodig van niet-genotoxische stoffen, aangezien deze ondervertegenwoordigd zijn. Voor wat betreft de genotoxische stoffen is voornamelijk met (zeer) sterke gewerkt. De commissie vraagt ook aandacht voor zwak genotoxische stoffen (marginaal positief bevonden met klassieke onderzoeksmethoden).

### Verklaring voor slechte score in voortplantingsorganen

Op basis van de uitslagen van enkele stoffen kan een uitspraak worden gedaan over de mogelijkheid om met BB en MM mutageniteit in geslachtscellen te detecteren. Dit zijn de eerdergenoemde bewezen geslachtscelmutagenen bij de muis, die allemaal sterk genotoxisch zijn. Een hiervan, MMS, heeft desondanks in een reeks experimenten, op één keer zwak positief na, negatief gescoord in geslachtscellen van BB-muizen en MM. Deze experimenten dekken een range van expressietijden. Dit is belangrijk, want de expressietijd bepaalt op welke ontwikkelingsstadia van de zaadcel de stof wordt getest<sup>25,26</sup>.

Het onderzoek vertoont op dit punt geen tekortkomingen: alle stadia zijn onderzocht. De slechte scores zouden te maken kunnen hebben met de stadia waarin MMS mutageen werkt. Van deze stof is namelijk bekend dat hij uitsluitend mutageen is in de stadia na de meiose of reductiedeling (zie bijvoorbeeld<sup>16,27</sup>). Dit is de celdeling waarbij het aantal chromosomen tot de helft wordt verminderd. Het bacteriële detectiesysteem van BB en MM leent zich niet voor het aantonen van DNA-schade in postmeiotische geslachtscellen. Het steunt op verdubbeling van het DNA gevolgd door celdeling. Daarom is het bruikbaar voor alle soorten lichaamcellen inclusief premeiotische geslachtscellen. Wijzigingen in het DNA van postmeiotische cellen kunnen niet met het detectiesysteem van BB en MM worden aangetoond, omdat in dit ontwikkelingsstadium geen DNA-verdubbeling – en dus ook geen vorming van een mutatie – plaatsvindt, en geen celdeling. Een klassieke test als de specifieke-locustest heeft hiervan geen last, want die berust op een ander detectiesysteem: een door mutatie gewijzigde eigenschap



van de nakomelingen, zoals vachtkleur. In dat geval vinden verdubbeling van het DNA en celdeling na de bevruchting plaats, dus in het nageslacht.

In tegenstelling tot MMS scoort ENU wel positief in alle proeven met BB en MM waarbij geslachtscellen zijn geanalyseerd. Van deze stof staat vast dat hij mutageen is in pre- én postmeiotische cellen (zie bijvoorbeeld <sup>18,19</sup>). Dit is in overeenstemming met de zojuist geschetste verklaring van de MMS-resultaten.

#### Beperkingen bij de orgaankeuze

De commissie concludeert dat BB en MM niet kunnen dienen om alle stoffen die mutageen zijn in geslachtscellen te herkennen. Stoffen als MMS die uitsluitend genotoxisch zijn in postmeiotische zaadcellen worden er namelijk niet mee gedetecteerd. Volgens de commissie zijn alle bekende geslachtscelmutagenen echter ook mutageen gebleken in andere celtypes. Mede op grond van overwegingen van theoretische aard acht zij daarom elke stof met genotoxische eigenschappen een potentieel geslachtscelmutageen.

BB en MM kunnen in theorie zonder zulke beperkingen worden ingezet om te bepalen of stoffen mutageen zijn in andere organen dan die van het voortplantingssysteem. Voorzover deze aanname proefondervindelijk is getoetst bevestigen de onderzoeksresultaten de theorie.

---

## 4.2 Bruikbaarheid voor risicobeoordeling

### Interpretatie van toekomstige testresultaten

De testresultaten tot nu toe maken duidelijk dat een positieve score met grote, zij het niet met vrijwel 100 procent betrouwbaarheid een genotoxische stof identificeert. De commissie vindt een positieve score dan ook reden om de desbetreffende stof als genotoxisch te beschouwen. Daarbij telt ook het unieke karakter van de testsystemen mee: ze detecteren genotoxische stoffen die in vivo genmutaties teweeg kunnen brengen.

Een negatieve uitslag blijkt met meer onzekerheid omgeven te zijn. Juist deze zal men echter willen kunnen aanvoeren als bewijs dat een stof veilig is. Volgens de commissie geven de tests nog te veel foutnegatieve resultaten om een negatieve score als bewijs te accepteren voor het ontbreken van genotoxische eigenschappen.

### Bruikbaarheid voor routinematige toepassing

Op grond van dit oordeel over de betrouwbaarheid meent de commissie dat de testsystemen met reportergenen op dit moment waardevolle informatie kunnen verschaffen. Doordat alle organen van BB en MM (met alleen bij de voortplantingsorganen een

beperking) op mutaties kunnen worden onderzocht, kan de proefopzet op de te onderzoeken stof worden toegesneden. Dit vermindert de kans op foutnegatieve uitslagen.

Voor routinematige toepassing ziet de commissie echter (nog) geen aanleiding. Dat zou immers betekenen werken volgens een voorschrift waarin de wijze van uitvoering in grote lijnen is vastgelegd. Naar de mening van de commissie is het opstellen van een dergelijk protocol op dit moment niet mogelijk. De toekomst zal moeten leren of de tests op den duur met voldoende betrouwbaarheid kunnen worden uitgevoerd en volgens zo'n standaardvoorschrift, of anders ten minste op minder uiteenlopende wijze dan tot nu toe gebeurd is. Om dit doel naderbij te brengen doet de commissie in de volgende paragraaf enige suggesties voor de proefopzet.

---

### **4.3 Aanbevelingen voor verdere validatie en standaardisatie**

#### Deelvoorschriften formuleren bij weinig of geen toxicologische informatie

Als men geen of vrijwel geen toxicologische informatie heeft op basis waarvan beslist kan worden hoe de proef het beste kan worden ingericht, is gedeeltelijke overeenkomst in de wijze van uitvoering zinvol. Deze situatie leent zich volgens de commissie voor deelvoorschriften.

Evenals bij de reeds gestandaardiseerde testsystemen moet de wijze van toediening aan de proefdieren worden afgestemd op de chemische en fysische eigenschappen van de te testen stof. Het is niet persé noodzakelijk de stof aan de proefdieren toe te dienen via de weg waarlangs de mens met de stof in contact kan komen. Het doel is immers de stof in de bloedbaan te brengen om alle organen doeltreffend bloot te stellen. Wateroplosbare stoffen kunnen daarom intraveneus worden ingespoten of oraal (door de mond) worden toegediend, vetoplosbare verbindingen vergen orale toediening, en voor gassen en vluchtige vloeistoffen tenslotte is inhalatie (inademing) nodig.

Aangezien het ondoenlijk is alle organen op mutaties te onderzoeken, is een proef van beperkte omvang de aangewezen optie. De commissie vindt analyse van drie organen een verantwoord compromis tussen haalbaarheid en de kans om genotoxiciteit te detecteren. Selectiecriteria zijn de mate van blootstelling en het vermogen tot celdeling. De commissie stelt voor in ieder geval lever en beenmerg te analyseren. Welk orgaan als derde in aanmerking komt voor onderzoek, hangt af van de wijze waarop de te testen stof wordt toegediend.

De lever is geschikt, omdat het een goed doorbloed orgaan is. Die goede doorbloeding bevordert het contact met de toegediende stof en dus het eventuele ontstaan van DNA-schade. Bovendien zet de lever veel stoffen om in metabolieten. Dit is voor het testen van belang, want sommige stoffen zijn zelf niet genotoxisch, maar kunnen in de lever worden omgezet in genotoxische metabolieten. In dergelijke gevallen is de lever

het meest aan de metaboliëten blootgestelde orgaan. Nadelig is wel dat de lever weinig celdeling kent. Bij orale blootstelling is er nog een extra reden waarom de lever zich goed voor bestudering leent. Als een stof eenmaal vanuit het maagdarmkanaal in het lichaam is opgenomen, wordt hij eerst door de bloedsomloop naar de lever vervoerd. Pas na passage van dit orgaan wordt hij dan verder door het lichaam verspreid. Dit werkt blootstelling van de lever in de hand.

Beenmerg is het tweede weefsel dat de commissie relevant vindt. Het bevat snelde- lende cellen en heeft daardoor een grote gevoeligheid. Het feit dat lever en beenmerg doelorgaan zijn bij andere in vivo tests vindt de commissie geen bezwaar. Ten eerste heeft de test een ander eindpunt (genmutaties). Verder zou kunnen blijken dat hij gevoe- liger is. Dit laatste lijkt misschien strijdig met de eerder gegeven verklaringen voor de foutnegatieve testuitslagen. De test is daar echter vergeleken met het klassieke genotoxi- citeitsonderzoek in totaal, hier wordt hij dat met een individuele test.

Bij orale toediening en injectie is de darm het derde orgaan dat voor analyse in aan- merking komt, omdat het darmepitheel snel deelt. In geval van orale toediening komt hier nog de extra goede blootstelling van het maagdarmkanaal bovenop.

Bij een inhalatieproef zou de analyse naast lever en beenmerg op de longen moeten worden gericht.

Blootstelling via de huid (dermaal) ontbreekt hier, omdat de hierboven genoemde toedieningswegen effectiever zijn voor het blootstellen van inwendige organen.

### Mogelijkheden voor maatwerk benutten

Indien er gegevens zijn die daarvoor aanknopingspunten bieden, kan de opzet van de proef beter op de te onderzoeken stof afgestemd worden. Dan is er dus aanleiding om van het zojuist geschetste, ten dele vastgelegde voorschrift af te wijken. Zo kan uit gege- vens over de verdeling van de stof en zijn metaboliëten over het lichaam blijken dat beter andere dan de bovengenoemde organen kunnen worden onderzocht. Ook kan de wijze van toediening worden veranderd: bij (vermoedens van) dermale blootstelling of effecten kan de huid aan de stof worden blootgesteld en op genotoxiciteit worden onder- zocht.

Naast vrijheid van orgaankeuze hebben de testsystemen nog enkele andere moge- lijkheden voor maatwerk te bieden. Bijzonder is de mogelijkheid te kiezen tussen rat en muis. Dit is bijvoorbeeld van belang als er forse verschillen in gevoeligheid voor de te testen stof zijn, zoals bij aflatoxine. Men kan dan de gevoeligste van de twee nemen. Een dergelijke aanpak sluit goed aan bij het Gezondheidsraadadvies ‘Onderzoek gezondheidsrisico’s stoffen: een gerichtere benadering’, waarin betere aansluiting van het onderzoek wordt bepleit bij het gebruik van de stof en het daarmee verbonden bloot- stellingsprofiel <sup>28</sup>.

Het maatwerk kan zelfs nog een stap verder gaan. BB en MM dragen, net als normale, niet genetisch gemodificeerde dieren in alle lichaamscellen het HPRT-gen. Hierdoor kunnen de sterke punten van endogene en transgene reportersystemen worden gecombineerd in één test.

### Streven naar standaardisatie

Behalve de voorgestelde combinaties van blootstellingsroutes en op genmutaties te onderzoeken organen zijn er nog verscheidene andere aspecten van de test die zich lenen voor (enige mate van) standaardisatie. Aangezien groeps grootte en proefopzet een veel groter effect op de uitkomst hebben dan de uiteindelijke weefselanalyse, verdient het aanbeveling de inspanningen daarop te richten<sup>25</sup>. Bij standaardisatie van de proefopzet valt te denken aan de duur van de proef, het blootstellingsschema en de statistische analyse. Weefsels verschillen in delingssnelheid en als gevolg hiervan in het optimale tijdstip voor analyse<sup>29</sup>. Bovendien verschillen stoffen in hun kinetiek. Diverse publicaties bevatten suggesties voor standaardisatie<sup>11,13,29,30</sup>. De commissie beveelt aan voorschriften in OESO-verband te laten opstellen.

### Geharmoniseerde validatie

Voor de verdere validatie van de test beveelt de commissie de algemene uitgangspunten voor de wetenschappelijke validatie van testmethoden aan die de OESO inmiddels in concept gereed heeft<sup>31</sup>.

---

## 4.4 Aanbevelingen voor inpassing in de gangbare teststrategie

De in vivo test met een transgeen reporter gen kan goed worden ingepast in het onderzoek op genotoxiciteit dat de EU tegenwoordig voorschrijft. De EU verlangt van de producent of degene die de stof voor commerciële doeleinden gebruikt of in de handel brengt een dossier met standaard toxicologische gegevens. Bij het onderdeel genotoxiciteit worden de resultaten van stapsgewijs uitgevoerde in vitro en in vivo tests gevraagd: bij elke stap bepalen de resultaten hoe de volgende stap er uit moet zien. Uitzonderingen daargelaten moeten in vitro tests en zonodig daarna in vivo tests gedaan worden. Welke genotoxiciteitstests in de verschillende stappen toegestaan of verplicht zijn, wordt bepaald door het productievolume en de toepassing van de stof. Er is aparte regelgeving voor allerlei categorieën stoffen, bestemd voor de eindverbruiker (bijvoorbeeld geneesmiddelen en gewasbeschermingsmiddelen) of niet (bijvoorbeeld de zogenoemde bestaande stoffen, die op een speciale lijst staan).

Ondanks de variatie in teststrategie vindt de commissie toepassing van de nieuwe testsystemen voor al deze beleidsterreinen het overwegen waard. Op enkele van deze terreinen – bij onder meer de bovengenoemde ‘bestaande stoffen’ – is een test hiermee reeds toegestaan, mits er sprake is van een goed gemotiveerde proefopzet. Voor de overige terreinen beveelt de commissie aan de test met dezelfde randvoorwaarden toe te laten.

De testsystemen zijn vooral van betekenis als er bevindingen over een stof zijn uit gestandaardiseerde genotoxiciteitstests die elkaar tegenspreken. Deze situatie doet zich bijvoorbeeld voor wanneer de bewuste stof positief is gebleken in een in vitro test op genmutaties, maar negatief heeft gescoord in in vivo tests voor UDS en chromosoomafwijkingen. Dankzij de nieuwe testsystemen kan dan ook in vivo bestudeerd worden of de stof in staat is genmutaties te geven, iets wat voorheen niet mogelijk was.

De in vivo test voor genmutaties vormt dus een waardevol element voor de huidige teststrategie. In verhouding tot de ingeburgerde tests is hij echter bewerkelijk en tijdrovend. Bovendien ontbreekt standaardisatie, een belangrijke voorwaarde voor validatie. Daarom vindt de commissie de test voorlopig alleen in aanmerking komen voor ad hoc aanvulling op de gangbare tests, zoals die voor UDS en chromosoomafwijkingen in het hierboven gegeven voorbeeld.



---

# Literatuur

---

- 1 Europese Raad. Richtlijn 67/548/EEG betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 1967; 196: 1
  - 2 Gezondheidsraad. Betekenis van mutageniteitstests. Den Haag: Gezondheidsraad; 1995: Publicatie nr 1995/20.
  - 3 Gezondheidsraad. Beoordeling carcinogeniteit van stoffen. Den Haag: Gezondheidsraad; 1996: Publicatie nr 1996/26.
  - 4 International Programme on Chemical Safety. Descriptions of selected key generic terms used in chemical hazard/risk assessment. Genève: WHO; 2004. Internet: [www.who.int/ipcs](http://www.who.int/ipcs).
  - 5 Verenigde Naties. The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). New York en Genève: Verenigde Naties; 2003. Internet: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs.html>.
  - 6 European Commission. Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part I. Ispra: European Commission Joint Research Centre: European Chemicals Bureau; 2003. Internet: <http://ecb.jrc.it>.
  - 7 Europese Raad. Richtlijn van de Raad van 27 juli 1976 betreffende de onderlinge aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen der Lidstaten inzake de beperking van het op de markt brengen en van het gebruik van bepaalde gevaarlijke stoffen en preparaten. Publicatieblad van de Europese Unie 1976; L 262: 201
-

- 8 Willems MI, van Benthem J. Mutagenicity of chemicals in genetically modified animals. Bilthoven: RIVM; 2000: RIVM report 650210002; TNO report V99.1097.
- 9 Malling HV, Delongchamp RR. Direct separation of in vivo and in vitro am3 revertants in transgenic mice carrying the phiX174 am3, cs70 vector. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37(4): 345-355
- 10 Weaver RP, Malling HV. The in vivo but not the in vitro am3 revertant frequencies increase linearly with increased ethylnitrosourea doses in spleen of mice transgenic for phiX174 am3, cs70 using the single burst assay. *Mutat Res* 2003; 534(1-2): 1-13
- 11 Gorelick NJ. Overview of mutation assays in transgenic mice for routine testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1995; 25: 218-30
- 12 Schmezer P, Eckert C. Induction of mutations in transgenic animal models: BigBlue™ and Muta™ Mouse. In: McGregor DB, Rice JM, Venitt S, editors. *The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1999: 367-94.
- 13 Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW et al. In vivo transgenic mutation assays. *Mutat Res* 2003; 540(2): 141-151
- 14 Ehling UH, Doherty DG, Malling HV. Differential spermatogenic response of mice to the induction of dominant-lethal mutations by n-propyl methanesulfonate and isopropyl methanesulfonate. *Mutat Res* 1972; 15(2): 175-184
- 15 Ehling UH, Neuhauser-Klaus A. Induction of specific-locus mutations in male mice by ethyl methanesulfonate (EMS). *Mutat Res* 1989; 227(2): 91-95
- 16 Ehling UH, Neuhauser-Klaus A. Induction of specific-locus and dominant lethal mutations in male mice in the low dose range by methyl methanesulfonate (MMS). *Mutat Res* 1990; 230(1): 61-70
- 17 Ehling UH, Neuhauser-Klaus A. Induction of specific-locus and dominant lethal mutations in male mice by 1-methyl-1-nitrosourea (MNU). *Mutat Res* 1991; 250(1-2): 447-456
- 18 Favor J, Sund M, Neuhauser-Klaus A, Ehling UH. A dose-response analysis of ethylnitrosourea-induced recessive specific-locus mutations in treated spermatogonia of the mouse. *Mutat Res* 1990; 231(1): 47-54
- 19 Favor J, Neuhauser-Klaus A, Ehling UH. The frequency of dominant cataract and recessive specific-locus mutations and mutation mosaics in F1 mice derived from post-spermatogonial treatment with ethylnitrosourea. *Mutat Res* 1990; 229(2): 105-114
- 20 Generoso WM, Cain KT, Krishna M, Huff SW. Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(1): 435-437
- 21 Katoh M, Iwahara S. Relationship between chromosome aberrations at the first cleavage metaphases and postimplantation loss in dominant lethal mutations induced by isopropyl methanesulfonate. *Jpn J Genet* 1983; 58: 345-351
- 22 Tinwell H, Liegibel U, Krebs O, Schmezer P, Favor J, Ashby J. Comparison of lacI and lacZ transgenic mouse mutation assays: an EU-sponsored interlaboratory study. *Mutat Res* 1995; 335(2): 185-190
- 23 Beranek DT, Weis CC, Swenson DH. A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis* 1980; 1(7): 595-606
-



- 24 van Zeeland AA. Molecular dosimetry of alkylating agents: quantitative comparison of genetic effects on  
the basis of DNA adduct formation. *Mutagenesis* 1988; 3(3): 179-191
- 25 Ashby J, Gorelick NJ, Shelby MD. Mutation assays in male germ cells from transgenic mice: overview of  
study and conclusions. *Mutation Research* 1997; 388 (2-3): 111-22
- 26 Katoh M, Inomata T, Horiya N, Suzuki F, Shida T, Ishioka K et al. Studies on mutations in male germ cells  
of transgenic mice following exposure to isopropyl methanesulfonate, ethylnitrosourea or X-ray. *Mutat Res*  
1994; 341(1): 17-28
- 27 Shelby MD, Tindall KR. Mammalian germ cell mutagenicity of ENU, IPMS and MMS, chemicals selected  
for a transgenic mouse collaborative study. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 99-109
- 28 Gezondheidsraad. Onderzoek gezondheidsrisico's stoffen: een gerichtere benadering. Den Haag:  
Gezondheidsraad; 2001: Publicatie nr 2001/24.
- 29 Heddle JA, Martus HJ, Douglas GR. Treatment and sampling protocols for transgenic mutation assays.  
*Environmental and Molecular Mutagenesis* 2003; 41: 1-6
- 30 Heddle JA, Dean S, Nohmi T, Boerrigter M, Casciano D, Douglas GR et al. In vivo transgenic mutation  
assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 35: 253-59
- 31 OECD. Draft guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test  
methods for hazard assessment. Parijs: Organisation for Economic Co-operation and Development,  
Environment Directorate; 2003: OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and  
Assessment No. 34.
- 32 Brooks TM, Szegedi M, Rosher P, Dean SW. The detection of gene mutation in transgenic mice (Muta  
Mouse) following a single oral dose of 2-acetylaminofluorene. *Mutagenesis* 1995; 10(2): 149-150
- 33 Gunz D, Shephard SE, Lutz WK. Can nongenotoxic carcinogens be detected with the lacI transgenic mouse  
mutation assay? *Environ Mol Mutagen* 1993; 21(3): 209-211
- 34 Shephard SE, Sengstag C, Lutz WK, Schlatter C. Mutations in liver DNA of lacI transgenic mice (Big Blue)  
following subchronic exposure to 2-acetylaminofluorene. *Mutat Res* 1993; 302(2): 91-96
- 35 Tinwell H, Lefevre PA, Ashby J. Relative activities of methyl methanesulphonate (MMS) as a genotoxin,  
clastogen and gene mutagen to the liver and bone marrow of MutaMouse mice. *Environ Mol Mutagen* 1998;  
32(2): 163-172
- 36 Health Council of the Netherlands. Acrylamide; Evaluation of the carcinogenicity and genotoxicity. The  
Hague: Health Council of the Netherlands; 2002: publication no 2002/02OSH.
- 37 Hoorn AJ, Custer LL, Myhr BC, Brusick D, Gossen J, Vijg J. Detection of chemical mutagens using Muta  
Mouse: a transgenic mouse model. *Mutagenesis* 1993; 8(1): 7-10
- 38 Krebs O, Favor J. Somatic and germ cell mutagenesis in lambda lacZ transgenic mice treated with  
acrylamide or ethylnitrosourea. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 239-248
- 39 Myhr BC. Validation studies with Muta Mouse: a transgenic mouse model for detecting mutations in vivo.  
*Environ Mol Mutagen* 1991; 18(4): 308-315
- 40 Monroe TJ, Mitchell MA. In vivo mutagenesis induced by CC-1065 and adozelesin DNA alkylation in a  
transgenic mouse model. *Cancer Res* 1993; 53(23): 5690-5696
-

- 41 Dutch Expert Committee on Occupational Standards. Scientific documentation on the Dutch list of  
occupational carcinogens I. Den Haag: SDU; 1995: report nr RA 1/95.
- 42 Autrup H, Jorgensen EC, Jensen O. Aflatoxin B1 induced lacI mutation in liver and kidney of transgenic  
mice C57BL/6N: effect of phorone. *Mutagenesis* 1996; 11(1): 69-73
- 43 Davies R, Oreffo VI, Martin EA, Festing MF, White IN, Smith LL et al. Tamoxifen causes gene mutations  
in the livers of lambda/lacI transgenic rats. *Cancer Res* 1997; 57(7): 1288-1293
- 44 Davies R, Gant TW, Smith LL, Styles JA. Tamoxifen induces G:C-->T:A mutations in the cII gene in the  
liver of lambda/lacI transgenic rats but not at 5'-CpG-3' dinucleotide sequences as found in the lacI  
transgene. *Carcinogenesis* 1999; 20(7): 1351-1356
- 45 Dyciaico MJ, Stuart GR, Tobal GM, de Boer JG, Glickman BW, Provost GS. Species-specific differences in  
hepatic mutant frequency and mutational spectrum among lambda/lacI transgenic rats and mice following  
exposure to aflatoxin B1. *Carcinogenesis* 1996; 17(11): 2347-2356
- 46 Ohsawa K, Hirano N, Sugiura M, Nakagawa S, Kimura M. Genotoxicity of o-aminoazotoluene (AAT)  
determined by the Ames test, the in vitro chromosomal aberration test, and the transgenic mouse gene  
mutation assay. *Mutat Res* 2000; 471(1-2): 113-126
- 47 Fletcher K, Tinwell H, Ashby J. Mutagenicity of the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl to the  
bladder of MutaMouse transgenic mice. *Mutat Res* 1998; 400(1-2): 245-250
- 48 Turner SD, Tinwell H, Piegorsch W, Schmezer P, Ashby J. The male rat carcinogens limonene and sodium  
saccharin are not mutagenic to male Big Blue rats. *Mutagenesis* 2001; 16(4): 329-332
- 49 Ochiai M, Ishida K, Ushijima T, Suzuki T, Sofuni T, Sugimura T et al. DNA adduct level induced by 2-  
amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoline in Big Blue mice does not correlate with mutagenicity.  
*Mutagenesis* 1998; 13(4): 381-384
- 50 Suzuki T, Hayashi M, Ochiai M, Wakabayashi K, Ushijima T, Sugimura T et al. Organ variation in the  
mutagenicity of MeIQ in Big Blue lacI transgenic mice. *Mutat Res* 1996; 369(1-2): 45-49
- 51 Davis CD, Dacquel EJ, Schut HA, Thorgeirsson SS, Snyderwine EG. In vivo mutagenicity and DNA adduct  
levels of heterocyclic amines in Muta mice and c-myc/lacZ double transgenic mice. *Mutat Res* 1996;  
356(2): 287-296
- 52 Itoh T, Suzuki T, Nishikawa A, Furukawa F, Takahashi M, Xue W et al. In vivo genotoxicity of 2-amino-  
3,8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline in lacI transgenic (Big Blue) mice. *Mutat Res* 2000; 468(1): 19-25
- 53 Thorgeirsson SS, Ryu DY, Weidner V, Snyderwine EG. Carcinogenicity and mutagenicity of heterocyclic  
amines in transgenic mouse models. *Cancer Lett* 1999; 143(2): 245-247
- 54 Bol SA, Horlbeck J, Markovic J, de Boer JG, Turesky RJ, Constable A. Mutational analysis of the liver,  
colon and kidney of Big Blue rats treated with 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis*  
2000; 21(1): 1-6
- 55 Lynch AM, Gooderham NJ, Boobis AR. Organ distinctive mutagenicity in MutaMouse after short-term  
exposure to PhIP. *Mutagenesis* 1996; 11(5): 505-509
- 56 Okonogi H, Stuart GR, Okochi E, Ushijima T, Sugimura T, Glickman BW et al. Effects of gender and  
species on spectra of mutation induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the lacI  
transgene. *Mutat Res* 1997; 395(2-3): 93-99
-

- 57 Stuart GR, Holcroft J, de Boer JG, Glickman BW. Prostate mutations in rats induced by the suspected human carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res* 2000; 60(2): 266-268
- 58 Stuart GR, de Boer JG, Haesevoets R, Holcroft J, Kangas J, Sojonky K et al. Mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) in cecum and proximal and distal colon of lacI transgenic rats. *Mutagenesis* 2001; 16(5): 431-437
- 59 Yang H, Stuart GR, Glickman BW, de Boer JG. Modulation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mutation in the cecum and colon of big blue rats by conjugated linoleic acid and 1,2-dithiole-3-thione. *Nutr Cancer* 2001; 39(2): 259-266
- 60 Yang H, Holcroft J, Glickman BW, de Boer JG. Conjugated linoleic acid inhibits mutagenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the prostate of Big Blue rats. *Mutagenesis* 2003; 18(2): 195-200
- 61 Zhang S, Lloyd R, Bowden G, Glickman BW, de Boer JG. Msh2 DNA mismatch repair gene deficiency and the food-borne mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) synergistically affect mutagenesis in mouse colon. *Oncogene* 2001; 20(42): 6066-6072
- 62 Gezondheidsraad: Commissie Risico-evaluatie van stoffen. Arseen. Toetsing van een basisdocument. Den Haag: Gezondheidsraad; 1993: publicatie nr 1993/02.
- 63 Noda Y, Suzuki T, Kohara A, Hasegawa A, Yotsuyanagi T, Hayashi M et al. In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in MutaMouse. *Mutat Res* 2002; 513(1-2): 205-212
- 64 Gezondheidsraad, Commissie Beoordeling carcinogeniteit van stoffen. Benzeen. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1997: publicatie no 1997/29.
- 65 Provost GS, Mirsalis JC, Rogers BJ, Short JM. Mutagenic response to benzene and tris(2,3-dibromopropyl)-phosphate in the lambda lacI transgenic mouse mutation assay: a standardized approach to in vivo mutation analysis. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 342-347
- 66 Gezondheidsraad. Polycyclische aromatische koolwaterstoffen; toetsing van een basisdocument. Den Haag: Gezondheidsraad; 1990: publicatie nr 1990/23.
- 67 Dean SW, Coates A, Brooks TM, Burlinson B. Benzo[a]pyrene site of contact mutagenicity in skin of Muta Mouse. *Mutagenesis* 1998; 13(5): 515-518
- 68 Hakura A, Tsutsui Y, Sonoda J, Kai J, Imade T, Shimada M et al. Comparison between in vivo mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[a]pyrene in the lacZ transgenic mouse (Muta Mouse). *Mutat Res* 1998; 398(1-2): 123-130
- 69 Kohler SW, Provost GS, Fieck A, Kretz PL, Bullock WO, Sorge JA et al. Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the lacI gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(18): 7958-7962
- 70 Kohler SW, Provost GS, Fieck A, Kretz PL, Bullock WO, Putman DL et al. Analysis of spontaneous and induced mutations in transgenic mice using a lambda ZAP/lacI shuttle vector. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18(4): 316-321
- 71 Loli P, Topinka J, Georgiadis P, Dusinska M, Hurbankova M, Kovacicova Z et al. Benzo[a]pyrene-enhanced mutagenesis by asbestos in the lung of lambda-lacI transgenic rats. *Mutat Res* 2004; 553(1-2): 79-90
-

- 72 Skopek TR, Kort KL, Marino DR, Mittal LV, Umbenhauer DR, Laws GM et al. Mutagenic response of the endogenous hprt gene and lacI transgene in benzo[a]pyrene-treated Big Blue B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 376-384
- 73 Recio L, Osterman-Golkar S, Csanady GA, Turner MJ, Myhr B, Moss O et al. Determination of mutagenicity in tissues of transgenic mice following exposure to 1,3-butadiene and N-ethyl-N-nitrosourea. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 117(1): 58-64
- 74 Recio L, Bond JA, Pluta LJ, Sisk SC. Use of transgenic mice for assessing the mutagenicity of 1,3-butadiene in vivo. *IARC Sci Publ* 1993;(127): 235-243
- 75 Recio L, Meyer KG, Pluta LJ, Moss OR, Saranko CJ. Assessment of 1,3-butadiene mutagenicity in the bone marrow of B6C3F1 lacI transgenic mice (Big Blue): a review of mutational spectrum and lacI mutant frequency after a 5-day 625 ppm 1,3-butadiene exposure. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 424-429
- 76 Sisk SC, Pluta LJ, Bond JA, Recio L. Molecular analysis of lacI mutants from bone marrow of B6C3F1 transgenic mice following inhalation exposure to 1,3-butadiene. *Carcinogenesis* 1994; 15(3): 471-477
- 77 Staedtler F, Crespo-Perez J, Sagelsdorff P, Steiner S, Suter W. 4-chloro-o-phenylenediamine induces a dose-related increase in G:C > T:A transversions and one major DNA adduct in the liver of Big Blue mice after 26 weeks in feed treatment. *Mutat Res* 1999; 430(1): 121-130
- 78 Suter W, Ahiabor R, Blanco B, Locher F, Mantovani F, Robinson M et al. Evaluation of the in vivo genotoxic potential of three carcinogenic aromatic amines using the Big Blue transgenic mouse mutation assay. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 354-362
- 79 Suter W, Staedtler F, Poetter-Locher F, Swingler T, Wilson L. 4-Chloro-o-phenylenediamine: a 26-week oral (in feed) mutagenicity study in Big Blue mice. *Mutat Res* 1998; 414(1-3): 149-156
- 80 Gezondheidsraad. Chroom; Toetsing van een basisdocument. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1991: publicatie nr 1991/03.
- 81 Itoh S, Shimada H. Clastogenicity and mutagenicity of hexavalent chromium in lacZ transgenic mice. *Toxicol Lett* 1997; 91(3): 229-233
- 82 Itoh S, Shimada H. Bone marrow and liver mutagenesis in lacZ transgenic mice treated with hexavalent chromium. *Mutat Res* 1998; 412(1): 63-67
- 83 Cheng L, Sonntag DM, de Boer J, Dixon K. Chromium(VI)-induced mutagenesis in the lungs of big blue transgenic mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19(3): 239-249
- 84 Dutch Expert Committee on Occupational Standards. Scientific documentation on the Dutch list of occupational carcinogens II. Den Haag: Sdu; 1995: report nr RA 2/95.
- 85 Louro H, Silva MJ, Boavida MG. Mutagenic activity of cisplatin in the lacZ plasmid-based transgenic mouse model. *Environ Mol Mutagen* 2002; 40(4): 283-291
- 86 Gorelick NJ, Andrews JL, deBoer JG, Young R, Gibson DP, Walker VE. Tissue-specific mutant frequencies and mutational spectra in cyclophosphamide-treated lacI transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(2-3): 154-166
- 87 Hoyes KP, Wadeson PJ, Sharma HL, Hendry JH, Morris ID. Mutation studies in lacI transgenic mice after exposure to radiation or cyclophosphamide. *Mutagenesis* 1998; 13(6): 607-612
-

- 88 Walker VE, Andrews JL, Upton PB, Skopek TR, deBoer JG, Walker DM et al. Detection of cyclophosphamide-induced mutations at the Hprt but not the lacI locus in splenic lymphocytes of exposed mice. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(2-3): 167-181
- 89 Krebs O, Schafer B, Wolff T, Oesterle D, Deml E, Sund M et al. The DNA damaging drug cyproterone acetate causes gene mutations and induces glutathione-S-transferase P in the liver of female Big Blue transgenic F344 rats. *Carcinogenesis* 1998; 19(2): 241-245
- 90 Cunningham ML, Hayward JJ, Shane BS, Tindall KR. Distinction of mutagenic carcinogens from a mutagenic noncarcinogen in the big blue transgenic mouse. *Environ Health Perspect* 1996; 104 Suppl 3: 683-686
- 91 Hayward JJ, Shane BS, Tindall KR, Cunningham ML. Differential in vivo mutagenicity of the carcinogen/non-carcinogen pair 2,4- and 2,6-diaminotoluene. *Carcinogenesis* 1995; 16(10): 2429-2433
- 92 Mientjes EJ, Luiten-Schuite A, van der WE, Borsboom Y, Bergmans A, Berends F et al. DNA adducts, mutant frequencies, and mutation spectra in various organs of lambda lacZ mice exposed to ethylating agents. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31(1): 18-31
- 93 Okada N, Honda A, Kawabata M, Yajima N. Sodium phenobarbital-enhanced mutation frequency in the liver DNA of lacZ transgenic mice treated with diethylnitrosamine. *Mutagenesis* 1997; 12(3): 179-184
- 94 Suzuki T, Hayashi M, Sofuni T. Initial experiences and future directions for transgenic mouse mutation assays. *Mutat Res* 1994; 307(2): 489-494
- 95 Suzuki T, Itoh T, Hayashi M, Nishikawa Y, Ikezaki S, Furukawa F et al. Organ variation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue mice. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 348-353
- 96 Health Council of the Netherlands: Dutch Expert Committee on Occupational Standards (DECOS). N-Nitrosodimethylamine. The Hague: Health Council of the Netherlands; 1999: publication no. 1999/12OSH.
- 97 Ashby J, Short JM, Jones NJ, Lefevre PA, Provost GS, Rogers BJ et al. Mutagenicity of o-anisidine to the bladder of lacI- transgenic B6C3F1 mice: absence of 14C or 32P bladder DNA adduction. *Carcinogenesis* 1994; 15(10): 2291-2296
- 98 Mirsalis JC, Hamer JD, O'Loughlin KG, Winegar RA, Short JM. Effects of nongenotoxic carcinogens on hepatic mutations in lacI transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 1993; 21 (suppl 22): 48
- 99 Mirsalis JC, Provost GS, Matthews CD, Hamner RT, Schindler JE, O'Loughlin KG et al. Induction of hepatic mutations in lacI transgenic mice. *Mutagenesis* 1993; 8(3): 265-271
- 100 Schmezer P, Eckert C, Liegibel UM, Klein RG, Bartsch H. Use of Transgenic Mutational Test Systems in Risk Assessment of Carcinogens. *Arch Toxicol* 1998; 20: 321-30
- 101 Tinwell H, Lefevre PA, Ashby J. Response of the Muta mouse lacZ/galE- transgenic mutation assay to DMN: comparisons with the corresponding Big Blue (lacI) responses. *Mutat Res* 1994; 307(1): 169-173
- 102 Tinwell H, Lefevre PA, Ashby J. Mutation studies with dimethyl nitrosamine in young and old lac I transgenic mice. *Mutat Res* 1994; 307(2): 501-508
- 103 Shane BS, deBoer JG, Glickman BW, Cunningham ML. Oxazepam is mutagenic in vivo in Big Blue transgenic mice. *Carcinogenesis* 1999; 20(7): 1315-1321
-

- 104 Shephard SE, Lutz WK, Schlatter C. The lacI transgenic mouse mutagenicity assay: quantitative evaluation in comparison to tests for carcinogenicity and cytogenetic damage in vivo. *Mutat Res* 1994; 306(2): 119-128
- 105 Shephard SE, Gunz D, Schlatter C. Genotoxicity of agaritine in the lacI transgenic mouse mutation assay: evaluation of the health risk of mushroom consumption. *Food Chem Toxicol* 1995; 33(4): 257-264
- 106 Suzuki T, Miyata Y, Saeki K, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T. In vivo mutagenesis by the hepatocarcinogen quinoline in the lacZ transgenic mouse: evidence for its in vivo genotoxicity. *Mutat Res* 1998; 412(2): 161-166
- 107 Lefevre PA, Tinwell H, Ashby J. Mutagenicity of the potent rat hepatocarcinogen 6BT to the liver of transgenic (lacI) rats: consideration of a reduced mutation assay protocol. *Mutagenesis* 1997; 12(1): 45-47
- 108 Ashby J, Brusick D, Myhr BC, Jones NJ, Parry JM, Nesnow S et al. Correlation of carcinogenic potency with mouse-skin 32P-postlabeling and Muta<sup>R</sup>Mouse lac Z<sup>-</sup> mutation data for DMBA and its K-region sulphur isostere: comparison with activities observed in standard genotoxicity assays. *Mutat Res* 1993; 292(1): 25-40
- 109 Brooks TM, Dean SW. Detection of gene mutation in skin, stomach and liver of MutaMouse following oral or topical treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or 1-chloromethylpyrene: some preliminary observations. *Mutagenesis* 1996; 11(5): 529-532
- 110 Hachiya N, Yajima N, Hatakeyama S, Yuno K, Okada N, Umeda Y et al. Induction of lacZ mutation by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in various tissues of transgenic mice. *Mutat Res* 1999; 444(2): 283-295
- 111 Gorelick NJ, Andrews JL, Gu M, Glickman BW. Mutational spectra in the lacI gene in skin from 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-treated and untreated transgenic mice. *Mol Carcinog* 1995; 14(1): 53-62
- 112 Tombolan F, Renault D, Brault D, Guffroy M, Perin-Roussel O, Perin F et al. Kinetics of induction of DNA adducts, cell proliferation and gene mutations in the liver of MutaMice treated with 5,9-dimethyldibenzo[c,g]carbazole. *Carcinogenesis* 1999; 20(1): 125-132
- 113 Tombolan F, Renault D, Brault D, Guffroy M, Perin F, Thybaud V. Effect of mitogenic or regenerative cell proliferation on lacZ mutant frequency in the liver of Muta<sup>TM</sup>Mice treated with 5, 9-dimethyldibenzo[c,g]carbazole. *Carcinogenesis* 1999; 20(7): 1357-1362
- 114 Gezondheidsraad. Ethyleenoxide en styreen; toetsing van criteriadocumenten. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1986: publicatie nr 1986/17.
- 115 Sisk SC. Determination of circulating micronuclei and mutant frequency in lung, spleen, and germ cells of male B6C3F1 LacI transgenic mice after inhalation exposure to ethylene oxide (EtO). *Environ Mol Mutagen* 1994; 23 (suppl 23): 62
- 116 Sisk SC, Pluta LJ, Meyer KG, Wong BC, Recio L. Assessment of the in vivo mutagenicity of ethylene oxide in the tissues of B6C3F1 lacI transgenic mice following inhalation exposure. *Mutat Res* 1997; 391(3): 153-164
- 117 van Delft JH, Bergmans A, Baan RA. Germ-cell mutagenesis in lambda lacZ transgenic mice treated with ethylating and methylating agents: comparison with specific-locus test. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 165-173
-

- 118 van Delft JH, Bergmans A, van Dam FJ, Tates AD, Howard L, Winton DJ et al. Gene-mutation assays in lambda lacZ transgenic mice: comparison of lacZ with endogenous genes in splenocytes and small intestinal epithelium. *Mutat Res* 1998; 415(1-2): 85-96
- 119 Suzuki T, Hayashi M, Wang X, Yamamoto K, Ono T, Myhr BC et al. A comparison of the genotoxicity of ethylnitrosourea and ethyl methanesulfonate in lacZ transgenic mice (Muta Mouse). *Mutat Res* 1997; 395(1): 75-82
- 120 The Collaborative Study Group of the Transgenic Mouse Mutation Assay MMSGotEMSoJ. Organ variation in the mutagenicity of ethylnitrosourea in MutaMouse: result of the Collaborative Study on the Transgenic Mutation Assay by JEMS/MMS. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 363-375
- 121 Brooks TM, Dean SW. The detection of gene mutation in the tubular sperm of Muta Mice following a single intraperitoneal treatment with methyl methanesulphonate or ethylnitrosourea. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 219-222
- 122 Cosentino L, Heddle JA. A test for neutrality of mutations of the lacZ transgene. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 313-316
- 123 Cruz-Munoz W, Kalair W, Cosentino L, Heddle JA. ENU induces mutations in the heart of lacZ transgenic mice. *Mutat Res* 2000; 469(1): 23-34
- 124 da Costa GG, Manjanatha MG, Marques MM, Beland FA. Induction of lacI mutations in Big Blue rats treated with tamoxifen and alpha-hydroxytamoxifen. *Cancer Lett* 2002; 176(1): 37-45
- 125 van Delft JH, Baan RA. Germ cell mutagenesis in lambda lacZ transgenic mice treated with ethylnitrosourea; comparison with specific-locus test. *Mutagenesis* 1995; 10(3): 209-214
- 126 Dolle ME, Martus HJ, Gossen JA, Boerrigter ME, Vijg J. Evaluation of a plasmid-based transgenic mouse model for detecting in vivo mutations. *Mutagenesis* 1996; 11(1): 111-118
- 127 Douglas GR, Jiao J, Gingerich JD, Gossen JA, Soper LM. Temporal and molecular characteristics of mutations induced by ethylnitrosourea in germ cells isolated from seminiferous tubules and in spermatozoa of lacZ transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(16): 7485-7489
- 128 Douglas GR, Jiao J, Gingerich JD, Soper LM, Gossen JA. Temporal and molecular characteristics of lacZ mutations in somatic tissues of transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 317-324
- 129 Douglas GR, Gingerich JD, Soper LM, Jiao J. Toward an understanding of the use of transgenic mice for the detection of gene mutations in germ cells. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 197-212
- 130 Gorelick NJ, Andrews JL, Gibson DP, Carr GJ, Aardema MJ. Evaluation of lacI mutation in germ cells and micronuclei in peripheral blood after treatment of male lacI transgenic mice with ethylnitrosourea, isopropylmethane sulfonate or methylmethane sulfonate. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 187-195
- 131 Itoh S, Miura M, Shimada H. Lack of mutagenicity of levofloxacin in lacZ transgenic mice. *Mutagenesis* 1998; 13(1): 51-55
- 132 Liegibel UM, Schmezer P. Detection of the two germ cell mutagens ENU and iPMS using the LacZ/ transgenic mouse mutation assay. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 213-218
- 133 Morrison V, Tinwell H, Ashby J. Consideration of the liver of embryonic lacZ transgenic mice as an analogue of the mouse coat colour spot test: preliminary data and technical problems. *Mutat Res* 1995; 329(2): 107-112
-

- 134 Provost GS, Short JM. Characterization of mutations induced by ethylnitrosourea in seminiferous tubule germ cells of transgenic B6C3F1 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(14): 6564-6568
- 135 Provost GS, Rogers BJ, Dyaico MJ, Carr G. Evaluation of the transgenic Lambda/LacI mouse model as a short-term predictor of heritable risk. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 129-136
- 136 Skopek TR, Kort KL, Marino DR. Relative sensitivity of the endogenous hprt gene and lacI transgene in ENU-treated Big Blue B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen* 1995; 26(1): 9-15
- 137 Suzuki T, Itoh S, Takemoto N, Yajima N, Miura M, Hayashi M et al. Ethyl nitrosourea and methyl methanesulfonate mutagenicity in sperm and testicular germ cells of lacZ transgenic mice (Muta Mouse). *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 155-163
- 138 Tinwell H, Lefevre P, Williams CV, Ashby J. The activity of ENU, ipMS and MMS in male mouse germ cells using the Muta Mouse positive selection transgenic mutation assay. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 179-185
- 139 Walker VE, Gorelick NJ, Andrews JL, Craft TR, deBoer JG, Glickman BW et al. Frequency and spectrum of ethylnitrosourea-induced mutation at the hprt and lacI loci in splenic lymphocytes of exposed lacI transgenic mice. *Cancer Res* 1996; 56(20): 4654-4661
- 140 Winegar RA, Carr G, Mirsalis JC. Analysis of the mutagenic potential of ENU and MMS in germ cells of male C57BL/6 lacI transgenic mice. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 175-178
- 141 Douglas GR, Gingerich JD, Soper LM. Evidence for in vivo non-mutagenicity of the carcinogen hydrazine sulfate in target tissues of lacZ transgenic mice. *Carcinogenesis* 1995; 16(4): 801-804
- 142 Chen T, Mittelstaedt RA, Aidoo A, Hamilton LP, Beland FA, Casciano DA et al. Comparison of hprt and lacI mutant frequency with DNA adduct formation in N-hydroxy-2-acetylaminofluorene-treated Big Blue rats. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37(3): 195-202
- 143 Frijhoff AF, Krul CA, de Vries A, Kelders MC, Weeda G, van Steeg H et al. Influence of nucleotide excision repair on N-hydroxy-2-acetylaminofluorene-induced mutagenesis studied in lambda lacZ-transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31(1): 41-47
- 144 Pletsa V, Steenwinkel MJ, van Delft JH, Baan RA, Kyrtopoulos SA. Methyl bromide causes DNA methylation in rats and mice but fails to induce somatic mutations in lambda lacZ transgenic mice. *Cancer Lett* 1999; 135(1): 21-27
- 145 Rihn BH, Bottin MC, Coulais C, Rouget R, Monhoven N, Baranowski W et al. Genotoxicity of 3-methylcholanthrene in liver of transgenic big Blue mice. *Environ Mol Mutagen* 2000; 36(4): 266-273
- 146 Itoh S, Miura M, Shimada H. Germ cell mutagenesis in lacZ transgenic mice treated with methyl methanesulfonate. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 223-228
- 147 Brault D, Bouilly C, Renault D, Thybaud V. Tissue-specific induction of mutations by acute oral administration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and beta-propiolactone to the Muta Mouse: preliminary data on stomach, liver and bone marrow. *Mutat Res* 1996; 360(2): 83-87
- 148 Brault D, Renault D, Tombolan F, Thybaud V. Kinetics of induction of DNA damage and lacZ gene mutations in stomach mucosa of mice treated with beta-propiolactone and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, using single-cell gel electrophoresis and MutaMouse models. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(2-3): 182-189
-



- 149 Monroe JJ, Kort KL, Miller JE, Marino DR, Skopek TR. A comparative study of in vivo mutation assays: analysis of hprt, lacI, cII/cI and as mutational targets for N-nitroso-N-methylurea and benzo[a]pyrene in Big Blue mice. *Mutat Res* 1998; 421(1): 121-136
- 150 Provost GS, Kretz PL, Hamner RT, Matthews CD, Rogers BJ, Lundberg KS et al. Transgenic systems for in vivo mutation analysis. *Mutat Res* 1993; 288(1): 133-149
- 151 Quillardet P, Michel V, Arrault X, Hofnung M, Touati E. Mutagenic properties of a nitrofurantoin, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2, 1-b]furan (R7000), in lacI transgenic mice. *Mutat Res* 2000; 470(2): 177-188
- 152 Suzuki T, Hayashi M, Sofuni T, Myhr BC. The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C in vivo using lacZ transgenic mice. *Mutat Res* 1993; 285(2): 219-224
- 153 Guttenplan JB, Kosinska W, von Pressentin MM, Rosa J, El Bayoumy K. Effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate (p-XSC) and vitamin E on 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO)-induced mutagenesis in lacZ mouse upper aerodigestive tissue. *Mutat Res* 2002; 518(1): 85-93
- 154 von Pressentin MM, El Bayoumy K, Guttenplan JB. Mutagenic activity of 4-nitroquinoline-N-oxide in upper aerodigestive tissue in lacZ mice (MutaMouse) and the effects of 1, 4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Mutat Res* 2000; 466(1): 71-78
- 155 Nakajima M, Kikuchi M, Saeki K, Miyata Y, Terada M, Kishida F et al. Mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide in the MutaMouse. *Mutat Res* 1999; 444(2): 321-336
- 156 Jiao J, Douglas GR, Gingerich JD, Soper LM. Analysis of tissue-specific lacZ mutations induced by N-nitrosodibenzylamine in transgenic mice. *Carcinogenesis* 1997; 18(11): 2239-2245
- 157 Itoh S, Miura M, Itoh T, Miyauchi Y, Suga M, Takahashi Y et al. N-Nitrosodi-n-propylamine induces organ specific mutagenesis with specific expression times in lacZ transgenic mice. *Mutat Res* 1999; 444(2): 309-319
- 158 Hara T, Hirano K, Hirano N, Tamura H, Sui H, Shibuya T et al. Mutation induction by N-propyl-N-nitrosourea in eight MutaMouse organs. *Mutat Res* 1999; 444(2): 297-307
- 159 Schmezer P, Eckert C, Liegibel UM. Tissue-specific induction of mutations by streptozotocin in vivo. *Mutat Res* 1994; 307(2): 495-499
- 160 Chen T, Aidoo A, Manjanatha MG, Mittelstaedt RA, Shelton SD, Lyn-Cook LE et al. Comparison of mutant frequencies and types of mutations induced by thiothepa in the endogenous Hprt gene and transgenic lacI gene of Big Blue rats. *Mutat Res* 1998; 403(1-2): 199-214
- 161 de Boer JG, Holcroft J, Cunningham ML, Glickman BW. Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate causes a gradient of mutations in the cortex and outer and inner medullas of the kidney of lacI transgenic rats. *Environ Mol Mutagen* 2000; 36(1): 1-4
- 162 Shane BS, Smith-Dunn DL, deBoer JG, Glickman BW, Cunningham ML. Subchronic administration of phenobarbital alters the mutation spectrum of lacI in the livers of Big Blue transgenic mice. *Mutat Res* 2000; 448(1): 69-80
- 163 Lefevre PA, Tinwell H, Galloway SM, Hill R, Mackay JM, Elcombe CR et al. Evaluation of the genetic toxicity of the peroxisome proliferator and carcinogen methyl clofenapate, including assays using Muta Mouse and Big Blue transgenic mice. *Hum Exp Toxicol* 1994; 13(11): 764-775
-

- 164 DeMarini DM, Shelton ML, Kohan MJ, Hudgens EE, Kleindienst TE, Ball LM et al. Mutagenicity in lung  
of big Blue((R)) mice and induction of tandem-base substitutions in Salmonella by the air pollutant  
peroxyacetyl nitrate (PAN): predicted formation of intrastrand cross-links. *Mutat Res* 2000; 457(1-2): 41-55
- 165 Gezondheidsraad. Chloroform en tetrachloormethaan; Toetsing van een criteriadocument. Rijswijk:  
Gezondheidsraad; 1987: publicatie nr 1987/15.
- 166 Gezondheidsraad: Commissie Risico-evaluatie van stoffen - dioxinen. Dioxinen. Polygechloreerde dibenzo-  
*p*-dioxinen, dibenzofuranen en dioxine-achtige polychloorbifenylen. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1996:  
publicatie nr 1996/10.
- 167 Thornton AS, Oda Y, Stuart GR, Glickman BW, de Boer JG. Mutagenicity of TCDD in Big Blue transgenic  
rats. *Mutat Res* 2001; 478(1-2): 45-50
- 168 Provost GS. Evaluation of mutagenic and non-mutagenic compounds using LacI transgenic rodents.  
*Environ-Mol-Mutagen* 23 (Suppl 23), 55. 1994.
- 169 Kohara A, Suzuki T, Honma M, Ohwada T, Hayashi M. Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/  
lacZ transgenic mouse (MutaMouse). *Mutat Res* 2002; 515(1-2): 63-72
- 170 Gezondheidsraad. Asbest; toetsing van een ontwerp-basisdocument. Den Haag: Gezondheidsraad; 1988:  
publicatie nr 1988/31.
- 171 Rihn B, Coulais C, Kauffer E, Bottin MC, Martin P, Yvon F et al. Inhaled crocidolite mutagenicity in lung  
DNA. *Environ Health Perspect* 2000; 108(4): 341-346
- 172 Topinka J, Loli P, Georgiadis P, Dusinska M, Hurbankova M, Kovacikova Z et al. Mutagenesis by asbestos  
in the lung of lambda-lacI transgenic rats. *Mutat Res* 2004; 553(1-2): 67-78
- 173 Unfried K, Schurkes C, Abel J. Distinct spectrum of mutations induced by crocidolite asbestos: clue for 8-  
hydroxydeoxyguanosine-dependent mutagenesis in vivo. *Cancer Res* 2002; 62(1): 99-104
- 174 Ashby J. Results for the big blue transgenic assay using two genotoxins and a peroxisome proliferator.  
*Environ Mol Mutagen* 1993; 21 (suppl 22): 4
- 175 Leavitt SA, DeAngelo AB, George MH, Ross JA. Assessment of the mutagenicity of dichloroacetic acid in  
lacI transgenic B6C3F1 mouse liver. *Carcinogenesis* 1997; 18(11): 2101-2106
- 176 Rompelberg CJ, Steenwinkel MJ, van Asten JG, van Delft JH, Baan RA, Verhagen H. Effect of eugenol on  
the mutagenicity of benzo[a]pyrene and the formation of benzo[a]pyrene-DNA adducts in the lambda-lacZ-  
transgenic mouse. *Mutat Res* 1996; 369(1-2): 87-96
- 177 Miyata Y, Saeki K, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T, Suzuki T. Antimutagenic structural modification of  
quinoline assessed by an in vivo mutagenesis assay using lacZ-transgenic mice. *Mutat Res* 1998; 414(1-3):  
165-169
- 178 Culp SJ, Beland FA, Heflich RH, Benson RW, Blankenship LR, Webb PJ et al. Mutagenicity and  
carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green. *Mutat Res* 2002; 506-  
507: 55-63
- 179 Arrault X, Michel V, Quillardet P, Hofnung M, Touati E. Comparison of kinetics of induction of DNA  
adducts and gene mutations by a nitrofurantoin compound, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-b]furan (R7000), in  
the caecum and small intestine of Big Blue mice. *Mutagenesis* 2002; 17(4): 353-359
-

- 180 Nishikawa A, Furukawa F, Kasahara K, Ikezaki S, Itoh T, Suzuki T et al. Trans-4-hydroxy-2-nonenal, an aldehydic lipid peroxidation product, lacks genotoxicity in lacI transgenic mice. *Cancer Lett* 2000; 148(1): 81-86
- 181 Takahashi S, Ikeda Y, Kimoto N, Okochi E, Cui L, Nagao M et al. Mutation induction by mechanical irritation caused by uracil-induced urolithiasis in Big Blue rats. *Mutat Res* 2000; 447(2): 275-280



- 
- A Adviesaanvraag
- 
- B Commissie
- 
- C Begrippenlijst
- 
- D Overzicht van stoffen en hun testuitslagen

---

## **Bijlagen**



---

## Adviesaanvraag

---

Op 3 april 2002 stuurde de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport een brief (kenmerk: GZB/C&O/2268208) aan de voorzitter van de Gezondheidsraad met de volgende inhoud:

Door TNO en RIVM is een rapport opgesteld getiteld 'Mutagenicity of chemicals in genetically modified animals' in opdracht van het ministerie van SZW en het ministerie van VWS. In het rapport wordt ingegaan op nieuwe testmodellen voor het onderzoek naar mutagene eigenschappen van stoffen.

Het onderzoek naar de mutageniteit is van groot belang bij de toelating van nieuwe stoffen en bij de beoordeling van prioritair gestelde bestaande stoffen. Mutageniteit speelt bij de beoordeling van stoffen een sleutelrol met name in verband met de eventuele kankerverwekkendheid en de mogelijkheid van het veroorzaken van erfelijke afwijkingen. Bij indeling van de stof als bewezen mutageen en/of kankerverwekkend wordt de toepassing van de stof voor de consument verboden.

Tot nu toe zijn er geen goede gevalideerde in vivo genmutatie testen voorhanden, waardoor de mutageniteit van de stof afdoende bepaald kan worden. In het rapport wordt een overzicht gegeven van veelbelovende in vivo genmutatie testen, uitgevoerd met 'transgene' muizen.

Graag zou ik van u advies ontvangen of (en welke) nieuwe in vivo genmutatie testen in de routine van de beoordeling van stoffen ingezet kunnen worden en wat de eventuele beletselen daarbij kunnen zijn.

Hoogachtend,  
de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport,  
w.g. dr E Borst-Eilers

---





---

## Commissie

---

De commissie die het advies heeft opgesteld bestond uit:

- dr GMH Swaen, *voorzitter tot 1 september 2004*  
epidemioloog; Universitair Medisch Centrum, Maastricht (tot 1 september 2004),  
Dow Benelux BV, Terneuzen (vanaf 1 september 2004)
  - dr PJ Boogaard  
toxicoloog; Shell International BV, Den Haag
  - drs HC Dreef - van der Meulen  
toxicologisch patholoog; NV Organon, Oss
  - prof dr VJ Feron (tot 19 februari 2004)  
emeritus hoogleraar biologische toxicologie; Zeist
  - prof dr H van Loveren (vanaf 14 november 2003)  
hoogleraar immunotoxicologie, Universiteit Maastricht; tevens Rijksinstituut voor  
Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
  - prof dr GR Mohn (tot 1 januari 2004)  
hoogleraar cellulaire mutatie-genetica, Leids Universitair Medisch Centrum
  - prof dr GJ Mulder  
hoogleraar toxicologie, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Leiden
  - dr MJM Nivard  
moleculair bioloog en genetisch toxicoloog, Leids Universitair Medisch Centrum
  - dr PC Noordam, *adviseur* (tot 19 februari 2004)  
Ministerie van Sociale Zaken en Werkgelegenheid, Den Haag
-

- dr H te Riele  
moleculair bioloog; Nederlands Kanker Instituut, Amsterdam
- dr H Roelfzema, *adviseur*  
Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, Den Haag
- prof dr W Slob  
hoogleraar kwantitatieve risicobeoordeling, Universiteit Utrecht; tevens Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- prof dr ALM Verbeek  
hoogleraar klinische epidemiologie, Radboud Universiteit Nijmegen
- prof. dr ir AA van Zeeland (vanaf 1 februari 2004, *voorzitter vanaf 1 september 2004*)  
hoogleraar moleculaire stralingsdosimetrie en stralingsmutagenese, Leids Universitair Medisch Centrum
- prof dr EJJ van Zoelen  
hoogleraar celbiologie, Radboud Universiteit Nijmegen
- dr JA van Zorge, *adviseur*  
Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Den Haag
- dr ir PW van Vliet, *secretaris*  
Gezondheidsraad, Den Haag

Aan het advies hebben de volgende deskundigen een bijdrage geleverd:

- dr J van Benthem  
genetisch toxicoloog; Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- dr GR Douglas  
genetisch toxicoloog; Health Canada, Ottawa, Canada
- dr CAM Krul  
genetisch toxicoloog; TNO Voeding, Zeist
- prof dr IB Lambert  
hoogleraar biologie en biochemie, Carleton University, Ottawa, Canada
- dr MD Shelby  
genetisch toxicoloog; National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, VS
- dr V Thybaud  
genetisch toxicoloog; Aventis Pharma, Vitry-sur-Seine, Frankrijk

---

## Begrippenlijst

---

carcinogeen	kankerverwekkend
DNA	erfelijk materiaal
endogeen	van nature aanwezig
gen	drager van een erfelijke eigenschap
genetisch gemodificeerde dieren	dieren waarvan de celkern in alle lichaamscellen DNA bevat met dezelfde verandering
genmutatie	verandering binnen een gen, zoals een basepaarsubstitutie (vervanging van een basepaar in het DNA door een ander basepaar) en een kleine deletie (verlies van een stukje van het DNA)
genotoxiciteit	vermogen om potentieel schadelijke veranderingen in het DNA aan te brengen
gevoeligheid	kans dat een genotoxische stof positief scoort
mutageniteit	vermogen om mutaties te veroorzaken
mutatie	permanente, overdraagbare wijziging in de hoeveelheid of structuur van het erfelijk materiaal van cellen of organismen
mutatiefrequentie	het aantal mutaties per reportergenkopie
negatieve voorspellende waarde	kans dat een negatieve score betekent dat de stof niet genotoxisch is
positieve voorspellende waarde	kans dat een stof die positief scoort genotoxisch is
reportergen	gen dat op genmutaties wordt onderzocht
specificiteit	kans dat een niet-genotoxische stof negatief scoort
transgeen	ingevoegd door middel van genetische modificatie

---



## Overzicht van stoffen en hun testuitslagen

stof	carcinogeniteit <sup>a</sup>	genotoxiciteit <sup>b</sup>			BB <sup>c</sup>	MM	organen/ weefsels <sup>d</sup>	referenties BB/MM	
		in vitro	in vivo	totaal					
<b>genotoxisch</b>									
2-acetylaminofluoreen	+	+	+	+	e	+	lever 1,6	32	
							lever 5	33	
							+(m)	lever 3	34
							+	lever 3	35
acrylamide	+ (2A)	+	+	+ <sup>36</sup>		+	beenmerg 6	37	
							-	lever 2	38
							+	beenmerg 3	39
adozelesine		+	+	+	+(m)		lever 3	40	
aflatoxine	+ (1)	+	+	+ <sup>41</sup>			lever 4, nier 3	42	
							+(r)	lever 3	43, 44
							-(m)	lever 1,3	45
							+(r)	lever 20	45
<i>p</i> -aminoazotolueen	+ (2B)	+	+	+		+	lever 3, colon 6, beenmerg 1, long 1,2, nier 3, blaas 2, testis 3	46	
4-aminobifenyl	+(1)	+	+	+		+	blaas 14, lever 5, beenmerg 2	47	
							+(r)	lever 3, nier 7, blaas 4	48

2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline (MeIQ)	+(2B)	+	+	+	+(m)		colon 38, beenmerg 6, lever 5, voormaag 3	<sup>49,50</sup>
2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline (MeIQx)	+(2B)	+	+	+		+	lever 4	<sup>51</sup>
					+(m)		lever 9, colon 4	<sup>52</sup>
						+	lever 55	<sup>53</sup>
2-amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline (IQ)	+(2A)	+	+	+	+(r)		lever 4, colon 3, nier 2	<sup>54</sup>
						+	lever 4	<sup>51</sup>
2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine (PhIP)	+(2B)	+	+	+		+	dikke darm 6, dunne darm 4, lever 1,6, nier 1	<sup>55</sup>
					+(r)		colon 25	<sup>56</sup>
					+(r)		prostaat 20	<sup>57</sup>
					+(r)		blinde darm 7, colon 21	<sup>58</sup>
					+(r)		colon 16	<sup>59</sup>
					+(r)		prostaat 5	<sup>60</sup>
					+(m)		colon 3	<sup>61</sup>
2-amino-9H-pyrido[2,3- <i>b</i> ]indool (AαC)	+(2B)	+	+	+		+	lever 3	<sup>51</sup>
arseentrioxide	+(1)	+	+	<sup>62</sup>		-	long 1,0, nier 1,0, beenmerg ?, blaas ?	<sup>63</sup>
benzeen	+(1)	+	+	<sup>64</sup>	+(m)		beenmerg 1,5, milt 1,5, long 1,3	<sup>65</sup>
benzo[ <i>a</i> ]pyreen	+(2A)	+	+	<sup>66</sup>		+	huid 11, lever 0,9, long 1,1	<sup>67</sup>
						+	colon 37, ileum 24, voormaag 15, beenmerg 18, milt 25, maag 9, lever 5, long 4, nier 4, hart 2, hersenen 1,5	<sup>68</sup>
					+(m)		milt 13	<sup>69,70</sup>
					+(r)		long 2	<sup>71</sup>
					+(m)		milt-T-cellen 9	<sup>72</sup>
1,3-butadieën	+(2A)	+	+	+		+	long 2, beenmerg 0,7, lever 1,3	<sup>73,74</sup>
					+(m)		beenmerg 4	<sup>74</sup>
					+(m)		beenmerg 6	<sup>75</sup>
					+(m)		beenmerg 4	<sup>76</sup>
CC-1065		+	+	+	+(m)		lever 3	<sup>40</sup>

chlorambucil	+ (1)	+	+	+		+	beenmerg 3, lever 10, testis 22	<sup>87</sup>
						+	beenmerg 2	<sup>89</sup>
4-chloor- <i>o</i> -fenyleendiamine	+ (2B)	+	+	+ <sup>41</sup>	+(m)		lever 8	<sup>77-79</sup>
chrom(VI)-verbindingen	+ (1)	+	+	+ <sup>80</sup>		+	beenmerg 1, lever 2	<sup>81</sup>
						+	beenmerg 2, lever 2	<sup>82</sup>
					+(m)		long 5, nier 4, lever 4	<sup>83</sup>
cisplatina	+ (2A)	+	+	+ <sup>84</sup>		+	lever 2	<sup>85</sup>
cyclofosfamide	+ (1)	+	+	+ <sup>41</sup>	+(m)		long 3, blaas 3, nier 1,4, beenmerg 1,5	<sup>86</sup>
						+	beenmerg 6	<sup>87</sup>
					+(m)		testis 0,9, milt 0,8, lever 1,9	<sup>87</sup>
					+(m)		milt 3	<sup>69,70</sup>
						+	beenmerg 3	<sup>89</sup>
					-(m)		milt-T-lymfocyten 1,2	<sup>88</sup>
cyproteronacetaat	+ (2B)	+	+	+	+(r)		lever 4	<sup>89</sup>
2,4-diaminotolueen	+ (2B)	+		+	+(m)		lever 2	<sup>90,91</sup>
					+(m)		lever 2	<sup>78</sup>
di-ethylnitrosamine (DEN) (N-ethyl-N-nitroso-ethaanamine)	+ (2A)	+	+	+		+	beenmerg 1, lever 7	<sup>92</sup>
						+	lever 19	<sup>93</sup>
						+	beenmerg ongeveer 1, lever ongeveer 3	<sup>94</sup>
						+	lever 6, nier 2, long 2, blaas 1,1, beenmerg 1,3, testis 0,8	<sup>95</sup>
dimethylnitrosamine (DMN) (N-methyl-N-nitroso-methaanamine)	+ (2A)	+	+	+ <sup>96</sup>	+(m)		lever 4, blaas 1	<sup>97</sup>
					+(m)		lever 3	<sup>90,91</sup>
					+(m)		lever 37	<sup>98</sup>
					+(m)		lever 16	<sup>99</sup>
						+	neusmucosa 10, long 1,2, lever 2	<sup>100</sup>
					+(m)		lever 2	<sup>101</sup>
						+	lever 5	<sup>101</sup>
					+(m)		lever 2	<sup>102</sup>
					+(m)		lever 6	<sup>103</sup>
					+(m)		voormag 1,1, lever 2, long 1,2	<sup>104,105</sup>

					+(m)		lever 6, nier 2, long 2, beenmerg 1,3, blaas 1,3, testis 0,8	<sup>95</sup>
						+	lever 5, milt 3	<sup>106</sup>
					+(m)		lever 4	<sup>22</sup>
						+	lever 6	<sup>22</sup>
						+	lever 5	<sup>35</sup>
6-( <i>p</i> -dimethylamino- fenylazo)benzothiazol	+	+	+	+	+(r)		lever 10	<sup>107</sup>
7,12-dimethyl- benzo[ <i>a</i> ]anthraceen (DMBA)	+	+	+	+		+	huid 3	<sup>108</sup>
						+	huid 15	<sup>109</sup>
						+	beenmerg 30, lever 12, colon 3, zwezerik 4, huid 3, nier 1,1, testis 3	<sup>110</sup>
						+	beenmerg 3, huid 6	<sup>57</sup>
					+(m)		huid 6	<sup>111</sup>
						+	huid 4	<sup>39</sup>
						+	lever 2, colon 1,5, beenmerg 9, long 0,5, nier 1, blaas 1,6, testis 5	<sup>46</sup>
5,9-dimethyldi- benzo(c,g)carbazol	+		+	+		+	lever 58	<sup>112</sup>
						+	lever 3	<sup>113</sup>
ethyleenoxide	+(2A)	+	+	+	+(m)		long 1,4, milt 2, zaad- cellen -	<sup>115</sup>
					+(m)		long 1,5, beenmerg 1,9, milt 1,9, zaadka- nalen uit testis 1,0, milt-B- en T-cellen 4	<sup>116</sup>
ethylmethaansulfonaat	+(2B)	+	+	+		+	zaadcellen uit epidid- ymis en vas deferens 2	<sup>117</sup>
						+	dunne darm 2, milt 3	<sup>118</sup>
						-	lever 1, beenmerg 2, hersenen 1,5	<sup>92</sup>
						+	beenmerg 5, lever 1,8	<sup>119</sup>
N-ethyl-N-nitroso-ureum (ENU)	+(2A)	+	+	+		+	lever 2,0, milt 18, beenmerg 19, hersen- nen 1,6, long 2, nier 2, blaas 11, hart 2	<sup>120</sup>



					+	zaadcellen uit testis 5	<sup>121</sup>
					+	dunne darm 28	<sup>122</sup>
					+	hart 5, dunne darm 1,3	<sup>123</sup>
					+(r)	lever 11, baarmoeder 14	<sup>124</sup>
					+	zaadcellen uit epididymis en vas deferens 9	<sup>125</sup>
					+	zaadcellen uit epididymis en vas deferens 6	<sup>117</sup>
					+	dunne darm 11, milt 6	<sup>118</sup>
					+	milt 14	<sup>126</sup>
					+	zaadcellen uit testis 18, uit vas deferens 4	<sup>127</sup>
					+	beenmerg 34, lever 11	<sup>128</sup>
					+	zaadcellen uit testis 16, uit epididymis 9	<sup>129</sup>
					+(m)	zaadkanalen uit testis 1,5, zaadcellen uit epididymis 2	<sup>130</sup>
					+	beenmerg 40, lever 27, testis 32	<sup>57</sup>
					+	beenmerg 31, lever 6	<sup>81</sup>
					+	beenmerg 50, lever 3, testis 2, epididymis 2	<sup>131</sup>
					+	testis 10	<sup>26</sup>
					+(m)	zaadkanalen uit testis 4, milt 8	<sup>69,70</sup>
					+	lever 7	<sup>38</sup>
					+	testis 7	<sup>132</sup>
					+	lever 4, beenmerg 23, hersenen -	<sup>92</sup>
					+(m)	lever 3	<sup>40</sup>
					+	(lever 1, embryonale lever 4)	<sup>133</sup>
					+	beenmerg 40, lever 17	<sup>39</sup>
					+(m)	zaadcellen uit testis 20	<sup>134</sup>
					+(m)	zaadkanalen uit testis 3, zaadcellen uit epididymis 0,7	<sup>135</sup>

					+	long 4, beenmerg 24, lever 5	<sup>13,74</sup>
					+(m)	beenmerg 20	<sup>74</sup>
					+(m)	beenmerg 35	<sup>75</sup>
					+(m)	milt-T-cellen 8	<sup>136</sup>
					+	beenmerg, lever	<sup>94</sup>
					+	beenmerg 10, lever 2	<sup>119</sup>
					+	zaadkanalen testis 5, zaadcellen uit epididymis en vas deferens 1,3	<sup>137</sup>
					+	testis 16	<sup>138</sup>
					+(m)	milt-T-cellen 3	<sup>139</sup>
					+(m)	zaadkanalen uit testis 5	<sup>140</sup>
etoposide	+(2A)	+	+	+	+	beenmerg 1,3	<sup>55</sup>
hydrazinesulfaat	+(hydrazine 2B)	+(hydrazine)	+(hydrazine)	+(hydrazine)	-	(long 1,3, lever 1,3, beenmerg 0,9)	<sup>141</sup>
N-hydroxy-2-acetylaminofluoreen	+	+	+	+	+(r)	lever 40, milt 3	<sup>142</sup>
					-	lever 2	<sup>143</sup>
isopropylmethaansulfonaat	+		+	+	+	testis 7, epididymis 4	<sup>129</sup>
					+(m)	zaadkanalen uit testis 1,3	<sup>130</sup>
					+	testis 5, epididymis 3, vas deferens 4	<sup>26</sup>
					+	testis 2	<sup>132</sup>
					+(m)	zaadkanalen uit testis 3, zaadcellen uit epididymis 0,8	<sup>135</sup>
					+	testis 4	<sup>138</sup>
methylbromide	+/- (3)	+	+	+	-	(lever 1,3, kliermaag 0,7)	<sup>144</sup>
β-methylcholantreen	+	+	+	+	+(m)	lever 1,3, voormaag 0,8	<sup>145</sup>
methylnmethaansulfonaat	+(2B)	+	+	<sup>84</sup>	-	zaadcellen uit testis 1,3	<sup>121</sup>
					+	zaadcellen uit epididymis en vas deferens 1,5	<sup>117</sup>
					-	zaadkanalen uit testis 1,3, zaadcellen uit epididymis 1,1	<sup>129</sup>

					-(m)		zaadkanalen uit testis 1,1	<sup>130</sup>
						-	testis 1,3, zaadcellen uit epididymis en vas deferens 1,0, milt 1,1	<sup>146</sup>
						-	testis 1	<sup>132</sup>
					+(m)		lever 1,7	<sup>99</sup>
					-(m)		zaadkanalen uit testis 1,3, zaadcellen uit epididymis 0,9	<sup>135</sup>
						-	zaadkanalen uit testis 1,2, zaadcellen uit epididymis en vas deferens 1,1	<sup>137</sup>
						-	testis 1,2, zaadcellen uit epididymis 0,9	<sup>138</sup>
						-	lever 2, beenmerg 1,5	<sup>55</sup>
					-(m)		zaadkanalen uit testis 1,4	<sup>140</sup>
N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG)	+(2A)	+	+	+		+	maag 6, lever -, beenmerg -	<sup>147</sup>
						+	maag 19	<sup>148</sup>
						+	maag 13, lever 1,3, huid 78	<sup>109</sup>
						+	huid 5	<sup>39</sup>
N-methyl-N-nitroso-ureum (MNU)	+(2A)	+	+	+		+	zaadcellen uit epididymis en vas deferens 6	<sup>117</sup>
						+	dunne darm 6, milt 2	<sup>118</sup>
					+(m)		milt 75, lever 11	<sup>70</sup>
					+(m)		milt-T-cellen 3	<sup>149</sup>
					+(m)		hersenen 3, long 23, zaadcellen 6	<sup>150</sup>
					+(m)		voormaat 1,3, lever 2, long 1,2, nier 1	<sup>104,105</sup>
					+(m)		milt 12	<sup>151</sup>
mitomycine C	+(2B)	+	+	<sup>84</sup>		+	(beenmerg 1,7, lever 0,5)	<sup>152</sup>
4-nitroquinoline-1-oxide	+	+	+	+		+	tong 39, slokdarm 20, gepoold mondweefsel 54	<sup>153</sup>

						+	tong 34, slokdarm 24, gepoold mondweef- sel 15, long 0,8, lever 0,7, colon 0,8	<sup>154</sup>
						+	lever 9, beenmerg 51, testis 3, nier 1,2, milt 1,2, long 1,6, maag 55	<sup>155</sup>
N-nitroso-dibenzylamine		+	+	+		+	beenmerg 1,7, lever 4	<sup>156</sup>
N-nitroso-dipropylamine	+ (2B)	+	+	+		+	beenmerg 2, lever 12, long 3, nier 1,4, blaas 1,0, testis 0,5	<sup>157</sup>
N-propyl-N-nitroso-ureum	+		+	+		+	beenmerg 8, lever 2, long 1,9, nier 2, milt 3, testis 4, hersenen 1,0, hart 2	<sup>158</sup>
procarbazine	+ (2A)	+	+	<sup>+41</sup>		+	beenmerg 91	<sup>57</sup>
						+	beenmerg 30	<sup>59</sup>
β-propiolacton	+ (2B)	+	+	+		+	maag 9, lever 2, beenmerg -	<sup>147</sup>
						+	maag 11	<sup>148</sup>
streptozotocine	+ (2B)	+	+	+	+(m)		lever 2, nier 6	<sup>159</sup>
tamoxifen	+ (1)	+	+	+	+(r)		lever 3, baarmoeder 0,4	<sup>124</sup>
					+(r)		lever 3	<sup>43, 44</sup>
thiotepa	+ (1)	+	+	<sup>+41</sup>	+(r)		miltlymfocyten 4	<sup>160</sup>
tris(2,3-dibroompropyl)- fosfaat	+ (2A)	+	+	<sup>+41</sup>	+(m)		nier 1,5, maag 1,5, lever 1,2	<sup>65</sup>
					+(r)		nierschors 6, nier- merg (binnenkant) 2, niermerg (buiten- kant) 4	<sup>161</sup>
urethaan	+ (2B)	+	+	<sup>+84</sup>	+(m)		voormaag 1,5, lever 5, long 7	<sup>104,105</sup>
<b>niet-genotoxisch</b>								
<i>o</i> -anisidine	+ (2B)	+	-	-	+(m)		lever 1,5, blaas 2	<sup>97</sup>
di(2-ethylhexyl)ftalaat	+/- (3)	+/-	-	-	-(m)		lever 1,7	<sup>53</sup>
fenobarbital	+ (2B)	+/-	-	-	-(m)		lever 1,2	<sup>53</sup>
					-(m)		lever ongeveer 1	<sup>98</sup>
						+	lever 1,4	<sup>162</sup>
						-	lever 1,1	<sup>113</sup>
heptachlor	+/(3)	+/-	-	-	-(m)		lever 2	<sup>53</sup>

levofloxacin		+	-	-	-	-	beenmerg 1,0, lever 1,2, testis 1,0, epididymis 1,3	<sup>131</sup>
methylclofenapaat	+	-	-	-	-(m)	-	lever 1,2	<sup>163</sup>
						-	lever 0,8	<sup>163</sup>
2-nitro- <i>p</i> -fenyleendiamine	+ (3)	+	-	-	+(m)	-	lever 2	<sup>78</sup>
oxazepam	+ (2B)	+	-	-	+(r)	-	lever 1,9	<sup>103</sup>
peroxyacetylnitraat		+	-	-	+(m)	-	long 1,3	<sup>164</sup>
saccharine (natriumzout)	+/- (3)	+	-	-	-(r)	-	lever 1,2, (blaas 0)	<sup>48</sup>
tetrachloormethaan	+ (2B)	+/-	-	-	-(m)	-	lever ongeveer 1	<sup>98</sup>
						-	lever 1,6	<sup>113</sup>
2,3,7,8-tetrachloordibenzo- <i>p</i> -dioxine	+ (1)	-	-	-	-(r)	-	lever 1,0	<sup>167</sup>
genotoxiciteit onvoldoende onderzocht								
4-acetylaminofluoreen	-				-(?)	-	lever -, blaas -	<sup>168</sup>
aristolochinezuur	+	+				+	voormaag 33, nier 10, blaas 16, colon 9, maag 3, long 2, lever 1, beenmerg 2, milt 3, testis 1,5	<sup>169</sup>
asbest	+ (1)	+			+(m)	-	long 2	<sup>171</sup>
					+(r)	-	long 1,6	<sup>71</sup>
					+(r)	-	long 2	<sup>172</sup>
					+(r)	-	omentum 3	<sup>173</sup>
azijnzuur		-				+	huid 8	<sup>39</sup>
2,6-diaminotolueen	-	+			-(m)	-	lever 1,0	<sup>90,91</sup>
1-(2-chloorethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitroso-ureum (Methyl-CCNU)	+ (1)				-(m)	-	beenmerg 9, lever -	<sup>174</sup>
1-chloor-methylpyreen		+				+	maag 1,3, huid 10	<sup>109</sup>
dichloorazijnzuur	+/- (3)	-	+/-		+(m)	-	lever 2	<sup>175</sup>
dimethylarsinezuur		+				-	long 1,3, nier 1,0, beenmerg ?, blaas ?	<sup>63</sup>
6,11-dimethylbenzo[ <i>b</i> ]nafto-[2,3- <i>d</i> ]thiofeen	+	+				+	huid 5	<sup>108</sup>
eugenol	+/- (3)	+/-				-	lever 0,9	<sup>176</sup>
3-fluoroquinoline	-	-				-	lever 1,0, beenmerg 1,1, testis 1,6	<sup>177</sup>
5-fluoroquinoline	+ rat	+				+	lever 5, beenmerg 1,4, testis 1,6	<sup>177</sup>
foron					-(m)	-	lever 2, nier 2	<sup>42</sup>

leucomalachietgroen		+/-			+(r)		lever 3	<sup>178</sup>
D-limoneen	+/- (3)	-			-(r)		lever 1,1, nier 1,1	<sup>48</sup>
7-methoxy-2-nitro-naftho[2,1-b]furaan	+	+			+(m)		milt 2, testis 1, maag 1, slokdarm 1,3, lever 0,8, dunne darm 3, blinde darm 4, colon 2, blaas 2	<sup>151</sup>
					+(m)		dunne darm 5, blinde darm 5	<sup>179</sup>
quinoline	+	+				+	(lever 4, beenmerg 1,5, testis 1,4)	<sup>177</sup>
						+	lever 4; nier, long en milt ongeveer 1	<sup>106</sup>
toremifen	+/- (3)	+/-	+/-		-(r)		lever 1,4	<sup>43 44</sup>
trans-4-hydroxy-2-nonenal		+			-(m)		long 1,1, lever 2, nier 1,1	<sup>180</sup>
uracil	+				+(r)		blaas 5	<sup>181</sup>

<sup>a</sup> Tussen haakjes staat de IARC-classificatie vermeld:

1: de stof is carcinogeen bij de mens

2A: de stof is waarschijnlijk carcinogeen bij de mens (beperkt bewijs bij de mens, voldoende bewijs in proefdieren)

2B: de stof is mogelijk carcinogeen bij de mens (beperkt bewijs bij de mens en onvoldoende bewijs in proefdieren, of inadequaat bewijs bij de mens, maar voldoende bewijs in proefdieren)

3: de stof kan niet worden geclassificeerd voor wat betreft de carcinogeniteit bij de mens (de stof wordt in deze groep geplaatst als hij in geen van de andere groepen past)

4: de stof is waarschijnlijk niet carcinogeen bij de mens (bewijs dat duidt op het ontbreken van carcinogene eigenschappen bij mensen en in proefdieren)

<sup>b</sup> Genotoxiciteit in vitro, in vivo en in totaal. Bij het totaaloordeel geven de in vivo bevindingen de doorslag. Het oordeel is gebaseerd op de uitslagen van klassieke genotoxiciteitstests en op indirect bewijs uit onder meer onderzoek naar de vorming van DNA-adducten

<sup>c</sup> (m): muis; (r): rat; (?): diersoort niet gerapporteerd; +: minstens een orgaan of weefsel positief; -: alle geteste organen en weefsels negatief

<sup>d</sup> onderzochte organen en weefsels met quotiënt van mutatiefrequenties van behandelde en controlegroep (tussen haakjes bij lage waarden en gepoolde analyse per groep of ontbrekende informatie over statistische bewerking); bij meerdere proefopzetten het hoogste getal; -: geen statistisch significante toename mutatiefrequentie, maar quotiënt onvermeld; ?: geen oordeel mogelijk (groeps-grootte onvoldoende)

<sup>e</sup> +: positief; +/-: twijfelachtig; - negatief; lege cel: niet of niet adequaat onderzocht.

---

# The use of reporter genes for mutagenicity testing in animals

---

*G*

---







To the Minister of Health, Welfare and Sport

---

Subject : Submission of advisory report on the use of reporter genes for mutagenicity testing in animals  
Your reference : GZB/C&O/2268208  
Our reference : U-1715/EvV/RA/246-D10  
Appendices : 2  
Date : 24 January 2005

Minister,

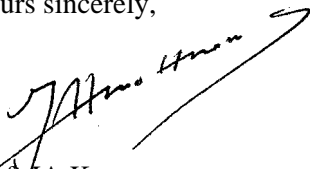
I hereby submit an advisory report on the use of reporter genes for mutagenicity testing in animals. This was drawn up by the Committee on the Evaluation of the Carcinogenicity of Chemical Substances, at the request of your ministerial predecessor. It was evaluated by the Standing Committee on Health and Environment, together with various Dutch and foreign experts from outside the Health Council of the Netherlands.

The Committee concludes that reporter-gene based assay systems in animals are not yet suitable for the standardised testing of chemical substances for genotoxic properties. However, it notes that opportunities already exist to reduce the procedural variation between tests based on such systems. The Committee has set out the main points of these options. It feels that the details could best be worked out within the framework of the OECD.

Preparations are already being made for the OECD to develop the relevant guidelines. A report on the use of reporter genes for mutagenicity testing in animals is also being drawn up within the framework of the WHO's *International Programme on Chemical Safety*. I would ask you to consider making this report available to these organizations, for their inspection.

Today I have also submitted this advisory report to the State Secretary for Housing, Spatial Planning and the Environment.

Yours sincerely,



Prof. JA Knottnerus



---

# **The use of reporter genes for mutagenicity testing in animals**

---

to:

the Minister of Health, Welfare and Sport  
the State Secretary of Housing, Spatial Planning and the Environment

---

No. 2005/01, The Hague, January 24, 2005

---

---

The Health Council of the Netherlands, established in 1902, is an independent scientific advisory body. Its remit is “to advise the government and Parliament on the current level of knowledge with respect to public health issues...” (Section 21, Health Act).

The Health Council receives most requests for advice from the Ministers of Health, Welfare & Sport, Housing, Spatial Planning & the Environment, Social Affairs & Employment, and Agriculture, Nature & Food Quality. The Council can publish advisory reports on its own initiative. It usually does this in order to ask attention for developments or trends that are thought to be relevant to government policy.

Most Health Council reports are prepared by multidisciplinary committees of Dutch or, sometimes, foreign experts, appointed in a personal capacity. The reports are available to the public.



The Health Council of the Netherlands is a member of INAHTA, the international network of health technology assessment (HTA) agencies that promotes and facilitates information exchange and collaboration among HTA agencies.

---

This report can be downloaded from [www.healthcouncil.nl](http://www.healthcouncil.nl).

---

Preferred citation:

Health Council of the Netherlands. The use of reporter genes for mutagenicity testing in animals. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2005; publication no. 2005/01.

---

all rights reserved

---

ISBN: 90-5549-552-2

---

---

# Contents

---

Executive summary 79

- 
- 1 Introduction 85
  - 1.1 Question posed and Committee 85
  - 1.2 Account 85
  - 1.3 Layout of the advisory report 86

- 
- 2 Testing for mutagenicity 87
  - 2.1 Effect on genetic material 87
  - 2.2 Detecting changes in DNA 88
  - 2.3 New mutagenicity assays 89

- 
- 3 Results of new assays 91
  - 3.1 Selection of assay systems 91
  - 3.2 The classification of substances on the basis of classical assays 93
  - 3.3 Results of new assays 94
  - 3.4 Unusual features in the assay's design 95
  - 3.5 Assay performance and reproducibility of assay results 97
-

---

4	Conclusions and recommendations	99
4.1	Reliability	100
4.2	Viability for risk assessment	103
4.3	Recommendations regarding further validation and standardisation	104
4.4	Recommendations for inclusion in the current testing strategy	107

---

Literature 109

---

Annexes 123

A	Request for advice	125
B	Committee	127
C	List of concepts	129
D	Summary of substances and their test results	131

---

## Executive summary

---

---

### Request for advice regarding new assay method

Chemical substances capable of modifying the body's genetic material (DNA) possess genotoxic properties. Mutations are irreversible changes to DNA. Such changes can affect any of the various types of cells in the body, and can lead to cancer. In addition, mutations in germ cells can also be transmitted to future generations. Assays for genotoxic properties in chemical substances form the basis for measures aimed at reducing these risks.

Genotoxicity can be established using a variety of assays. Mutagenicity assays are particularly important, as they can identify changes in DNA. Using *in vivo* assays, experimental animals are exposed to the substance under investigation. *In vitro* assays involve the use of cells or microorganisms. If *in vitro* and *in vivo* assays produce contradictory results, then more weight is usually given to the experimental animal results, since these organisms more closely resemble human beings. Indirect evidence is also taken into account when reaching a verdict with regard to genotoxicity. This can relate to (*in vitro* or *in vivo*) assays of the formation of DNA adducts (covalent bonding to DNA). In this advisory report, the *in vivo* data is similarly conclusive, therefore 'genotoxic' (or 'non-genotoxic') really means 'genotoxic *in vivo*' (or 'non-genotoxic *in vivo*').

Mutagenicity can manifest itself in the form of chromosomal abnormalities and gene mutations. These occur if DNA repair has not taken place prior to cell division. There are standardised, practical *in vitro* genotoxicity assays for chromosomal abnor-

---

malities, gene mutations, and DNA repair. The first two are mutagenicity assays, while the latter is used to determine indirectly whether or not a substance is genotoxic. Furthermore, these assays have in vivo counterparts, which are used to investigate chromosomal abnormalities and DNA repair. However, there is as yet no standardised, practical in vivo assay for gene mutations.

Nevertheless, new in vivo assays have been developed to identify substances capable of causing gene mutations. The new assays detect gene mutations using reporter genes. This means that the assay focuses on gene mutations in a particular gene (where a genetic characteristic is encoded), rather than on the entire DNA content of the cell. The reporter genes are either endogenous in origin (i.e. present in the natural situation) or transgenic (i.e. obtained from another species and introduced into the endogenous DNA via genetic modification).

The Minister of Health, Welfare and Sport has asked the Health Council of the Netherlands whether these new gene mutation assays with animals are suitable for use in the routine safety testing of chemical substances. A Health Council committee has assessed the question of whether such assays can be used to fill the above-mentioned gap in the safety testing of substances. The Committee consulted several Dutch and foreign experts from outside the Health Council while preparing its advisory report.

---

### **The Committee's procedures**

In order to assess whether mutagenicity assays using reporter genes in experimental animals deliver reliable results, the Committee has compared results from the new assays with the conclusion derived from the previously described classical genotoxicity studies. Where the results are in agreement, this indicates the new assay's ability to determine whether or not a substance is genotoxic.

The Committee has restricted itself to verdicts on assays in experimental animals, using two different transgenic reporter genes. This is because these are the only assays in which the published test results are derived from a sufficiently large number of substances to enable sound conclusions to be drawn concerning assay characteristics such as sensitivity (chance of a genotoxic substance achieving a positive score) and specificity (chance that a non-genotoxic substance will achieve a negative score).

Published assay results derived from a sufficiently large number of substances are only available via Medline for the following experimental animals with transgenic reporter genes: Big Blue® rat and mouse strains, and the Muta™Mouse mouse strain. Assay results are available for a total of 64 genotoxic and non-genotoxic substances. However, the assay procedures showed considerable variation. They differ, for instance, in terms of the level and duration of exposure, and in terms of the organs analysed.



---

## **Verdict concerning the reliability of the new assays**

On the basis of the assay results, the Committee concludes that assays using reporter genes in the selected rat and mouse strains are, in theory, suitable for the investigation of substances' ability to cause gene mutations. However, the assays are not yet sufficiently reliable for routine use. Firstly, the data cannot be used to derive a standard protocol, setting out broad outlines of the way in which the assay must be performed. Furthermore, while the assay characteristics sensitivity and specificity are high, support for the figures in question is inadequate. Therefore, the figures are provisional.

This is because the substances on which the figures are based are not representative. Relatively few non-genotoxic substances have been tested. In addition, within the group of substances designated as genotoxic, there is a preponderance of highly genotoxic substances. Accordingly, the Committee is only able to assign an indicative value to calculated assay characteristics such as sensitivity and specificity. Furthermore, the reproducibility of positive and negative results has been insufficiently investigated.

The assay characteristics give the Committee no reason to suppose that the above-mentioned rat and mouse strains differ from one another in terms of their suitability for distinguishing substances which are genotoxic from those that are not.

Both false negative and false positive results have been obtained. The false negative results may have been generated by the way in which the assay is performed, for instance, either the exposure time or expression time may be too short. Alternatively, if the method's degree of sensitivity is relatively low, this might account for these findings. Both explanations are indicative of failure on the part of the new assay.

In the case of false positive scores, the Committee feels that these can be explained in terms of deficiencies in the assay methods which were used as a standard. The new assay systems make it possible to determine whether substances are capable of inducing gene mutations *in vivo*. This is not possible using the methods with which they are being compared. The Committee therefore assumes that the substances in question are indeed genotoxic, but they are not identified as such by the usual *in vivo* assays. It recommends that, while a positive score using the new assay systems should provisionally be considered an indication of genotoxic properties, a negative score cannot be taken as proof that the substance in question has no such properties.

The false negative scores obtained for the reproductive organs form a separate case. The assay systems are unable to test substances for mutagenicity in germ cells at certain stages of maturation. There is a technical reason for this. When using reporter genes, it is not possible to demonstrate mutagenic action in the stages following meiosis (reduction division). Substances which are only mutagenic in these stages therefore score negative in germ cells.

---

---

## **Verdict regarding viability in routine safety testing**

In vivo assay systems using transgenic reporter genes are highly flexible. They differ from the existing, standardised in vivo assay systems in that, theoretically, cells in any type of organ can be investigated. However, germ cells at an advanced stage of development in the reproductive system are an exception. This permits a tailor-made approach, in which the assay's design can be attuned to previous toxicological findings with regard to the substance in question. This reduces the risk of false negative results. However, the term 'routine use' presupposes the existence of a standard protocol. The Committee feels that the available data does not support the drafting of a protocol of this kind at the present time.

The Committee concludes that it is not (yet) appropriate to standardise the use of assay systems based on the transgenic animals referred to above. However, the Committee does feel that the situation is sufficiently well understood for the use of these assay systems to be permitted on an ad hoc basis, provided that the test design is well substantiated. The procedure must therefore be geared to existing knowledge concerning the toxicity of the substance to be investigated. Aside from germ cells at an advanced stage of development, cells from any type of organ or tissue can be investigated.

---

## **Recommendations for further research**

We must wait and see whether or not it will ultimately be possible to perform the assays with greater reliability and in accordance with a standard protocol or, in any event, with smaller procedural variations. The Committee makes some suggestions regarding an assay design which can bring the realisation of that objective closer. Initially, given components of the protocol should at least be established, e.g. which organs should be analysed in association with which exposure route. Not only does this diminish the differences in assay design to some degree, it also makes the protocol applicable to a wide range of substances whose safety has not been fully investigated, if at all. In the case of substances for which data is available that might open up additional avenues in terms of assay design, it should remain possible for the time being to depart from this in order to better attune assay design with the data in question. For the time being, therefore, the procedure used should always be properly explained by the researcher. The Committee believes that the protocol can best be developed within the framework of the OECD. This is because the results of assays carried out in accordance with OECD protocols are recognised by all members of the OECD.

It is also vital that more substances be assayed, in order to increase the reliability of the assay systems. In this connection, the Committee is considering substances which

---

have been shown to be mildly genotoxic. They are also considering the use of substances which have been identified as being non-genotoxic. This is because these two categories lag far behind in terms of numbers.

---

### **Recommendations for inclusion in safety testing**

In vivo assays using transgenic reporter genes can demonstrate their viability as part of the genotoxicity assaying currently required by the EU. The EU requires a dossier containing standard toxicological data supplied by the manufacturer or the party which uses the substance for commercial purposes or which is placing it on the market. In the genotoxicity section, the results are requested of in vitro and in vivo assays which have been carried out step by step. In addition to production volume, it is the use to which the substance in question is to be put (e.g. crop protection) which determines exactly which genotoxicity assays are permitted or required in each of the various steps.

Despite these differences in terms of testing strategy, the Committee believes that the possibility of using the new assay systems across all policy areas involving substance regulation to be worthy of consideration. The assay is already permitted in a few of these areas, provided that there is a well-supported assay design. The Committee recommends that the assay be approved for use in the remaining areas, subject to the same conditions.

While the assay is a valuable addition to the current testing repertoire, it is laborious and time-consuming in comparison to the established assays. Furthermore, there is no standardisation, which is a major precondition for validation. The Committee therefore feels that, for the time being, it is suitable as an ad hoc supplement to the current assays.



---

# Introduction

---

## 1.1 Question posed and Committee

Mutagenicity assays are a standard feature of procedures to determine whether chemical substances have hazardous properties<sup>1-3</sup>. Mutagenicity assays detect changes to the genetic material which occur following exposure to these substances. These changes can produce effects such as the development of cancer.

Els Borst, the former minister of Health, Welfare and Sport requested advice from the Health Council of the Netherlands concerning the usefulness of a new type of mutagenicity assay (see Annex A). Rather than investigating an organism's entire complement of DNA, assays of this type just focus on part of it – the so-called reporter genes.

The President of the Health Council has asked the Committee on the Evaluation of the Carcinogenicity of Chemical Substances – referred to in this report as 'the Committee' – to respond to this request for advice. Details of the current make-up of the Committee are set out in Annex B.

---

## 1.2 Account

Published material found during on-line searches in PubMed (Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) form the scientific basis of the advisory report. The key words used during these searches were 'mutagens', 'mutagenicity tests', 'knockout mice', 'reporter genes' and 'genetically modified animals'. From the result-

---

ant list, review articles were selected which included an examination of the method's viability for routine toxicological testing. Where necessary, literature sources cited in these publications were consulted. Other documents examined included a review report by RIVM and TNO, as well as recent publications not covered by the reviews. The literature survey was terminated on 15 October 2004. The Committee consulted several Dutch and foreign experts from outside the Health Council while preparing its advisory report.

The definitions of genotoxicity and mutagenicity, the advisory report's key concepts, were based on international agreements. Previously, the Committee used its own definitions<sup>2,3</sup>. However, it now prefers to use concept definitions which have been agreed by international consensus. The OECD and the WHO's International Programme on Chemical Safety use a common list of concepts for risk assessment<sup>4</sup>. However, the concepts mentioned above do not appear in this list. The United Nations' Globally Harmonized System for Classification and Labelling of Chemicals is also incomplete<sup>5</sup>. The Committee has therefore decided to adopt the EU's definitions of genotoxicity and mutagenicity.

---

### **1.3 Layout of the advisory report**

The structure of the advisory report is as follows. Section 2 contains background information concerning mutagenicity and the assay methods for detecting it. Section 3 contains a description of new mutagenicity assays using reporter genes. It also provides a summary of what is currently known regarding the following assay characteristics: sensitivity, specificity and predictive value. Next, in section 4, the viability of the new type of mutagenicity assays for routine investigations is assessed. Recommendations are made for further validation, standardisation, and inclusion in the EU's safety policy for chemical substances. This then is the response to the request for advice.

---

## Testing for mutagenicity

---

### 2.1 Effect on genetic material

Changes to an organism's DNA, its genetic material, are potentially detrimental. While they can occur spontaneously, such changes can also be produced by certain chemical substances and some types of radiation. These agents are therefore described as genotoxic. They possess the ability to induce potentially harmful changes to an organism's DNA <sup>6</sup>.

Changes to DNA are reversible until the DNA is replicated prior to cell division. This is because, up until that moment, the changes can be reversed by DNA repair enzymes. If these repairs are not carried out prior to DNA replication, then the changes become irreversible. Following cell division, they are passed on to the daughter cells.

Irreversible changes to DNA are referred to as mutations. The Committee understands this to mean a permanent, transmissible change in the amount or structure of genetic material within cells or organisms <sup>6</sup>. In all types of body cells, mutations in the DNA can lead to cancer. Furthermore, mutations in germ cells can be passed on to succeeding generations.

A substance is described as a mutagen if an assay demonstrates that it has the ability to cause mutations. Substances of this kind are, by definition, genotoxic. However, genotoxicity can reveal itself by the formation of DNA adducts (covalent bonding to DNA), for example. This is an indirect indication that the substance is capable of damaging DNA.

---

The question of whether or not substances possess genotoxic properties is also important in terms of policy. It is assumed that genotoxic substances have no threshold level of exposure beneath which no adverse health effects are to be expected<sup>2,3</sup>. Non-genotoxic substances on the other hand are assumed to have such a threshold. The classification of substances into 'genotoxic' and 'non-genotoxic' is therefore one of the pillars of substance policy at national and EU level.

Genotoxicity is a strong indication that the substance in question is also carcinogenic. Thus, if a substance has been shown to be genotoxic, this can be a reason to skip assays for carcinogenicity and to prohibit further use of the substance. If the substance is difficult to replace, then assays for carcinogenicity go ahead anyway. In the event that these yield a positive result, then a risk assessment is carried out in order to establish an upper exposure level. It is not possible to identify all cancer-causing substance via their genotoxic properties. This is because the carcinogenicity of some substances is based on mechanisms other than that of changing the genetic material. These are non-genotoxic carcinogens.

Specific government measures are taken in response to evidence of genotoxicity in the germ cells. Accordingly, the use of a substance in consumer products is prohibited if it has been shown to be both mutagenic and capable of reaching the reproductive organs of individuals who have been exposed to it<sup>7</sup>. Nor is use for this purpose permitted if mutagenicity has been demonstrated in germ cells.

---

## 2.2 Detecting changes in DNA

Researchers detect the genotoxic action of a substance by means of genotoxicity assays. These assays fall into two groups: assays to demonstrate mutagenicity and assays to detect variables other than mutations. One example of the latter group is an assay for Unscheduled DNA Synthesis (UDS). This detects DNA repair synthesis, which is indirect evidence of genotoxicity.

There are many types of assays for establishing mutagenicity: *in vitro*, using cells or micro-organisms, and *in vivo*, using experimental animals. If necessary, the assays can be performed in a series of individual steps. This means that, following a limited number of assays, the decision can be taken to suspend the testing of a substance. This would be the case if the results showed the substance to be genotoxic and, as a result, it was decided that the substance should either not be used or that it should be withdrawn from use. If *in vitro* and *in vivo* assays produce contradictory results, then more weight is usually given to the latter, since these more closely reflect the situation in human beings<sup>2</sup>. The reason for this is that, in the latter case, experimental animals are exposed rather than just human or animal cells, or microorganisms. This can highlight substances which, although not genotoxic, can nevertheless be converted into genotoxic metabo-

---



lites. This occurs mainly in the liver. In addition, body cells can be exposed in a physiological manner.

Different mutagenicity assays target different types of mutations. Mutations can be classified into gene mutations and chromosomal abnormalities<sup>2</sup>. Gene mutations involve changes within a gene\*, such as base-pair substitutions (the replacement of DNA base pairs by other base pairs) and minor deletions (the loss of sections of DNA). Chromosomal abnormalities are the result of breaks in the chromosomes or of the faulty distribution of chromosomes among daughter cells during cell division.

In the case of a small number of mutagenicity assays, the EU (in the context of its substance policy) has set out protocols in the form of guidelines, virtually all of which have been adopted from the OECD. The results of assays carried out in accordance with such OECD protocols are recognised by all members of the OECD. These include the member states of the EU, the US, Canada, Australia and Japan. There are OECD guidelines governing various *in vitro* assays for gene mutations and chromosomal abnormalities. There are also guidelines for a few *in vivo* assays, such as the micronucleus assay, which detects chromosome breaks and deletions, and the above-mentioned assay for UDS.

As yet, however, there are no standardised *in vivo* assays for gene mutations. One exception is the spot test\*\*, but this is not very popular as it requires large numbers of experimental animals. The UDS assay is often performed instead. The assays which form the subject of this advisory report appear capable of filling the gap, with regard to the *in vivo* assay for gene mutations. They are introduced in the following subsections, after which their performance is addressed in section 3. In section 4, a view is expressed concerning their viability for risk assessment.

---

### 2.3 New mutagenicity assays

There is a range of new *in vivo* assays, using rats and mice, for demonstrating the presence of gene mutations. A summary of these assays was published in a recent RIVM/TNO report<sup>8</sup>. A characteristic feature of these assays is that a specific gene, the reporter gene, is investigated for the presence of mutations, rather than the entire DNA content of the cell. Depending on the type of reporter gene used, these assays can be divided into two groups, both of which are discussed here. One type of assay makes use of endogenous reporter genes, which are naturally present in the experimental animals. The other type uses foreign (transgenic) reporter genes, which have been introduced into the normal DNA via genetic modification.

---

\* carrier of a genetic characteristic

\*\* gene mutations are detected as fur spots of changed colour

---

## Endogenous reporter genes

Assays based on endogenous reporter genes generally involve genes that code for the enzymes hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT), thymidine kinase (TK) and adenosine phosphoribosyltransferase (APRT). The detection of mutations is based on a loss of enzyme function resulting from the mutation.

The HPRT gene is located on the X chromosome. Since male and female cells both contain one active allele, normal, non-genetically modified rat or mouse strains can be used for the purposes of detection. The TK and APRT genes on the other hand are not located on the sex chromosomes. In the case of these genes, both alleles are active. Since mutations in these genes are subject to recessive inheritance, the knockout technique was used to create mouse strains which have only one of the two active alleles in each of their cells. These strains can also be used to detect mutations through the resultant lack of active enzyme. Such cases involve both an endogenous reporter gene and genetic modification of the experimental animals.

Mutation frequency is defined as the number of mutations per copy of the reporter gene. This is determined using organs or tissues whose cells can be cultured, such as the spleen. To this end the cells are cultured on a medium which incorporates a substrate that is converted into a toxic product by the enzyme (HPRT, TK or APRT). Cells in which mutations have occurred do not produce the enzyme and are therefore able to survive, unmutated cells do produce the enzyme and die as a result.

## Transgenic reporter genes

The other type of assay uses rat and mouse strains incorporating a transgenic reporter gene of bacterial origin. This gene is present in every cell of the animal's body. In order to determine the mutation frequency, all of the DNA in an organ or tissue is isolated. Next, the reporter gene is isolated and 'packaged' in a bacteriophage or plasmid. This package is then introduced into a bacterial strain which lacks the reporter gene in question. The bacteria are then subjected to a colour test in which only those bacteria with a mutated reporter gene become coloured (alternatively only cells with no such mutation become coloured). They can also be introduced to a nutrient medium in which only mutants can survive. Since DNA can be obtained from any organ, this variant is not restricted to certain types of tissue.

The most popular strains for this type of assay are the Muta<sup>TM</sup>Mouse (MM) mouse strain, which incorporates the lacZ reporter gene, and the Big Blue<sup>®</sup> mouse and rat strains (BB), which carry the lacI reporter gene.

---

## Results of new assays

---

Data from the available scientific literature indicate the extent to which substances with and without genotoxic properties can be identified using the new mutagenicity assays based on reporter genes. This is because the results obtained for these two groups of substances in the assays in question can be compared with those in classical studies of genotoxicity. In this section, before discussing the findings obtained using this approach, the Committee will explain how it selected reporter-gene assay systems for assessment.

---

### 3.1 Selection of assay systems

Each of the assay systems (using either naturally occurring or introduced reporter genes) has its pros and cons. In the case of endogenous reporter genes, one can only examine those organs whose cells can be cultured. On the other hand, it has the advantage of a low frequency of spontaneous mutations.

The major advantage of transgenic systems is that, in theory, any organ or organ system can be analysed. However, they do differ in terms of the ease with which DNA can be extracted and the quantities of the reporter gene that can be obtained. Freedom of choice with regard to organs can be important if, on the basis of prior knowledge of a substance, one wants to focus on particular organs.

The main drawback of transgenic systems is their high number of spontaneous mutations per copy of the reporter gene (multiple copies of which are present in every cell of the animal's body). This can, perhaps, best be explained as follows. In transgenic systems, the mutation frequency is ultimately measured in bacteria. However, reporter

---

genes can undergo further mutation following their insertion into the bacterial cell<sup>9,10</sup>. This could account for the fact that the spontaneous mutation frequency is higher in transgenic systems than in endogenous systems, which do not need the bacterial step. It may be that, as a result, the former detect a lower percentage of genotoxic substances than the latter. However, this possibility has yet to be investigated.

Although they are more time consuming and labour intensive than the usual *in vivo* mutagenicity assays, the Committee considers the new reporter-gene methods to be a very promising means of investigating the genotoxic properties of substances. All of the variants are, in theory, suitable for this purpose. There are no scientific grounds for excluding certain variants.

Nevertheless, the Committee has not assessed every single genetically modified rat and mouse strain that could be used in a gene mutation assay. It discusses only those assay results for genetically modified rat and mouse strains in which the number of substances tested is sufficiently large to enable sound conclusions to be drawn. This was found to apply only to the transgenic MM and BB. In this regard, assay results are available for approx. one hundred substances<sup>11-13</sup>. For the purposes of this advisory report, BB and MM include the commercially available strains and the parental lines from which they are descended. Various review articles discuss their significance in terms of detecting carcinogenic properties<sup>11,13</sup>. However, the Committee has focused on genotoxic properties. The reason for this is that the assay systems detect mutagenicity, yet there is not a one-to-one relationship between carcinogenicity and (this form of) genotoxicity. After all, there are also non-genotoxic carcinogens.

In addition, the Committee has restricted the number of substances on which it bases its conclusions. Assay results for about one hundred substances are available<sup>11-13</sup>. For the purposes of reaching a verdict, however, the Committee has limited itself to those substances for which both the design and results of the assay used are reported in literature available via Medline. This was also conditional upon the assay in question being adequately performed and reported. Mixtures and ionising radiation were not taken into consideration.

Finally, the assessment was limited to the *lacI* and *lacZ* genes of BB and MM, respectively. The foreign DNA of BB and that of the MM variant in which a bacteriophage was used as the vector contains yet another reporter gene, namely *cII*. The Committee did not take this gene into consideration, however, since it has been tested for gene mutations with only fifteen substances. The equivalent number for *lacI* and *lacZ* is at least forty.

---

## 3.2 The classification of substances on the basis of classical assays

Annex D summarises the 85 substances used by the Committee to test the reliability of the new reporter gene assay systems. The table illustrates results obtained using traditional assays for genotoxicity, carcinogenicity, in addition to the results of assays with the BB and MM experimental animal strains. Details of in vitro, in vivo and total genotoxicity are included. In this overall verdict, as previously explained, more weight is given to the in vivo results. A final verdict of ‘genotoxic’ (or ‘non-genotoxic’) is therefore synonymous with ‘genotoxic in vivo’ (or ‘non-genotoxic in vivo’). The verdict on whether or not a substance is genotoxic, is not only based on its scores\* in conventional genotoxicity tests. This verdict also includes the results of studies which provide indirect information about its possible genotoxic properties. This can, for example, involve studies into the formation of DNA adducts.

The verdict on genotoxicity serves as a criterion for the performance of BB and MM assay systems for mutagenicity. It was derived from previous Health Council advisory reports or reports produced by the Dutch Expert Committee on Occupational Standards, which was set up by the Ministry of Social Affairs and Employment and which became part of the Health Council in 1995. In its absence, the conclusion is based on a monograph by the ‘International Agency for Research on Cancer (IARC)’ in Lyon. If, in this case also, no such document is available, then the verdict is based on the original publications. If an IARC document is available, then, in addition to the score, the ‘carcinogenicity’ column also sets out the evidential value of findings which suggest that the substance in question is indeed a carcinogen.

Some of the review documents consulted were published some time ago. In most cases this is not a problem, since these are publications which establish the existence of genotoxic properties. The verdict of ‘genotoxic’ would not be revised by more recent reports. In the remaining cases, recent literature was consulted for additional (in vivo) data. This was the case with 4-aminobiphenyl, 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole, asbestos, 4-chloro-*o*-phenylenediamine, isopropyl methanesulphonate (IPMS), 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-*b*]furan, 2-nitro-*p*-phenylenediamine, and quinoline. If the substance’s in vivo genotoxicity has either not been fully investigated or not investigated at all, then there is no final verdict and it is placed in the catch-all residual category.

The following three groups have therefore been identified: genotoxic substances, non-genotoxic substances, and a residual group. The latter group accommodates those substances for which, as a result of gaps in the data, no conclusions can be reached on whether they possess genotoxic properties. On the basis of the outlined criteria for geno-

---

\* positive means mutagenic/genotoxic, negative is non-mutagenic/non-genotoxic

---

toxicity, the Committee has found 52 substances to be genotoxic, and 12 as non-genotoxic. They were unable to classify a further twenty-one substances.

---

### **3.3 Results of new assays**

#### Performance of the assays and interpretation of the results

The assays were performed in a variety of ways. For instance, exposure varied in terms of route, schedule and level. They also differed, for example, in terms of expression time (the interval between the end of animals' period of exposure and the moment at which they were sacrificed and their organs were removed). There were also differences in the types of organs investigated. For instance, the number of organs examined varied from one to eleven. Furthermore, the number of animals per group varied from two to ten.

Annex D does not depict the differences in assay design, with the exception of the organs investigated. The results, which are reported organ by organ, are expressed in terms of the mutation frequency in treated animals divided by that in control animals. This quotient varies from 0.5 to 90. The substances therefore score from negative to very highly positive. Corresponding organs from the various animals in a group are usually analysed separately, after which the results are subjected to statistical analysis. However, in some cases these are pooled prior to analysis, or there is no information to show how the researchers reached their final conclusions. In such instances, certainly where quotients of up to about two are involved, it is not possible to determine whether the rise in question is real or not. The Committee views values of up to two as not elevated, unless they are found to be statistically significant.

The results of the assays in BB and MM were obtained as follows. A substance is considered to be genotoxic in a given organ (or tissue) if it increases the mutation frequency relative to the control group. The substance is assigned a positive score if, at any dose, duration, etc., it produces an elevated mutation frequency in at least one of the organs (or tissues) studied. The score is negative if no extra mutations occurred in any of the organs tested. Under BB, an indication is given of whether rats or mice were used for the assay.

#### Assay results for genotoxic substances

What are the results of the new assays in terms of detecting genotoxicity? Forty-nine of the fifty-two genotoxic substances scored positive. Thus, despite the wide range of assay designs, in virtually all cases genotoxic substances are identified as such. The three genotoxic substances with negative scores (arsenic trioxide, methyl bromide, and hydrazine sulphate) were tested in four, three and two different types of organ respectively. Of

---

the other 49 substances, well over half were tested more than once. Most of these show consistently positive scores. Six produced contradictory results however. These were acrylamide, aflatoxin, cyclophosphamide, ethyl methanesulphonate (EMS), N-hydroxy-2-acetylaminofluorene, and methyl methanesulphonate (MMS).

Various substances in this group are highly genotoxic. Some of these were also found to be highly positive in various organs of BB or MM animals. A few are now in use as positive controls. As a result, more than the usual number of assay results are available for these substances. N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) is an example of the latter.

### Assay results for non-genotoxic substances

How good are the new assay systems at identifying non-genotoxic substances? Seven of the twelve non-genotoxic substances produced negative scores. Five produced positive scores. The latter group includes phenobarbital, which has been assayed on four occasions. In three of these assays it tested negative, and on one occasion it tested (weakly) positive. Methyl clofenapate and tetrachloromethane have been repeatedly assayed. Both proved to be negative in two different assays.

---

## 3.4 Unusual features in the assay's design

### Selection of organs

The distinctive characteristic of the BB and MM experimental animal strains is that they enable researchers to select specific organs for analysis. This is reflected in the wide range of organs that has been investigated. When selecting a given organ, various factors have to be taken into account, such as mode of administration. Inhalation tests, for instance, would in any event involve an investigation of the lungs. Another criterion, for example, was the opportunity to draw comparisons with standardised assays: bone marrow (micronucleus assay) or liver (UDS). With carcinogenic substances, there is usually an investigation of those organs in which the substance in question is known to induce tumours. This applies to both genotoxic and non-genotoxic carcinogens.

Non-target organs have also been studied, however. In the non-genotoxic substances tested, the tumours generally arise in the liver. Accordingly, in this group, this organ has been more frequently investigated than any other. In general, genotoxic substances are capable of inducing tumours in a range of different organs. On average, therefore, more types of organs have been investigated in this category. Therefore, to a large extent, the organs analysed mainly reflect the existing knowledge of the substance in question.

As a result of the considerable variation in the organs investigated, no general conclusions can be drawn from the organ scores.

## Detection in germ cells

Among the organs investigated, a special place is reserved for the reproductive organs, since mutations in germ cells can be passed on to succeeding generations. Evidence that a substance is mutagenic in germ cells therefore leads to more stringent restrictions on its use than is the case when mutagenicity is detected in other cell types.

The enormous number of cell divisions involved in the production of male germ cells means that these cells are more appropriate for investigating the mutagenic characteristics of substances than are female germ cells. For this reason, when investigating the effect of a variety of substances on mutation frequency, the reproductive organs of male animals were used. The mutation frequency was determined either in the testis and epididymis, or in sperm ducts, or sperm obtained from them. These preparations contain varying proportions of germ cells and connective tissue (stroma). For the purposes of safety, the Committee dealt with the results obtained using these preparations as if they had been derived from germ cells.

The substances investigated include established mouse germ cell mutagens such as ENU, EMS, IPMS, MMS and MNU. These substances have been shown to be highly positive in classical *in vivo* genotoxicity assays targeting germ cells, such as the specific-locus test and the dominant-lethal test (for example see <sup>14-21</sup>).

ENU, IPMS and MMS have been extensively tested. ENU and IPMS have always tested positive. In the overwhelming majority of assays, MMS has been shown to be negative. On only one occasion did it yield a (weakly) positive score. EMS and MNU have each been assayed on one occasion, and both were found to be positive. Thus one of the cited germ cell mutagens stands out by repeatedly yielding negative scores.

## Detection in experimental animal strains, BB versus MM

Seventeen genotoxic substances have been assayed in both BB and MM. In only one case, that of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene, did the two assay systems yield different results (positive in BB, negative in MM).

Of the non-genotoxic substances, three have been assayed in both species of animals. Two were consistently negative. The third, phenobarbital, was negative in BB, but (weakly) positive in one of the two assays carried out using MM. The mutation frequency was 1.4 times normal, which, in this case, was statistically significant.



## Detection in BB rats versus BB mice

Five genotoxic substances were assayed in BB rats and mice. Of these, four scored positive in both species. The fifth, aflatoxin, proved to be positive in rats and negative in mice.

No non-genotoxic substances have been assayed in both systems.

---

### **3.5 Assay performance and reproducibility of assay results**

#### Assay performance

The Committee has analysed the assay characteristics of sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value for BB rats and mice. It performed an identical but separate analysis for MM. Sensitivity refers to the chance of a genotoxic substance yielding a positive score, while specificity is the chance that a non-genotoxic substance will yield a negative score. A high degree of sensitivity means that there are few false negative results, while a high-degree of specificity means that there are few false-positive results. The positive predictive value is the chance that a substance which yields a positive score is indeed genotoxic. Finally, the negative predictive value is the chance that a negative score means that the substance is not genotoxic.

The assay characteristics are summarised in table 1. The Committee felt that the numbers were too small for separate calculations to be made for BB rats and BB mice. For this reason, the BB data for rats and mice was pooled. A number of substances were assayed on several different occasions, and the results were found to be contradictory. Since all but one of these substances are genotoxic, assay performance associated with a 'positive' final verdict should be substantially more favourable than in cases resulting in a verdict of 'negative'. Accordingly, when drawing up the table, calculations were made using both sets of results. For this reason, the results of the individual assays were not processed separately. This would have meant that substances which had been frequently tested would have a disproportionate influence. Substances with ten or more scores are all genotoxic, furthermore the assay characteristics are already dominated by genotoxic substances as a group.

The table shows that the BB and MM test systems are characterised by a high degree of sensitivity and a reasonably high degree of specificity. In addition, assays using these animals have a high positive predictive value. On the other hand, their negative predictive value exhibits considerable variation. Where there are contradictory assay results, the nature of the final score influences the numbers. Most percentages are somewhat lower in the case of 'negative' than in that of 'positive'.

Table 1 Characteristics of assays using BB and MM to identify genotoxic and non-genotoxic substances

Characteristic	Result							
	BB (n=43) <sup>a</sup>				MM (n=40)			
	%		fraction		%		fraction	
sensitivity	100 <sup>b</sup>	(91)	32/32	(29/32)	89	(81)	32/36	(29/36)
specificity	64	(64)	7/11	(7/11)	75	(100)	3/4	(4/4)
positive predictive value	89	(91)	32/36	(29/33)	97	(100)	32/33	(29/29)
negative predictive value	100	(70)	7/7	(7/10)	43	(36)	3/7	(4/11)

<sup>a</sup> number of substances

<sup>b</sup> substances with contradictory assay results were scored as positive. In brackets: the same substances scored as negative

### Reproducibility of assay results

The extent to which the substances produce reproducible scores in BB and MM has already been discussed. Given the differences in assay design, reproducibility here is used in the broadest possible sense. The Committee uses reproducibility in the strictest sense of the term when assays carried out using identical procedures produce matching results. Only one article provides information on this point.

Three different laboratories assayed dimethylnitrosamine, to determine whether it is genotoxic in the livers of BB mice and MM <sup>22</sup>. After the various groups of animals had been exposed, samples of their liver tissue were sent to each laboratory for analysis. In all three laboratories, both assays yielded positive results.

---

## **Conclusions and recommendations**

---

Are the new types of mutagenicity assays using reporter genes viable for the assessment of chemical substances for genotoxicity? The literature survey in section 3 shows that substances which have been shown to possess genotoxic properties have been assayed in sufficient numbers to enable conclusions to be drawn concerning the viability of testing with BB and MM. To a large extent, the very fact that they are commercially available undoubtedly explains why so many assay results obtained using these strains have been published. It also explains why reviews based on the risk assessment of substances focus on these animals.

In order to assess the viability of the new assays, the Committee first explores the issue of their reliability (subsection 4.1). The ability to produce reliable results is, after all, a major precondition for a viable assay. This is followed by a verdict on the assays' viability (subsection 4.2). The Committee then makes recommendations regarding studies aimed at improving the assays' viability (subsection 4.3). The section concludes with suggestions for their inclusion in current toxicological testing procedures (subsection 4.4).

---

## 4.1 Reliability

### General verdict

How reliable are results obtained using the new mutagenicity assays? In all, the results of assays on 64 substances (52 genotoxic and 12 non-genotoxic), were found to be suitable for the purposes of reaching a verdict.

The assays have been shown to possess high sensitivity, specificity, and positive predictive value (at least 64 percent). The negative predictive value is considerably lower (at least 36 percent). The assay performances are encouraging, given the variation in the procedures used. They do not suggest that the high frequency of spontaneous mutations in the reporter gene in any way impairs the suitability of BB and MM as assay systems. Indeed, such satisfactory assay performances may well be a direct result of the variation in assay design. After all, this is substance-specific.

The Committee feels that, given the small number of assays carried out, little significance can be attached to the observed differences in assay performance between BB and MM (or between BB rats and BB mice). In theory, the use of reporter genes should not lead to any differences at all. Partly for this reason the Committee feels that, for the time being, the two assay systems are equally well able to determine whether or not a substance possesses genotoxic properties.

While rating the assay performances as satisfactory, the Committee views the figures as provisional, mainly because the substances tested are not representative. This is because the percentage of genotoxic substances is disproportionately high. Furthermore, there is a preponderance of highly genotoxic substances within this group. This largely explains the satisfactory assay performances. Furthermore, the extent to which positive and negative results can be repeated has yet to be fully investigated.

### Explanation of false negative and false positive results

Some genotoxic substances tested negative, and some non-genotoxic substances tested positive. The Committee has no evidence to suggest that the experiments in question were not performed correctly. Nor is it a matter of group size, since the average size of the groups in question was the same as in the assays that produced correct results. Accordingly, its explanation of the results is that they are genuinely different from those obtained using classical genotoxicity assays.

In the Committee's view, an obvious explanation for the false negative scores is that the substances failed to reach the organs which were examined, due to deficiencies in assay design. For instance, the period of exposure might have been too short. Another

---

possibility is that the substances may indeed have reached the organs in question, but that the expression time was not ideal. The observed false negative results could therefore be ascribed to differences in assay design, except perhaps in the cases of aflatoxin and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene. These two compounds both proved to be negative in mice, yet they yielded a positive score in rats. In the case of aflatoxin, it has been established that rats are more susceptible to this substance than mice. It is not known whether the same can be said of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene.

Are there any other possible explanations? Might the negative results obtained using the new assays be due to the genotoxic substances' mechanism of action? The Committee feels that this is not the case, since all genotoxic substances can induce gene mutations to a greater or lesser extent. A previously held view was that genotoxic substances either caused gene mutations or chromosomal abnormalities, not both. In the light of new data, this view has become outmoded. Genotoxic substances are generally capable of inducing both types of mutation, albeit to a different extent. It is therefore unlikely that a negatively scoring genotoxic substance's mechanism of action would cause it to be overlooked by the assay system.

The Committee is more inclined to ascribe this to a low degree of sensitivity on the part of the assay system. As a result, genotoxic substances which induce relatively few gene mutations yield a negative score in the assay. The results obtained for ENU, MNU, IPMS, EMS and MMS indicate that this might well be the case. These substances are all alkylating agents, which can produce the same type of DNA adducts and, as a result, cause the same type of gene mutations<sup>23,24</sup>. The first three substances produce many mutagenic adducts per unit of DNA, the latter two considerably fewer. Another way in which the latter two substances differ from the first three is that they do not always (or very seldom) yield a positive score in BB and MM. This may indicate that the assay using these animals is less sensitive than classical genotoxicity studies.

How can the false positive assay results be explained? The explanation for non-genotoxic substances yielding positive scores could be that these substances slipped through the traditional assays, causing them to be incorrectly classified as non-genotoxic. If the target organs involved, and the results of both types of assay (traditional and new), are taken into account, then it can be seen that this scenario is far from imaginary. In addition, the Committee has a theoretical argument for this, namely that the new assay systems detect gene mutations *in vivo*, something that was not previously possible. A positive score in these assay systems might also indicate that some substances in the residual group in Annex D are also genotoxic, even though they have not been previously identified as such.

## Significance of anomalous results

New assay methods are usually validated against results obtained using tried and tested methods, which serve as a standard. This is done for lack of a better alternative. Accordingly, the validation of a new assay is usually based on a comparison with established assay methods. For the purposes of this advisory report, that is the entire body of partially validated and standardised mutagenicity assays and other types of assay, such as cohort studies of chromosomal abnormalities in peripheral blood resulting from exposure to the substance in question. There is no way of avoiding such dependence. The anomalous results obtained using the new assays should therefore be assessed in this light.

There are two possible explanations for the anomalous results, either the result yielded by the classical genotoxicity assay is correct or the result obtained using the new assay is correct. In view of the evidential value for genotoxicity using classical genotoxicity assays, the Committee feels that the false negative scores can be explained in terms of the assay design and the choice of experimental animal. It therefore favours the first of these two possible explanations. The false positive scores are a different matter. The assay system is based on gene mutations *in vivo*, which involve a different end point than that used by classical assay systems. The Committee therefore feels that it is advisable to assume that the substances in question are indeed genotoxic. Finally, the Committee points out that the risk of obtaining an incorrect result due to chance cannot be excluded.

The Committee believes that further research is required, to better understand the assay systems' sensitivity and specificity. First of all, more results from non-genotoxic substances are needed, since these substances are presently under-represented. Most of the genotoxic substances assayed are either highly or very highly genotoxic. The Committee urges that consideration also be given to mildly genotoxic substances (identified as marginally positive by classical assay methods).

## Explanation of poor score in reproductive organs

The results obtained using individual substances have enabled a verdict to be reached concerning the possibility that BB and MM can be used to detect mutagenicity in germ cells. These are the previously-mentioned established mouse germ cell mutagens, which are all highly genotoxic. Nevertheless, with the exception of a single weakly positive result, a series of experiments involving one of these mutagens (MMS) yielded negative scores in the germ cells of BB mice and MM. These experiments cover a range of expression times. This is important, as the expression time determines which developmental stages of sperm will be used to assay the substance<sup>25,26</sup>.

---

The studies revealed no deficiencies on this point, every stage was investigated. The poor scores could be related to the stages affected by the MMS mutagen. This is because this substance is known to be mutagenic only in the stages following meiosis (reduction division) (for example, see <sup>16,27</sup>). This is the type of cell division in which the number of chromosomes is halved. The BB and MM bacterial detection system cannot be used to demonstrate DNA damage in post-meiotic germ cells. It relies on DNA replication followed by cell division. Accordingly, it can be used for all types of body cells, including premeiotic germ cells. Changes in the DNA of post-meiotic cells cannot be detected using the detection system of BB and MM. This is because no DNA replication takes place during this developmental stage, which means that no mutations can arise, nor can cell division take place. This is not a problem for a classical assay like the specific-locus test, since this is based on a different detection system, involving a characteristic in the progeny that has been changed by mutation, such as fur colour. In this instance, DNA replication and cell division take place after fertilisation, i.e. in the progeny.

Unlike MMS, ENU did yield a positive score in all assays performed with BB and MM involving the analysis of germ cells. In the case of this substance, it has been established that it is mutagenic in both pre-meiotic and post-meiotic cells (for example, see <sup>18,19</sup>). This is in agreement with the explanation of the MMS results that is outlined above.

#### Limitations regarding organ selection

The Committee concludes that BB and MM cannot be used to identify substances that are mutagenic in germ cells. This is because they cannot detect substances like MMS, which are only genotoxic in post-meiotic sperm. According to the Committee, however, all of the known germ cell mutagens have also been found to be mutagenic in other cell types. Thus, partly on the basis of theoretical considerations, they view all substances which possess genotoxic properties as potential germ cell mutagens.

In theory, BB and MM can be used (without such restrictions) to determine whether substances are mutagenic in organs other than those of the reproductive system. This theory is confirmed by results from the limited number of studies that have investigated this assumption.

---

## 4.2 Viability for risk assessment

### Interpretation of future assay results

The assay results obtained to date clearly show that positive scores can identify genotoxic substances with a high degree of reliability (albeit less than 100 percent). The

---

Committee therefore takes the view that a positive score is sufficient reason to regard the substance in question as genotoxic. Another factor in the equation is the unique character of the assay systems, which is that they detect genotoxic substances which can induce gene mutations *in vivo*.

Negative results appear to be associated with a greater degree of uncertainty. These are exactly the results that people want to be able to present as proof that a substance is safe. The Committee feels that the assays still yield too many false negative results for a negative score to be accepted as proof of the absence of genotoxic properties.

### Viability for routine use

On the basis of its verdict on reliability, the Committee takes the view that assay systems using reporter genes are now able to provide valuable information. Since BB and MM enable all organs (with a limitation only in the case of the reproductive organs) to be assayed for the presence of mutations, the assay's design can be geared to the substance under investigation. This reduces the risk of false negative results.

However, the Committee sees no reason, as yet, to introduce the assay into routine use. After all, that would involve working in accordance with a protocol setting out broad outlines of the way in which the assay must be performed. The Committee feels that it is not yet possible to draft a protocol of this kind. We must wait and see whether or not it will ultimately be possible to perform the assays with sufficient reliability and in accordance with a standard protocol of this kind or, at the very least, with smaller procedural variations than has previously been the case. In order to bring the realisation of that objective closer, in the following subsection the Committee puts forward various suggestions regarding assay design.

---

## 4.3 Recommendations regarding further validation and standardisation

### Formulating sub-protocols in the face of little or no toxicological information

If there is little or no toxicological information upon which to base a decision concerning the best design for the assay, then partial agreement in the way that the assay is performed is a useful step. The Committee takes the view that sub-protocols would be appropriate in this situation.

As with previously standardised assay systems, the mode of administration to experimental animals must be geared to the physical and chemical properties of the substance to be investigated. It is not strictly necessary that the path used to administer the substance to experimental animals be the same as the one that might be involved were humans to come into contact with the substance in question. After all, the aim is to intro-

---



duce the substance into the circulatory system, so that every organ is effectively exposed. Accordingly, water-soluble substances can either be injected intravenously or administered orally (via the mouth), lipid-soluble compounds must be administered orally, while gases and volatile liquids must be inhaled.

Since it is impracticable to assay all organs for mutations, then an assay with limited scope is an appropriate option. The Committee feels that the analysis of three organs would be a sensible compromise between what is feasible and the opportunity to detect genotoxicity. Selection criteria are the degree of exposure and capacity for cell division. The Committee proposes that, at the very least, the liver and the bone marrow should be analysed. The identity of the third candidate organ for testing is dependent on the way in which the substance to be investigated is administered.

The liver is suitable as it is an organ which is rich in blood vessels. It is this rich blood supply which promotes contact with the substance that has been administered and, accordingly, possible damage to the DNA. In addition, the liver converts many substances to metabolites. This is vital for the purposes of testing, since some non-genotoxic substances can be converted to genotoxic metabolites in the liver. In cases such as this, the organ that is most exposed to these metabolites is the liver. One disadvantage of the liver is that it normally has a low rate of cell division. With regard to oral exposure there is yet another reason why the liver is suitable for investigation. Substances which enter the body by absorption in the gastrointestinal tract are first transported to the liver by the circulatory system. They must first pass through this organ before they can be distributed throughout the body. This tends to increase the liver's exposure still further.

The second tissue considered by the Committee to be relevant is bone marrow. Marrow contains rapidly dividing cells, and is therefore highly sensitive to exposure. The liver and the bone marrow are admittedly used as target organs in other *in vivo* assays, but the Committee does not see this as a problem. Firstly, the assay has a different end point (gene mutations). Furthermore, it may be found to be more sensitive. The latter point may seem to contradict previous explanations for the false negative assay results. In that instance, however, the assay was being compared to classical genotoxicity assays as a whole, whereas here it is being compared to a single assay.

In the case of oral administration and injection, the intestine is the third organ that is appropriate for analysis, given the rapid rate of cell division in the intestinal epithelium. In the case of oral administration, this is supplemented by the especially effective exposure of the gastrointestinal tract in such cases.

In the case of inhalation tests, not only the liver and bone marrow but also the lungs must be targeted for analysis.

Exposure via the skin (dermal) is not dealt with here, since the administration routes described above are more effective for the exposure of internal organs.

## Exploiting opportunities for a tailor-made approach

If suitable data is available, the assay's design can be better geared to the substance under investigation. Accordingly, in such cases, there is good reason to deviate from the partially established protocol outlined above. Data on the distribution of the substance and its metabolites throughout the body may, for instance, reveal that it would be better to target organs other than those mentioned above. The mode of administration can also be changed. In the event of dermal exposure (including suspected dermal exposure) or dermal effects, the skin can be exposed to the substance in question and investigated for genotoxicity.

In addition to a free choice of target organs, the assay systems offer several other opportunities for a tailor-made approach. Unusually, they provide the opportunity of choosing between rats and mice. This is important, for instance, if these two species differ markedly in terms of their susceptibility to the substance to be tested, as in the case of aflatoxin. The most susceptible species could then be selected. An approach of this kind is in keeping with the Health Council advisory report entitled 'Toxicology testing: a more efficient approach', which calls for an assay that is more in keeping with a substance's use and the associated exposure profile<sup>28</sup>.

The tailor-made approach can even go a step further. Just like normal, non-genetically modified animals, BB and MM carry the HPRT gene in each of their cells. This enables the individual strengths of endogenous and transgenic reporter gene systems to be combined in a single assay.

## Efforts to achieve standardisation

Aside from the suggested combinations of exposure routes and organs to be investigated for gene mutations, various other aspects of the assay lend themselves to a degree of standardisation. Since group size and assay design have a much greater effect on the result than does the final tissue analysis, it is recommended that efforts be focused on these areas<sup>25</sup>. The assay design could be standardised in terms of the duration of the assay, the exposure schedule, and the statistical analysis. The rate of cell division varies from tissue to tissue, and this in turn has implications for the best time at which to carry out an analysis<sup>29</sup>. In addition, substances also differ in terms of their kinetics. Various publications contain suggestions concerning standardisation<sup>11,13,29,30</sup>. The Committee recommends that protocols be drawn up within the framework of the OECD.

## Harmonised validation

For the further validation of the assay, the Committee recommends the OECD's general principles for the scientific validation of assay methods, a draft version of which is now available<sup>31</sup>.

---

### 4.4 Recommendations for inclusion in the current testing strategy

The *in vivo* assay using a transgenic reporter gene can easily be included in the genotoxicity testing currently required by the EU. The EU requires a dossier containing standard toxicological data supplied by the manufacturer or the party which uses the substance for commercial purposes or which is placing it on the market. In the genotoxicity section, the results are requested of *in vitro* and *in vivo* assays which have been carried out step by step. The results obtained at each step would determine the characteristics of the following step. Exceptions aside, *in vitro* assays must be carried out first, followed by *in vivo* assays if necessary. It is the production volume and the use to which the substance in question is to be put which determine exactly which genotoxicity assays are permitted or required in each of the various steps. There are separate regulations for the various substance categories, whether intended for end users (for instance, medicinal products and crop protection agents) or not (for instance, the so-called existing substances, which are recorded as a special list).

Despite the differences in terms of testing strategy, the Committee believes that the possibility of using the new testing systems across all these policy areas is worthy of consideration. The assay is already permitted in a few of these areas – including the above-mentioned 'Existing Substances' – provided that there is a well-supported assay design. The Committee recommends that the assay be approved for use in the remaining areas, subject to the same conditions.

The assay systems really come into their own when standardised genotoxicity assays produce contradictory findings with regard to the substance in question. Such situations occur, for instance, when an *in vitro* assay for gene mutations yields a positive result while the *in vivo* assays for UDS and chromosomal abnormalities prove to be negative. Thanks to the new assay systems, the substance can be assayed for its capacity to induce gene mutations *in vivo*, something that was previously impossible.

The *in vivo* assay for gene mutations is therefore a valuable element for the current testing strategy. However, it is laborious and time-consuming in comparison to the established assays. Furthermore, there is no standardisation, which is a major precondition for validation. The Committee therefore feels that, for the time being, it is suitable as an *ad hoc* supplement to the current assays, such as those for UDS and chromosomal abnormalities referred to above.

---



---

# Literature

---

- 1 Europese Raad. Richtlijn 67/548/EEG betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 1967; 196: 1
  - 2 Gezondheidsraad. Betekenis van mutageniteitstests. Den Haag: Gezondheidsraad; 1995: Publicatie nr 1995/20.
  - 3 Gezondheidsraad. Beoordeling carcinogeniteit van stoffen. Den Haag: Gezondheidsraad; 1996: Publicatie nr 1996/26.
  - 4 International Programme on Chemical Safety. Descriptors of selected key generic terms used in chemical hazard/risk assessment. Genève: WHO; 2004. Internet: [www.who.int/ipcs](http://www.who.int/ipcs).
  - 5 Verenigde Naties. The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). New York en Genève: Verenigde Naties; 2003. Internet: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs.html>.
  - 6 European Commission. Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part I. Ispra: European Commission Joint Research Centre: European Chemicals Bureau; 2003. Internet: <http://ecb.jrc.it>.
  - 7 Europese Raad. Richtlijn van de Raad van 27 juli 1976 betreffende de onderlinge aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen der Lidstaten inzake de beperking van het op de markt brengen en van het gebruik van bepaalde gevaarlijke stoffen en preparaten. Publicatieblad van de Europese Unie 1976; L 262: 201
-

- 8 Willems MI, van Benthem J. Mutagenicity of chemicals in genetically modified animals. Bilthoven: RIVM; 2000: RIVM report 650210002; TNO report V99.1097.
- 9 Malling HV, Delongchamp RR. Direct separation of in vivo and in vitro am3 revertants in transgenic mice carrying the phiX174 am3, cs70 vector. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37(4): 345-355
- 10 Weaver RP, Malling HV. The in vivo but not the in vitro am3 revertant frequencies increase linearly with increased ethylnitrosourea doses in spleen of mice transgenic for phiX174 am3, cs70 using the single burst assay. *Mutat Res* 2003; 534(1-2): 1-13
- 11 Gorelick NJ. Overview of mutation assays in transgenic mice for routine testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1995; 25: 218-30
- 12 Schmezer P, Eckert C. Induction of mutations in transgenic animal models: BigBlue™ and Muta™Mouse. In: McGregor DB, Rice JM, Venitt S, editors. *The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1999: 367-94.
- 13 Thybaud V, Dean S, Nohmi T, de Boer J, Douglas GR, Glickman BW et al. In vivo transgenic mutation assays. *Mutat Res* 2003; 540(2): 141-151
- 14 Ehling UH, Doherty DG, Malling HV. Differential spermatogenic response of mice to the induction of dominant-lethal mutations by n-propyl methanesulfonate and isopropyl methanesulfonate. *Mutat Res* 1972; 15(2): 175-184
- 15 Ehling UH, Neuhauser-Klaus A. Induction of specific-locus mutations in male mice by ethyl methanesulfonate (EMS). *Mutat Res* 1989; 227(2): 91-95
- 16 Ehling UH, Neuhauser-Klaus A. Induction of specific-locus and dominant lethal mutations in male mice in the low dose range by methyl methanesulfonate (MMS). *Mutat Res* 1990; 230(1): 61-70
- 17 Ehling UH, Neuhauser-Klaus A. Induction of specific-locus and dominant lethal mutations in male mice by 1-methyl-1-nitrosourea (MNU). *Mutat Res* 1991; 250(1-2): 447-456
- 18 Favor J, Sund M, Neuhauser-Klaus A, Ehling UH. A dose-response analysis of ethylnitrosourea-induced recessive specific-locus mutations in treated spermatogonia of the mouse. *Mutat Res* 1990; 231(1): 47-54
- 19 Favor J, Neuhauser-Klaus A, Ehling UH. The frequency of dominant cataract and recessive specific-locus mutations and mutation mosaics in F1 mice derived from post-spermatogonial treatment with ethylnitrosourea. *Mutat Res* 1990; 229(2): 105-114
- 20 Generoso WM, Cain KT, Krishna M, Huff SW. Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(1): 435-437
- 21 Katoh M, Iwahara S. Relationship between chromosome aberrations at the first cleavage metaphases and postimplantation loss in dominant lethal mutations induced by isopropyl methanesulfonate. *Jpn J Genet* 1983; 58: 345-351
- 22 Tinwell H, Liegibel U, Krebs O, Schmezer P, Favor J, Ashby J. Comparison of lacI and lacZ transgenic mouse mutation assays: an EU-sponsored interlaboratory study. *Mutat Res* 1995; 335(2): 185-190
- 23 Beranek DT, Weis CC, Swenson DH. A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis* 1980; 1(7): 595-606
-

- 24 van Zeeland AA. Molecular dosimetry of alkylating agents: quantitative comparison of genetic effects on  
the basis of DNA adduct formation. *Mutagenesis* 1988; 3(3): 179-191
- 25 Ashby J, Gorelick NJ, Shelby MD. Mutation assays in male germ cells from transgenic mice: overview of  
study and conclusions. *Mutation Research* 1997; 388 (2-3): 111-22
- 26 Katoh M, Inomata T, Horiya N, Suzuki F, Shida T, Ishioka K et al. Studies on mutations in male germ cells  
of transgenic mice following exposure to isopropyl methanesulfonate, ethylnitrosourea or X-ray. *Mutat Res*  
1994; 341(1): 17-28
- 27 Shelby MD, Tindall KR. Mammalian germ cell mutagenicity of ENU, IPMS and MMS, chemicals selected  
for a transgenic mouse collaborative study. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 99-109
- 28 Gezondheidsraad. Onderzoek gezondheidsrisico's stoffen: een gerichtere benadering. Den Haag:  
Gezondheidsraad; 2001: Publicatie nr 2001/24.
- 29 Heddle JA, Martus HJ, Douglas GR. Treatment and sampling protocols for transgenic mutation assays.  
*Environmental and Molecular Mutagenesis* 2003; 41: 1-6
- 30 Heddle JA, Dean S, Nohmi T, Boerrigter M, Casciano D, Douglas GR et al. In vivo transgenic mutation  
assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 35: 253-59
- 31 OECD. Draft guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test  
methods for hazard assessment. Parijs: Organisation for Economic Co-operation and Development,  
Environment Directorate; 2003: OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and  
Assessment No. 34.
- 32 Brooks TM, Szegedi M, Rosher P, Dean SW. The detection of gene mutation in transgenic mice (Muta  
Mouse) following a single oral dose of 2-acetylaminofluorene. *Mutagenesis* 1995; 10(2): 149-150
- 33 Gunz D, Shephard SE, Lutz WK. Can nongenotoxic carcinogens be detected with the lacI transgenic mouse  
mutation assay? *Environ Mol Mutagen* 1993; 21(3): 209-211
- 34 Shephard SE, Sengstag C, Lutz WK, Schlatter C. Mutations in liver DNA of lacI transgenic mice (Big Blue)  
following subchronic exposure to 2-acetylaminofluorene. *Mutat Res* 1993; 302(2): 91-96
- 35 Tinwell H, Lefevre PA, Ashby J. Relative activities of methyl methanesulphonate (MMS) as a genotoxin,  
clastogen and gene mutagen to the liver and bone marrow of MutaMouse mice. *Environ Mol Mutagen* 1998;  
32(2): 163-172
- 36 Health Council of the Netherlands. Acrylamide; Evaluation of the carcinogenicity and genotoxicity. The  
Hague: Health Council of the Netherlands; 2002: publication no 2002/02OSH.
- 37 Hoorn AJ, Custer LL, Myhr BC, Brusick D, Gossen J, Vijg J. Detection of chemical mutagens using Muta  
Mouse: a transgenic mouse model. *Mutagenesis* 1993; 8(1): 7-10
- 38 Krebs O, Favor J. Somatic and germ cell mutagenesis in lambda lacZ transgenic mice treated with  
acrylamide or ethylnitrosourea. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 239-248
- 39 Myhr BC. Validation studies with Muta Mouse: a transgenic mouse model for detecting mutations in vivo.  
*Environ Mol Mutagen* 1991; 18(4): 308-315
- 40 Monroe TJ, Mitchell MA. In vivo mutagenesis induced by CC-1065 and adozelesin DNA alkylation in a  
transgenic mouse model. *Cancer Res* 1993; 53(23): 5690-5696
-

- 41 Dutch Expert Committee on Occupational Standards. Scientific documentation on the Dutch list of  
occupational carcinogens I. Den Haag: SDU; 1995: report nr RA 1/95.
- 42 Autrup H, Jorgensen EC, Jensen O. Aflatoxin B1 induced lacI mutation in liver and kidney of transgenic  
mice C57BL/6N: effect of phorone. *Mutagenesis* 1996; 11(1): 69-73
- 43 Davies R, Oreffo VI, Martin EA, Festing MF, White IN, Smith LL et al. Tamoxifen causes gene mutations  
in the livers of lambda/lacI transgenic rats. *Cancer Res* 1997; 57(7): 1288-1293
- 44 Davies R, Gant TW, Smith LL, Styles JA. Tamoxifen induces G:C-->T:A mutations in the cII gene in the  
liver of lambda/lacI transgenic rats but not at 5'-CpG-3' dinucleotide sequences as found in the lacI  
transgene. *Carcinogenesis* 1999; 20(7): 1351-1356
- 45 Dyaico MJ, Stuart GR, Tobal GM, de Boer JG, Glickman BW, Provost GS. Species-specific differences in  
hepatic mutant frequency and mutational spectrum among lambda/lacI transgenic rats and mice following  
exposure to aflatoxin B1. *Carcinogenesis* 1996; 17(11): 2347-2356
- 46 Ohsawa K, Hirano N, Sugiura M, Nakagawa S, Kimura M. Genotoxicity of o-aminoazotoluene (AAT)  
determined by the Ames test, the in vitro chromosomal aberration test, and the transgenic mouse gene  
mutation assay. *Mutat Res* 2000; 471(1-2): 113-126
- 47 Fletcher K, Tinwell H, Ashby J. Mutagenicity of the human bladder carcinogen 4-aminobiphenyl to the  
bladder of MutaMouse transgenic mice. *Mutat Res* 1998; 400(1-2): 245-250
- 48 Turner SD, Tinwell H, Piegorsch W, Schmezer P, Ashby J. The male rat carcinogens limonene and sodium  
saccharin are not mutagenic to male Big Blue rats. *Mutagenesis* 2001; 16(4): 329-332
- 49 Ochiai M, Ishida K, Ushijima T, Suzuki T, Sofuni T, Sugimura T et al. DNA adduct level induced by 2-  
amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline in Big Blue mice does not correlate with mutagenicity.  
*Mutagenesis* 1998; 13(4): 381-384
- 50 Suzuki T, Hayashi M, Ochiai M, Wakabayashi K, Ushijima T, Sugimura T et al. Organ variation in the  
mutagenicity of MeIQ in Big Blue lacI transgenic mice. *Mutat Res* 1996; 369(1-2): 45-49
- 51 Davis CD, Dacquel EJ, Schut HA, Thorgeirsson SS, Snyderwine EG. In vivo mutagenicity and DNA adduct  
levels of heterocyclic amines in Muta mice and c-myc/lacZ double transgenic mice. *Mutat Res* 1996;  
356(2): 287-296
- 52 Itoh T, Suzuki T, Nishikawa A, Furukawa F, Takahashi M, Xue W et al. In vivo genotoxicity of 2-amino-  
3,8-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoxaline in lacI transgenic (Big Blue) mice. *Mutat Res* 2000; 468(1): 19-25
- 53 Thorgeirsson SS, Ryu DY, Weidner V, Snyderwine EG. Carcinogenicity and mutagenicity of heterocyclic  
amines in transgenic mouse models. *Cancer Lett* 1999; 143(2): 245-247
- 54 Bol SA, Horlbeck J, Markovic J, de Boer JG, Turesky RJ, Constable A. Mutational analysis of the liver,  
colon and kidney of Big Blue rats treated with 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis*  
2000; 21(1): 1-6
- 55 Lynch AM, Gooderham NJ, Boobis AR. Organ distinctive mutagenicity in MutaMouse after short-term  
exposure to PhIP. *Mutagenesis* 1996; 11(5): 505-509
- 56 Okonogi H, Stuart GR, Okochi E, Ushijima T, Sugimura T, Glickman BW et al. Effects of gender and  
species on spectra of mutation induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the lacI  
transgene. *Mutat Res* 1997; 395(2-3): 93-99
-



- 57 Stuart GR, Holcroft J, de Boer JG, Glickman BW. Prostate mutations in rats induced by the suspected human carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res* 2000; 60(2): 266-268
- 58 Stuart GR, de Boer JG, Haesevoets R, Holcroft J, Kangas J, Sojonky K et al. Mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) in cecum and proximal and distal colon of lacI transgenic rats. *Mutagenesis* 2001; 16(5): 431-437
- 59 Yang H, Stuart GR, Glickman BW, de Boer JG. Modulation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mutation in the cecum and colon of big blue rats by conjugated linoleic acid and 1,2-dithiole-3-thione. *Nutr Cancer* 2001; 39(2): 259-266
- 60 Yang H, Holcroft J, Glickman BW, de Boer JG. Conjugated linoleic acid inhibits mutagenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the prostate of Big Blue rats. *Mutagenesis* 2003; 18(2): 195-200
- 61 Zhang S, Lloyd R, Bowden G, Glickman BW, de Boer JG. Msh2 DNA mismatch repair gene deficiency and the food-borne mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) synergistically affect mutagenesis in mouse colon. *Oncogene* 2001; 20(42): 6066-6072
- 62 Gezondheidsraad: Commissie Risico-evaluatie van stoffen. Arseen. Toetsing van een basisdocument. Den Haag: Gezondheidsraad; 1993: publicatie nr 1993/02.
- 63 Noda Y, Suzuki T, Kohara A, Hasegawa A, Yotsuyanagi T, Hayashi M et al. In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in MutaMouse. *Mutat Res* 2002; 513(1-2): 205-212
- 64 Gezondheidsraad, Commissie Beoordeling carcinogeniteit van stoffen. Benzeen. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1997: publicatie no 1997/29.
- 65 Provost GS, Mirsalis JC, Rogers BJ, Short JM. Mutagenic response to benzene and tris(2,3-dibromopropyl)-phosphate in the lambda lacI transgenic mouse mutation assay: a standardized approach to in vivo mutation analysis. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 342-347
- 66 Gezondheidsraad. Polycyclische aromatische koolwaterstoffen; toetsing van een basisdocument. Den Haag: Gezondheidsraad; 1990: publicatie nr 1990/23.
- 67 Dean SW, Coates A, Brooks TM, Burlinson B. Benzo[a]pyrene site of contact mutagenicity in skin of Muta Mouse. *Mutagenesis* 1998; 13(5): 515-518
- 68 Hakura A, Tsutsui Y, Sonoda J, Kai J, Imade T, Shimada M et al. Comparison between in vivo mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo[a]pyrene in the lacZ transgenic mouse (Muta Mouse). *Mutat Res* 1998; 398(1-2): 123-130
- 69 Kohler SW, Provost GS, Fieck A, Kretz PL, Bullock WO, Sorge JA et al. Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the lacI gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(18): 7958-7962
- 70 Kohler SW, Provost GS, Fieck A, Kretz PL, Bullock WO, Putman DL et al. Analysis of spontaneous and induced mutations in transgenic mice using a lambda ZAP/lacI shuttle vector. *Environ Mol Mutagen* 1991; 18(4): 316-321
- 71 Loli P, Topinka J, Georgiadis P, Dusinska M, Hurbankova M, Kovacikova Z et al. Benzo[a]pyrene-enhanced mutagenesis by asbestos in the lung of lambda-lacI transgenic rats. *Mutat Res* 2004; 553(1-2): 79-90
-

- 72 Skopek TR, Kort KL, Marino DR, Mittal LV, Umbenhauer DR, Laws GM et al. Mutagenic response of the endogenous hprt gene and lacI transgene in benzo[a]pyrene-treated Big Blue B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 376-384
- 73 Recio L, Osterman-Golkar S, Csanady GA, Turner MJ, Myhr B, Moss O et al. Determination of mutagenicity in tissues of transgenic mice following exposure to 1,3-butadiene and N-ethyl-N-nitrosourea. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 117(1): 58-64
- 74 Recio L, Bond JA, Pluta LJ, Sisk SC. Use of transgenic mice for assessing the mutagenicity of 1,3-butadiene in vivo. *IARC Sci Publ* 1993;(127): 235-243
- 75 Recio L, Meyer KG, Pluta LJ, Moss OR, Saranko CJ. Assessment of 1,3-butadiene mutagenicity in the bone marrow of B6C3F1 lacI transgenic mice (Big Blue): a review of mutational spectrum and lacI mutant frequency after a 5-day 625 ppm 1,3-butadiene exposure. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 424-429
- 76 Sisk SC, Pluta LJ, Bond JA, Recio L. Molecular analysis of lacI mutants from bone marrow of B6C3F1 transgenic mice following inhalation exposure to 1,3-butadiene. *Carcinogenesis* 1994; 15(3): 471-477
- 77 Staedtler F, Crespo-Perez J, Sagelsdorff P, Steiner S, Suter W. 4-chloro-o-phenylenediamine induces a dose-related increase in G:C > T:A transversions and one major DNA adduct in the liver of Big Blue mice after 26 weeks in feed treatment. *Mutat Res* 1999; 430(1): 121-130
- 78 Suter W, Ahiabor R, Blanco B, Locher F, Mantovani F, Robinson M et al. Evaluation of the in vivo genotoxic potential of three carcinogenic aromatic amines using the Big Blue transgenic mouse mutation assay. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 354-362
- 79 Suter W, Staedtler F, Poetter-Locher F, Swingler T, Wilson L. 4-Chloro-o-phenylenediamine: a 26-week oral (in feed) mutagenicity study in Big Blue mice. *Mutat Res* 1998; 414(1-3): 149-156
- 80 Gezondheidsraad. Chroom; Toetsing van een basisdocument. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1991: publicatie nr 1991/03.
- 81 Itoh S, Shimada H. Clastogenicity and mutagenicity of hexavalent chromium in lacZ transgenic mice. *Toxicol Lett* 1997; 91(3): 229-233
- 82 Itoh S, Shimada H. Bone marrow and liver mutagenesis in lacZ transgenic mice treated with hexavalent chromium. *Mutat Res* 1998; 412(1): 63-67
- 83 Cheng L, Sonntag DM, de Boer J, Dixon K. Chromium(VI)-induced mutagenesis in the lungs of big blue transgenic mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19(3): 239-249
- 84 Dutch Expert Committee on Occupational Standards. Scientific documentation on the Dutch list of occupational carcinogens II. Den Haag: Sdu; 1995: report nr RA 2/95.
- 85 Louro H, Silva MJ, Boavida MG. Mutagenic activity of cisplatin in the lacZ plasmid-based transgenic mouse model. *Environ Mol Mutagen* 2002; 40(4): 283-291
- 86 Gorelick NJ, Andrews JL, deBoer JG, Young R, Gibson DP, Walker VE. Tissue-specific mutant frequencies and mutational spectra in cyclophosphamide-treated lacI transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(2-3): 154-166
- 87 Hoyes KP, Wadeson PJ, Sharma HL, Hendry JH, Morris ID. Mutation studies in lacI transgenic mice after exposure to radiation or cyclophosphamide. *Mutagenesis* 1998; 13(6): 607-612
-

- 88 Walker VE, Andrews JL, Upton PB, Skopek TR, deBoer JG, Walker DM et al. Detection of cyclophosphamide-induced mutations at the Hprt but not the lacI locus in splenic lymphocytes of exposed mice. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(2-3): 167-181
- 89 Krebs O, Schafer B, Wolff T, Oesterle D, Deml E, Sund M et al. The DNA damaging drug cyproterone acetate causes gene mutations and induces glutathione-S-transferase P in the liver of female Big Blue transgenic F344 rats. *Carcinogenesis* 1998; 19(2): 241-245
- 90 Cunningham ML, Hayward JJ, Shane BS, Tindall KR. Distinction of mutagenic carcinogens from a mutagenic noncarcinogen in the big blue transgenic mouse. *Environ Health Perspect* 1996; 104 Suppl 3: 683-686
- 91 Hayward JJ, Shane BS, Tindall KR, Cunningham ML. Differential in vivo mutagenicity of the carcinogen/non-carcinogen pair 2,4- and 2,6-diaminotoluene. *Carcinogenesis* 1995; 16(10): 2429-2433
- 92 Mientjes EJ, Luiten-Schuite A, van der WE, Borsboom Y, Bergmans A, Berends F et al. DNA adducts, mutant frequencies, and mutation spectra in various organs of lambda lacZ mice exposed to ethylating agents. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31(1): 18-31
- 93 Okada N, Honda A, Kawabata M, Yajima N. Sodium phenobarbital-enhanced mutation frequency in the liver DNA of lacZ transgenic mice treated with diethylnitrosamine. *Mutagenesis* 1997; 12(3): 179-184
- 94 Suzuki T, Hayashi M, Sofuni T. Initial experiences and future directions for transgenic mouse mutation assays. *Mutat Res* 1994; 307(2): 489-494
- 95 Suzuki T, Itoh T, Hayashi M, Nishikawa Y, Ikezaki S, Furukawa F et al. Organ variation in the mutagenicity of dimethylnitrosamine in Big Blue mice. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 348-353
- 96 Health Council of the Netherlands: Dutch Expert Committee on Occupational Standards (DECOS). N-Nitrosodimethylamine. The Hague: Health Council of the Netherlands; 1999: publication no. 1999/12OSH.
- 97 Ashby J, Short JM, Jones NJ, Lefevre PA, Provost GS, Rogers BJ et al. Mutagenicity of o-anisidine to the bladder of lacI- transgenic B6C3F1 mice: absence of 14C or 32P bladder DNA adduction. *Carcinogenesis* 1994; 15(10): 2291-2296
- 98 Mirsalis JC, Hamer JD, O'Loughlin KG, Winegar RA, Short JM. Effects of nongenotoxic carcinogens on hepatic mutations in lacI transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 1993; 21(suppl 22): 48
- 99 Mirsalis JC, Provost GS, Matthews CD, Hamner RT, Schindler JE, O'Loughlin KG et al. Induction of hepatic mutations in lacI transgenic mice. *Mutagenesis* 1993; 8(3): 265-271
- 100 Schmezer P, Eckert C, Liegibel UM, Klein RG, Bartsch H. Use of Transgenic Mutational Test Systems in Risk Assessment of Carcinogens. *Arch Toxicol* 1998; 20: 321-30
- 101 Tinwell H, Lefevre PA, Ashby J. Response of the Muta mouse lacZ/galE- transgenic mutation assay to DMN: comparisons with the corresponding Big Blue (lacI) responses. *Mutat Res* 1994; 307(1): 169-173
- 102 Tinwell H, Lefevre PA, Ashby J. Mutation studies with dimethyl nitrosamine in young and old lac I transgenic mice. *Mutat Res* 1994; 307(2): 501-508
- 103 Shane BS, deBoer JG, Glickman BW, Cunningham ML. Oxazepam is mutagenic in vivo in Big Blue transgenic mice. *Carcinogenesis* 1999; 20(7): 1315-1321
-

- 104 Shephard SE, Lutz WK, Schlatter C. The lacI transgenic mouse mutagenicity assay: quantitative evaluation in comparison to tests for carcinogenicity and cytogenetic damage in vivo. *Mutat Res* 1994; 306(2): 119-128
- 105 Shephard SE, Gunz D, Schlatter C. Genotoxicity of agaritine in the lacI transgenic mouse mutation assay: evaluation of the health risk of mushroom consumption. *Food Chem Toxicol* 1995; 33(4): 257-264
- 106 Suzuki T, Miyata Y, Saeki K, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T. In vivo mutagenesis by the hepatocarcinogen quinoline in the lacZ transgenic mouse: evidence for its in vivo genotoxicity. *Mutat Res* 1998; 412(2): 161-166
- 107 Lefevre PA, Tinwell H, Ashby J. Mutagenicity of the potent rat hepatocarcinogen 6BT to the liver of transgenic (lacI) rats: consideration of a reduced mutation assay protocol. *Mutagenesis* 1997; 12(1): 45-47
- 108 Ashby J, Brusick D, Myhr BC, Jones NJ, Parry JM, Nesnow S et al. Correlation of carcinogenic potency with mouse-skin 32P-postlabeling and Muta<sup>R</sup>Mouse lac Z<sup>-</sup> mutation data for DMBA and its K-region sulphur isostere: comparison with activities observed in standard genotoxicity assays. *Mutat Res* 1993; 292(1): 25-40
- 109 Brooks TM, Dean SW. Detection of gene mutation in skin, stomach and liver of MutaMouse following oral or topical treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or 1-chloromethylpyrene: some preliminary observations. *Mutagenesis* 1996; 11(5): 529-532
- 110 Hachiya N, Yajima N, Hatakeyama S, Yuno K, Okada N, Umeda Y et al. Induction of lacZ mutation by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in various tissues of transgenic mice. *Mutat Res* 1999; 444(2): 283-295
- 111 Gorelick NJ, Andrews JL, Gu M, Glickman BW. Mutational spectra in the lacI gene in skin from 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-treated and untreated transgenic mice. *Mol Carcinog* 1995; 14(1): 53-62
- 112 Tombolan F, Renault D, Brault D, Guffroy M, Perin-Roussel O, Perin F et al. Kinetics of induction of DNA adducts, cell proliferation and gene mutations in the liver of MutaMice treated with 5,9-dimethyldibenzo[c,g]carbazole. *Carcinogenesis* 1999; 20(1): 125-132
- 113 Tombolan F, Renault D, Brault D, Guffroy M, Perin F, Thybaud V. Effect of mitogenic or regenerative cell proliferation on lacZ mutant frequency in the liver of Muta<sup>TM</sup>Mice treated with 5, 9-dimethyldibenzo[c,g]carbazole. *Carcinogenesis* 1999; 20(7): 1357-1362
- 114 Gezondheidsraad. Ethyleenoxide en styreen; toetsing van criteriadocumenten. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1986: publicatie nr 1986/17.
- 115 Sisk SC. Determination of circulating micronuclei and mutant frequency in lung, spleen, and germ cells of male B6C3F1 LacI transgenic mice after inhalation exposure to ethylene oxide (EtO). *Environ Mol Mutagen* 1994; 23(suppl 23): 62
- 116 Sisk SC, Pluta LJ, Meyer KG, Wong BC, Recio L. Assessment of the in vivo mutagenicity of ethylene oxide in the tissues of B6C3F1 lacI transgenic mice following inhalation exposure. *Mutat Res* 1997; 391(3): 153-164
- 117 van Delft JH, Bergmans A, Baan RA. Germ-cell mutagenesis in lambda lacZ transgenic mice treated with ethylating and methylating agents: comparison with specific-locus test. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 165-173
-

- 118 van Delft JH, Bergmans A, van Dam FJ, Tates AD, Howard L, Winton DJ et al. Gene-mutation assays in lambda lacZ transgenic mice: comparison of lacZ with endogenous genes in splenocytes and small intestinal epithelium. *Mutat Res* 1998; 415(1-2): 85-96
- 119 Suzuki T, Hayashi M, Wang X, Yamamoto K, Ono T, Myhr BC et al. A comparison of the genotoxicity of ethylnitrosourea and ethyl methanesulfonate in lacZ transgenic mice (Muta Mouse). *Mutat Res* 1997; 395(1): 75-82
- 120 The Collaborative Study Group of the Transgenic Mouse Mutation Assay MMSGotEMSoJ. Organ variation in the mutagenicity of ethylnitrosourea in MutaMouse: result of the Collaborative Study on the Transgenic Mutation Assay by JEMS/MMS. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 363-375
- 121 Brooks TM, Dean SW. The detection of gene mutation in the tubular sperm of Muta Mice following a single intraperitoneal treatment with methyl methanesulphonate or ethylnitrosourea. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 219-222
- 122 Cosentino L, Heddle JA. A test for neutrality of mutations of the lacZ transgene. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 313-316
- 123 Cruz-Munoz W, Kalair W, Cosentino L, Heddle JA. ENU induces mutations in the heart of lacZ transgenic mice. *Mutat Res* 2000; 469(1): 23-34
- 124 da Costa GG, Manjanatha MG, Marques MM, Beland FA. Induction of lacI mutations in Big Blue rats treated with tamoxifen and alpha-hydroxytamoxifen. *Cancer Lett* 2002; 176(1): 37-45
- 125 van Delft JH, Baan RA. Germ cell mutagenesis in lambda lacZ transgenic mice treated with ethylnitrosourea; comparison with specific-locus test. *Mutagenesis* 1995; 10(3): 209-214
- 126 Dolle ME, Martus HJ, Gossen JA, Boerrigter ME, Vijg J. Evaluation of a plasmid-based transgenic mouse model for detecting in vivo mutations. *Mutagenesis* 1996; 11(1): 111-118
- 127 Douglas GR, Jiao J, Gingerich JD, Gossen JA, Soper LM. Temporal and molecular characteristics of mutations induced by ethylnitrosourea in germ cells isolated from seminiferous tubules and in spermatozoa of lacZ transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(16): 7485-7489
- 128 Douglas GR, Jiao J, Gingerich JD, Soper LM, Gossen JA. Temporal and molecular characteristics of lacZ mutations in somatic tissues of transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28(4): 317-324
- 129 Douglas GR, Gingerich JD, Soper LM, Jiao J. Toward an understanding of the use of transgenic mice for the detection of gene mutations in germ cells. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 197-212
- 130 Gorelick NJ, Andrews JL, Gibson DP, Carr GJ, Aardema MJ. Evaluation of lacI mutation in germ cells and micronuclei in peripheral blood after treatment of male lacI transgenic mice with ethylnitrosourea, isopropylmethane sulfonate or methylmethane sulfonate. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 187-195
- 131 Itoh S, Miura M, Shimada H. Lack of mutagenicity of levofloxacin in lacZ transgenic mice. *Mutagenesis* 1998; 13(1): 51-55
- 132 Liegibel UM, Schmezer P. Detection of the two germ cell mutagens ENU and iPMS using the LacZ/ transgenic mouse mutation assay. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 213-218
- 133 Morrison V, Tinwell H, Ashby J. Consideration of the liver of embryonic lacZ transgenic mice as an analogue of the mouse coat colour spot test: preliminary data and technical problems. *Mutat Res* 1995; 329(2): 107-112
-

- 134 Provost GS, Short JM. Characterization of mutations induced by ethylnitrosourea in seminiferous tubule germ cells of transgenic B6C3F1 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(14): 6564-6568
- 135 Provost GS, Rogers BJ, Dyaico MJ, Carr G. Evaluation of the transgenic Lambda/LacI mouse model as a short-term predictor of heritable risk. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 129-136
- 136 Skopek TR, Kort KL, Marino DR. Relative sensitivity of the endogenous hprt gene and lacI transgene in ENU-treated Big Blue B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen* 1995; 26(1): 9-15
- 137 Suzuki T, Itoh S, Takemoto N, Yajima N, Miura M, Hayashi M et al. Ethyl nitrosourea and methyl methanesulfonate mutagenicity in sperm and testicular germ cells of lacZ transgenic mice (Muta Mouse). *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 155-163
- 138 Tinwell H, Lefevre P, Williams CV, Ashby J. The activity of ENU, iPMS and MMS in male mouse germ cells using the Muta Mouse positive selection transgenic mutation assay. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 179-185
- 139 Walker VE, Gorelick NJ, Andrews JL, Craft TR, deBoer JG, Glickman BW et al. Frequency and spectrum of ethylnitrosourea-induced mutation at the hprt and lacI loci in splenic lymphocytes of exposed lacI transgenic mice. *Cancer Res* 1996; 56(20): 4654-4661
- 140 Winegar RA, Carr G, Mirsalis JC. Analysis of the mutagenic potential of ENU and MMS in germ cells of male C57BL/6 lacI transgenic mice. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 175-178
- 141 Douglas GR, Gingerich JD, Soper LM. Evidence for in vivo non-mutagenicity of the carcinogen hydrazine sulfate in target tissues of lacZ transgenic mice. *Carcinogenesis* 1995; 16(4): 801-804
- 142 Chen T, Mittelstaedt RA, Aidoo A, Hamilton LP, Beland FA, Casciano DA et al. Comparison of hprt and lacI mutant frequency with DNA adduct formation in N-hydroxy-2-acetylaminofluorene-treated Big Blue rats. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37(3): 195-202
- 143 Frijhoff AF, Krul CA, de Vries A, Kelders MC, Weeda G, van Steeg H et al. Influence of nucleotide excision repair on N-hydroxy-2-acetylaminofluorene-induced mutagenesis studied in lambda lacZ-transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31(1): 41-47
- 144 Pletsas V, Steenwinkel MJ, van Delft JH, Baan RA, Kyrtopoulos SA. Methyl bromide causes DNA methylation in rats and mice but fails to induce somatic mutations in lambda lacZ transgenic mice. *Cancer Lett* 1999; 135(1): 21-27
- 145 Rihn BH, Bottin MC, Coulais C, Rouget R, Monhoven N, Baranowski W et al. Genotoxicity of 3-methylcholanthrene in liver of transgenic big Blue mice. *Environ Mol Mutagen* 2000; 36(4): 266-273
- 146 Itoh S, Miura M, Shimada H. Germ cell mutagenesis in lacZ transgenic mice treated with methyl methanesulfonate. *Mutat Res* 1997; 388(2-3): 223-228
- 147 Brault D, Bouilly C, Renault D, Thybaud V. Tissue-specific induction of mutations by acute oral administration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and beta-propiolactone to the Muta Mouse: preliminary data on stomach, liver and bone marrow. *Mutat Res* 1996; 360(2): 83-87
- 148 Brault D, Renault D, Tombolan F, Thybaud V. Kinetics of induction of DNA damage and lacZ gene mutations in stomach mucosa of mice treated with beta-propiolactone and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, using single-cell gel electrophoresis and MutaMouse models. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(2-3): 182-189
-

- 149 Monroe JJ, Kort KL, Miller JE, Marino DR, Skopek TR. A comparative study of in vivo mutation assays: analysis of hprt, lacI, cII/cI and as mutational targets for N-nitroso-N-methylurea and benzo[a]pyrene in Big Blue mice. *Mutat Res* 1998; 421(1): 121-136
- 150 Provost GS, Kretz PL, Hamner RT, Matthews CD, Rogers BJ, Lundberg KS et al. Transgenic systems for in vivo mutation analysis. *Mutat Res* 1993; 288(1): 133-149
- 151 Quillardet P, Michel V, Arrault X, Hofnung M, Touati E. Mutagenic properties of a nitrofurantoin, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2, 1-b]furan (R7000), in lacI transgenic mice. *Mutat Res* 2000; 470(2): 177-188
- 152 Suzuki T, Hayashi M, Sofuni T, Myhr BC. The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C in vivo using lacZ transgenic mice. *Mutat Res* 1993; 285(2): 219-224
- 153 Guttenplan JB, Kosinska W, von Pressentin MM, Rosa J, El Bayoumy K. Effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate (p-XSC) and vitamin E on 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO)-induced mutagenesis in lacZ mouse upper aerodigestive tissue. *Mutat Res* 2002; 518(1): 85-93
- 154 von Pressentin MM, El Bayoumy K, Guttenplan JB. Mutagenic activity of 4-nitroquinoline-N-oxide in upper aerodigestive tissue in lacZ mice (MutaMouse) and the effects of 1, 4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Mutat Res* 2000; 466(1): 71-78
- 155 Nakajima M, Kikuchi M, Saeki K, Miyata Y, Terada M, Kishida F et al. Mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide in the MutaMouse. *Mutat Res* 1999; 444(2): 321-336
- 156 Jiao J, Douglas GR, Gingerich JD, Soper LM. Analysis of tissue-specific lacZ mutations induced by N-nitrosodibenzylamine in transgenic mice. *Carcinogenesis* 1997; 18(11): 2239-2245
- 157 Itoh S, Miura M, Itoh T, Miyauchi Y, Suga M, Takahashi Y et al. N-Nitrosodi-n-propylamine induces organ specific mutagenesis with specific expression times in lacZ transgenic mice. *Mutat Res* 1999; 444(2): 309-319
- 158 Hara T, Hirano K, Hirano N, Tamura H, Sui H, Shibuya T et al. Mutation induction by N-propyl-N-nitrosourea in eight MutaMouse organs. *Mutat Res* 1999; 444(2): 297-307
- 159 Schmezer P, Eckert C, Liegibel UM. Tissue-specific induction of mutations by streptozotocin in vivo. *Mutat Res* 1994; 307(2): 495-499
- 160 Chen T, Aidoo A, Manjanatha MG, Mittelstaedt RA, Shelton SD, Lyn-Cook LE et al. Comparison of mutant frequencies and types of mutations induced by thiotepa in the endogenous Hprt gene and transgenic lacI gene of Big Blue rats. *Mutat Res* 1998; 403(1-2): 199-214
- 161 de Boer JG, Holcroft J, Cunningham ML, Glickman BW. Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate causes a gradient of mutations in the cortex and outer and inner medullas of the kidney of lacI transgenic rats. *Environ Mol Mutagen* 2000; 36(1): 1-4
- 162 Shane BS, Smith-Dunn DL, deBoer JG, Glickman BW, Cunningham ML. Subchronic administration of phenobarbital alters the mutation spectrum of lacI in the livers of Big Blue transgenic mice. *Mutat Res* 2000; 448(1): 69-80
- 163 Lefevre PA, Tinwell H, Galloway SM, Hill R, Mackay JM, Elcombe CR et al. Evaluation of the genetic toxicity of the peroxisome proliferator and carcinogen methyl clofenapate, including assays using Muta Mouse and Big Blue transgenic mice. *Hum Exp Toxicol* 1994; 13(11): 764-775
-

- 164 DeMarini DM, Shelton ML, Kohan MJ, Hudgens EE, Kleindienst TE, Ball LM et al. Mutagenicity in lung of big Blue((R)) mice and induction of tandem-base substitutions in Salmonella by the air pollutant peroxyacetyl nitrate (PAN): predicted formation of intrastrand cross-links. *Mutat Res* 2000; 457(1-2): 41-55
- 165 Gezondheidsraad. Chloroform en tetrachloormethaan; Toetsing van een criteriadocument. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1987: publicatie nr 1987/15.
- 166 Gezondheidsraad: Commissie Risico-evaluatie van stoffen - dioxinen. Dioxinen. Polygechloreerde dibenzo-*p*-dioxinen, dibenzofuranen en dioxine-achtige polychloorbifenylen. Rijswijk: Gezondheidsraad; 1996: publicatie nr 1996/10.
- 167 Thornton AS, Oda Y, Stuart GR, Glickman BW, de Boer JG. Mutagenicity of TCDD in Big Blue transgenic rats. *Mutat Res* 2001; 478(1-2): 45-50
- 168 Provost GS. Evaluation of mutagenic and non-mutagenic compounds using LacI transgenic rodents. *Environ-Mol-Mutagen* 23 (Suppl 23), 55. 1994.
- 169 Kohara A, Suzuki T, Honma M, Ohwada T, Hayashi M. Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/lacZ transgenic mouse (MutaMouse). *Mutat Res* 2002; 515(1-2): 63-72
- 170 Gezondheidsraad. Asbest; toetsing van een ontwerp-basisdocument. Den Haag: Gezondheidsraad; 1988: publicatie nr 1988/31.
- 171 Rihn B, Coulais C, Kauffer E, Bottin MC, Martin P, Yvon F et al. Inhaled crocidolite mutagenicity in lung DNA. *Environ Health Perspect* 2000; 108(4): 341-346
- 172 Topinka J, Loli P, Georgiadis P, Dusinska M, Hurbankova M, Kovacikova Z et al. Mutagenesis by asbestos in the lung of lambda-lacI transgenic rats. *Mutat Res* 2004; 553(1-2): 67-78
- 173 Unfried K, Schurkes C, Abel J. Distinct spectrum of mutations induced by crocidolite asbestos: clue for 8-hydroxydeoxyguanosine-dependent mutagenesis in vivo. *Cancer Res* 2002; 62(1): 99-104
- 174 Ashby J. Results for the big blue transgenic assay using two genotoxins and a peroxisome proliferator. *Environ Mol Mutagen* 1993; 21(suppl 22): 4
- 175 Leavitt SA, DeAngelo AB, George MH, Ross JA. Assessment of the mutagenicity of dichloroacetic acid in lacI transgenic B6C3F1 mouse liver. *Carcinogenesis* 1997; 18(11): 2101-2106
- 176 Rempelberg CJ, Steenwinkel MJ, van Asten JG, van Delft JH, Baan RA, Verhagen H. Effect of eugenol on the mutagenicity of benzo[a]pyrene and the formation of benzo[a]pyrene-DNA adducts in the lambda-lacZ-transgenic mouse. *Mutat Res* 1996; 369(1-2): 87-96
- 177 Miyata Y, Saeki K, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T, Suzuki T. Antimutagenic structural modification of quinoline assessed by an in vivo mutagenesis assay using lacZ-transgenic mice. *Mutat Res* 1998; 414(1-3): 165-169
- 178 Culp SJ, Beland FA, Heflich RH, Benson RW, Blankenship LR, Webb PJ et al. Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green. *Mutat Res* 2002; 506-507: 55-63
- 179 Arrault X, Michel V, Quillardet P, Hofnung M, Touati E. Comparison of kinetics of induction of DNA adducts and gene mutations by a nitrofurantoin compound, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-b]furan (R7000), in the caecum and small intestine of Big Blue mice. *Mutagenesis* 2002; 17(4): 353-359
-



- 180 Nishikawa A, Furukawa F, Kasahara K, Ikezaki S, Itoh T, Suzuki T et al. Trans-4-hydroxy-2-nonenal, an aldehydic lipid peroxidation product, lacks genotoxicity in lacI transgenic mice. *Cancer Lett* 2000; 148(1): 81-86
- 181 Takahashi S, Ikeda Y, Kimoto N, Okochi E, Cui L, Nagao M et al. Mutation induction by mechanical irritation caused by uracil-induced urolithiasis in Big Blue rats. *Mutat Res* 2000; 447(2): 275-280



- 
- A Request for advice
  - B The Committee
  - C List of concepts
  - D Summary of substances and their test results

---

## Annexes



---

## Request for advice

---

The Minister of Health, Welfare and Sport wrote the following letter to the President of the Health Council on 3 April 2002 (reference: GZB/C&O/2268208):

At the behest of the Ministry of Social Affairs and Employment and the Ministry of Health, Welfare and Sport, TNO and RIVM prepared a report entitled 'Mutagenicity of chemicals in genetically modified animals'. The report examines new assay models for investigating the mutagenic characteristics of substances.

Mutagenicity testing is a vitally important aspect of the authorisation of new substances and of the assessment of existing substances with a priority status. Mutagenicity plays a key part in the assessment of substances, especially in connection with possible carcinogenicity and the potential to cause genetic defects. If the substance is classified as a proven mutagen and/or carcinogen, its use by consumers is prohibited.

As yet, there are no well validated in vivo gene mutation assays that could be used to adequately determine a substance's mutagenicity. The report gives a list of promising in vivo gene mutation assays, performed using 'transgenic' mice.

I would be grateful if you would advise me whether (and if so which) new in vivo gene mutation assays could be used for the routine assessment of substances and what the possible drawbacks might be.

Yours sincerely,

The Minister of Health, Welfare and Sport,

(signed) E Borst-Eilers

---



---

## Committee

---

The Committee that prepared the above advisory report consisted of:

- Dr GMH Swaen, *chairman until 1 September 2004*  
epidemiologist; University Medical Centre, Maastricht (until 1 September 2004),  
Dow Benelux BV, Terneuzen (from 1 September 2004)
  - Dr PJ Boogaard  
toxicologist; Shell International BV, The Hague
  - HC Dreef - van der Meulen  
toxicological pathologist; NV Organon, Oss
  - Prof. VJ Feron (until 19 February 2004)  
Emeritus Professor of Biological Toxicology; Zeist
  - Prof. H van Loveren (from 14 November 2003)  
Professor of Immunotoxicology, University of Maastricht; also National Institute of  
Public Health and the Environment, Bilthoven
  - Prof. GR Mohn (until 1 January 2004)  
Professor of Cellular Mutation Genetics, Leiden University Medical Center
  - Prof. GJ Mulder  
Professor of Toxicology, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Leiden
  - Dr MJM Nivard  
molecular biologist and genetic toxicologist, Leiden University Medical Center
  - Dr PC Noordam, *consultant* (until 19 February 2004)  
Ministry of Social Affairs and Employment, The Hague
-

- Dr H te Riele  
molecular biologist; The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam
- Dr H Roelfzema, *consultant*  
Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague
- Prof. W Slob  
Professor of Quantitative Risk Assessment, University of Utrecht; also National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Prof. ALM Verbeek  
Professor of Clinical Epidemiology, Radboud University Nijmegen
- Prof. AA van Zeeland (from 1 February 2004, *chairman from 1 September 2004*)  
Professor of Molecular Radiation Dosimetry and Radiation Mutagenesis, Leiden University Medical Center
- Prof. EJJ van Zoelen  
Professor of Cell Biology, Radboud University Nijmegen
- Dr JA van Zorge, *consultant*  
Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment, The Hague
- Dr PW van Vliet, *secretary*  
Health Council, The Hague

The following experts contributed to this advisory report:

- Dr J van Benthem  
genetic toxicologist; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Dr GR Douglas  
genetic toxicologist; Health Canada, Ottawa, Canada
- Dr CAM Krul  
genetic toxicologist; TNO Nutrition and Food Research, Zeist
- Prof. IB Lambert  
Professor of Biology and Biochemistry, Carleton University, Ottawa, Canada
- Dr MD Shelby  
genetic toxicologist; National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, USA
- Dr V Thybaud  
genetic toxicologist; Aventis Pharma, Vitry-sur-Seine, France



---

## List of concepts

---

carcinogenic	cancer inducing
DNA	genetic material
endogenous	present in the natural situation
gene	carrier of a genetic characteristic
genetically modified animals	animals, each of whose body cells contain DNA which has been changed in the same way
gene mutation	changes within a gene, such as base-pair substitutions (the replacement of DNA base pairs by other base pairs) and minor deletions (the loss of sections of DNA)
genotoxicity	the ability to induce potentially harmful changes to an organism's DNA
sensitivity	the chance of a genotoxic substance yielding a positive score
mutagenicity	ability to cause mutations
mutation	permanent, transmissible change in the amount or structure of genetic material within cells or organisms
mutation frequency	the number of mutations per copy of the reporter gene
negative predictive value	the chance that a negative score means that the substance is not genotoxic
positive predictive value	the chance that a substance which yields a positive score is indeed genotoxic
reporter gene	gene that is investigated for the presence of gene mutations
specificity	the chance of a non-genotoxic substance yielding a negative score
transgenic	introduced by means of genetic modification

---



**D**

## Summary of substances and their test results

substance	carcinogenicity <sup>a</sup>	genotoxicity <sup>b</sup>			BB <sup>c</sup>	MM	organs/ tissues <sup>d</sup>	references BB/MM
		in vitro	in vivo	total				
<b>genotoxic</b>								
2-acetylaminofluorene	+	+	+	+	e	+	liver 1.6	32
						+	liver 5	33
					+(m)		liver 3	34
						+	liver 3	35
acrylamide	+ (2A)	+	+	+ <sup>36</sup>		+	bone marrow 6	37
						-	liver 2	38
						+	bone marrow 3	39
adozelesin		+	+	+	+(m)		liver 3	40
aflatoxin	+ (1)	+	+	+ <sup>41</sup>	-(m)		liver 4, kidney 3	42
					+(r)		liver 3	43, 44
					-(m)		liver 1.3	45
					+(r)		liver 20	45
<i>o</i> -aminoazotoluene	+ (2B)	+	+	+		+	liver 3, colon 6, bone marrow 1, lung 1.2, kidney 3, bladder 2, testis 3	46

4-aminobiphenyl	+(1)	+	+	+		+	bladder 14, liver 5, bone marrow 2	47
					+(r)		liver 3, kidney 7, bladder 4	48
2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoline (MeIQ)	+(2B)	+	+	+	+(m)		colon 38, bone marrow 6, liver 5, forestomach 3	49,50
2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline (MeIQx)	+(2B)	+	+	+		+	liver 4	51
					+(m)		liver 9, colon 4	52
						+	liver 55	53
2-amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoline (IQ)	+(2A)	+	+	+	+(r)		liver 4, colon 3, kidney 2	54
						+	liver 4	51
2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine (PhIP)	+(2B)	+	+	+		+	large intestine 6, small intestine 4, liver 1.6, kidney 1	55
					+(r)		colon 25	56
					+(r)		prostate 20	57
					+(r)		caecum 7, colon 21	58
					+(r)		colon 16	59
					+(r)		prostate 5	60
					+(m)		colon 3	61
2-amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ]indole (AαC)	+(2B)	+	+	+		+	liver 3	51
arsenic trioxide	+(1)	+	+	+ <sup>62</sup>		-	lung 1.0, kidney 1.0, bone marrow ?, bladder ?	63
benzene	+(1)	+	+	+ <sup>64</sup>	+(m)		bone marrow 1.5, spleen 1.5, lung 1.3	65
benzo[ <i>a</i> ]pyrene	+(2A)	+	+	+ <sup>66</sup>		+	skin 11, liver 0.9, lung 1.1	67
						+	colon 37, ileum 24, forestomach 15, bone marrow 18, spleen 25, stomach 9, liver 5, lung 4, kidney 4, heart 2, brain 1.5	68
					+(m)		spleen 13	69,70
					+(r)		lung 2	71
					+(m)		splenic T-cells 9	72

1,3-butadiene	+ (2A)	+	+	+		+	lung 2, bone marrow 0.7, liver 1.3	73,74
					+ (m)		bone marrow 4	74
					+ (m)		bone marrow 6	75
					+ (m)		bone marrow 4	76
CC-1065		+	+	+	+ (m)		liver 3	40
chlorambucil	+ (1)	+	+	+		+	bone marrow 3, liver 10, testis 22	37
						+	bone marrow 2	39
4-chloro- <i>o</i> -phenylenediamine	+ (2B)	+	+	+ <sup>41</sup>	+ (m)		liver 8	77-79
chromium(VI) compounds	+ (1)	+	+	+ <sup>80</sup>		+	bone marrow 1, liver 2	81
						+	bone marrow 2, liver 2	82
					+ (m)		lung 5, kidney 4, liver 4	83
cisplatin	+ (2A)	+	+	+ <sup>84</sup>		+	liver 2	85
cyclophosphamide	+ (1)	+	+	+ <sup>41</sup>	+ (m)		lung 3, bladder 3, kidney 1.4, bone marrow 1.5	86
						+	bone marrow 6	37
					+ (m)		testis 0.9, spleen 0.8, liver 1.9	87
					+ (m)		spleen 3	69,70
						+	bone marrow 3	39
					- (m)		splenic T-lymphocytes 1.2	88
cyproterone acetate	+ (2B)	+	+	+	+ (r)		liver 4	89
2,4-diaminotoluene	+ (2B)	+		+	+ (m)		liver 2	90,91
					+ (m)		liver 2	78
di-ethylnitrosamine (DEN) (N-ethyl-N-nitroso-ethanamine)	+ (2A)	+	+	+		+	bone marrow 1, liver 7	92
						+	liver 19	93
						+	bone marrow approx. 1, liver approx. 3	94
						+	liver 6, kidney 2, lung 2, bladder 1.1, bone marrow 1.3, testis 0.8	95

dimethylnitrosamine (DMN) (N-ethyl-N-nitroso-methanamine)	+ (2A)	+	+	+ <sup>96</sup>	+(m)		liver 4, bladder 1	97
					+(m)		liver 3	90,91
					+(m)		liver 37	98
					+(m)		liver 16	99
						+	nasal mucosa 10, lung 1.2, liver 2	100
					+(m)		liver 2	101
						+	liver 5	101
					+(m)		liver 2	102
					+(m)		liver 6	103
					+(m)		forestomach 1.1, liver 2, lung 1.2	104,105
					+(m)		liver 6, kidney 2, lung 2, bone marrow 1.3, bladder 1.3, testis 0.8	95
						+	liver 5, spleen 3	106
					+(m)		liver 4	22
						+	liver 6	22
	+	liver 5	35					
6-( <i>p</i> -dimethylaminophenylazo)benzothiazole	+	+	+	+	+(r)		liver 10	107
7,12-dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracene (DMBA)	+	+	+	+		+	skin 3	108
						+	skin 15	109
						+	bone marrow 30, liver 12, colon 3, thymus 4, skin 3, kidney 1.1, testis 3	110
						+	bone marrow 3, skin 6	37
					+(m)		skin 6	111
						+	skin 4	39
						+	liver 2, colon 1.5, bone marrow 9, lung 0.5, kidney 1, bladder 1.6, testis 5	46
5, 9-dimethyldibenzo[ <i>c,g</i> ]carbazole	+		+	+		+	liver 58	112
						+	liver 3	113

ethylene oxide	+ (2A)	+	+	+ <sup>114</sup>	+(m)		lung 1.4, spleen 2, sperm -	<sup>115</sup>
					+(m)		lung 1.5, bone marrow 1.9, spleen 1.9, sperm ducts from testis 1.0, splenic B- and T-cells 4	<sup>116</sup>
ethyl methanesulphonate	+ (2B)	+	+	+ <sup>84</sup>		+	sperm from epididymis and vas deferens 2	<sup>117</sup>
						+	small intestine 2, spleen 3	<sup>118</sup>
						-	liver 1, bone marrow 2, brain 1.5	<sup>92</sup>
						+	bone marrow 5, liver 1.8	<sup>119</sup>
N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)	+ (2A)	+	+	+		+	liver 2.0, spleen 18, bone marrow 19, brain 1.6, lung 2, kidney 2, bladder 11, heart 2	<sup>120</sup>
						+	sperm from testis 5	<sup>121</sup>
						+	small intestine 28	<sup>122</sup>
						+	heart 5, small intestine 1.3	<sup>123</sup>
						+(r)	liver 11, uterus 14	<sup>124</sup>
						+	sperm from epididymis and vas deferens 9	<sup>125</sup>
						+	sperm from epididymis and vas deferens 6	<sup>117</sup>
						+	small intestine 11, spleen 6	<sup>118</sup>
						+	spleen 14	<sup>126</sup>
						+	sperm from testis 18, from vas deferens 4	<sup>127</sup>
						+	bone marrow 34, liver 11	<sup>128</sup>
						+	sperm from testis 16, from epididymis 9	<sup>129</sup>
						+(m)	sperm ducts from testis 1.5, sperm from the epididymis 2	<sup>130</sup>

					+	bone marrow 40, liver 27, testis 32	<sup>37</sup>
					+	bone marrow 31, liver 6	<sup>81</sup>
					+	bone marrow 50, liver 3, testis 2, epididymis 2	<sup>131</sup>
					+	testis 10	<sup>26</sup>
					+(m)	sperm ducts from testis 4, spleen 8	<sup>69,70</sup>
					+	liver 7	<sup>38</sup>
					+	testis 7	<sup>132</sup>
					+	liver 4, bone marrow 23, brain -	<sup>92</sup>
					+(m)	liver 3	<sup>40</sup>
					+	(liver 1, embryonic liver 4)	<sup>133</sup>
					+	bone marrow 40, liver 17	<sup>39</sup>
					+(m)	sperm from testis 20	<sup>134</sup>
					+(m)	sperm ducts from testis 3, sperm from the epididymis 0.7	<sup>135</sup>
					+	lung 4, bone marrow 24, liver 5	<sup>73,74</sup>
					+(m)	bone marrow 20	<sup>74</sup>
					+(m)	bone marrow 35	<sup>75</sup>
					+(m)	splenic T-cells 8	<sup>136</sup>
					+	bone marrow, liver	<sup>94</sup>
					+	bone marrow 10, liver 2	<sup>119</sup>
					+	sperm ducts from testis 5, sperm from epididymis and vas deferens 1.3	<sup>137</sup>
					+	testis 16	<sup>138</sup>
					+(m)	splenic T-cells 3	<sup>139</sup>
					+(m)	sperm ducts from testis 5	<sup>140</sup>
etoposide	+(2A)	+	+	+	+	bone marrow 1.3	<sup>35</sup>
hydrazine sulphate	+(hydrazine 2B)	+(hydrazine)	+(hydrazine)	+(hydrazine)	-	(lung 1.3, liver 1.3, bone marrow 0.9)	<sup>141</sup>



N-hydroxy-2-acetylaminofluorene	+	+	+	+	+(r)	liver 40, spleen 3	<sup>142</sup>
					-	liver 2	<sup>143</sup>
Isopropyl methanesulphonate	+		+	+		testis 7, epididymis 4	<sup>129</sup>
					+(m)	sperm ducts from testis 1.3	<sup>130</sup>
						testis 5, epididymis 3, vas deferens 4	<sup>26</sup>
						testis 2	<sup>132</sup>
					+(m)	sperm ducts from testis 3, sperm from the epididymis 0.8	<sup>135</sup>
						testis 4	<sup>138</sup>
methyl bromide	+/- (3)	+	+	+	-	(liver 1.3, glandular stomach 0.7)	<sup>144</sup>
β-methylcholanthrene	+	+	+	+	+(m)	liver 1.3, forestomach 0.8	<sup>145</sup>
methyl methanesulphonate	+ (2B)	+	+	+ <sup>84</sup>		sperm from testis 1.3	<sup>121</sup>
						sperm from epididymis and vas deferens 1.5	<sup>117</sup>
						sperm ducts from testis 1.3, sperm from the epididymis 1.1	<sup>129</sup>
					-(m)	sperm ducts from testis 1.1	<sup>130</sup>
						testis 1.3, sperm from epididymis and vas deferens 1.0, spleen 1.1	<sup>146</sup>
						testis 1	<sup>132</sup>
					+(m)	liver 1.7	<sup>99</sup>
					-(m)	sperm ducts from testis 1.3, sperm from the epididymis 0.9	<sup>135</sup>
						sperm ducts from testis 1.2, sperm from epididymis and vas deferens 1.1	<sup>137</sup>
						testis 1.2, sperm from epididymis 0.9	<sup>138</sup>
						liver 2, bone marrow 1.5	<sup>35</sup>
					-(m)	sperm ducts from testis 1.4	<sup>140</sup>

N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG)	+ (2A)	+	+	+		+	stomach 6, liver -, bone marrow -	<sup>147</sup>
						+	stomach 19	<sup>148</sup>
						+	stomach 13, liver 1.3, skin 78	<sup>109</sup>
						+	skin 5	<sup>39</sup>
N-methyl-N-nitroso-urea (MNU)	+ (2A)	+	+	+		+	sperm from epididymis and vas deferens 6	<sup>117</sup>
						+	small intestine 6, spleen 2	<sup>118</sup>
						+(m)	spleen 75, liver 11	<sup>70</sup>
						+(m)	splenic T-cells 3	<sup>149</sup>
						+(m)	brain 3, lung 23, sperm 6	<sup>150</sup>
						+(m)	forestomach 1.3, liver 2, lung 1.2, kidney 1	<sup>104,105</sup>
						+(m)	spleen 12	<sup>151</sup>
mitomycin-C	+ (2B)	+	+	<sup>84</sup>		+	(bone marrow 1.7, liver 0.5)	<sup>152</sup>
4-nitroquinoline-1-oxide	+	+	+	+		+	tongue 39, oesophagus 20, pooled oral tissues 54	<sup>153</sup>
						+	tongue 34, oesophagus 24, pooled oral tissues 15, lung 0.8, liver 0.7, colon 0.8	<sup>154</sup>
						+	liver 9, bone marrow 51, testis 3, kidney 1.2, spleen 1.2, lung 1.6, stomach 55	<sup>155</sup>
N-nitroso-dibenzylamine		+	+	+		+	bone marrow 1.7, liver 4	<sup>156</sup>
N-nitroso-dipropylamine	+ (2B)	+	+	+		+	bone marrow 2, liver 12, lung 3, kidney 1.4, bladder 1.0, testis 0.5	<sup>157</sup>
N-propyl-N-nitroso-urea	+		+	+		+	bone marrow 8, liver 2, lung 1.9, kidney 2, spleen 3, testis 4, brain 1.0, heart 2	<sup>158</sup>
procarbazine	+ (2A)	+	+	<sup>41</sup>		+	bone marrow 91	<sup>37</sup>
						+	bone marrow 30	<sup>39</sup>

β-propiolactone	+ (2B)	+	+	+		+	stomach 9, liver 2, bone marrow -	<sup>147</sup>
						+	stomach 11	<sup>148</sup>
streptozotocin	+ (2B)	+	+	+	+(m)		liver 2, kidney 6	<sup>159</sup>
tamoxifen	+ (1)	+	+	+	+(r)		liver 3, uterus 0.4	<sup>124</sup>
					+(r)		liver 3	<sup>43 44</sup>
thiotepa	+ (1)	+	+	<sup>+41</sup>	+(r)		splenic lymphocytes 4	<sup>160</sup>
tris(2,3-dibromopropyl)- phosphate	+ (2A)	+	+	<sup>+41</sup>	+(m)		kidney 1.5, stomach 1.5, liver 1.2	<sup>65</sup>
					+(r)		renal cortex 6, renal medulla (interior) 2, renal medulla (exte- rior) 4	<sup>161</sup>
urethane	+ (2B)	+	+	<sup>+84</sup>	+(m)		forestomach 1.5, liver 5, lung 7	<sup>104,105</sup>
<b>non-genotoxic</b>								
<i>o</i> -anisidine	+ (2B)	+	-	-	+(m)		liver 1.5, bladder 2	<sup>97</sup>
di(2-ethylhexyl)phthalate	+/- (3)	+/-	-	-	-(m)		liver 1.7	<sup>33</sup>
phenobarbital	+ (2B)	+/-	-	-	-(m)		liver 1.2	<sup>33</sup>
					-(m)		liver approx. 1	<sup>98</sup>
						+	liver 1.4	<sup>162</sup>
						-	liver 1.1	<sup>113</sup>
heptachlor	+/- (3)	+/-	-	-	-(m)		liver 2	<sup>33</sup>
levofloxacin		+	-	-		-	bone marrow 1.0, liver 1.2, testis 1.0, epididymis 1.3	<sup>131</sup>
methyl clofenapate	+	-	-	-	-(m)		liver 1.2	<sup>163</sup>
						-	liver 0.8	<sup>163</sup>
2-nitro- <i>p</i> -phenylenedi- amine	+ (3)	+	-	-	+(m)		liver 2	<sup>78</sup>
oxazepam	+ (2B)	+	-	-	+(r)		liver 1.9	<sup>103</sup>
peroxyacetyl nitrate		+	-	-	+(m)		lung 1.3	<sup>164</sup>
saccharin (sodium salt)	+/- (3)	+	-	-	-(r)		liver 1.2, (bladder 0)	<sup>48</sup>
tetrachloromethane	+ (2B)	+/-	-	<sup>165</sup>	-(m)		liver approx. 1	<sup>98</sup>
						-	liver 1.6	<sup>113</sup>
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	+ (1)	-	-	<sup>166</sup>	-(r)		liver 1.0	<sup>167</sup>
<b>genotoxicity insufficiently investigated</b>								
4-acetylamino fluorene	-				-(?)		liver -, bladder -	<sup>168</sup>

aristolochic acid	+	+				+	forestomach 33, kidney 10, bladder 16, colon 9, stomach 3, lung 2, liver 1, bone marrow 2, spleen 3, testis 1.5	169
asbestos	+ (1)	+		170	+(m)		lung 2	171
					+(r)		lung 1.6	71
					+(r)		lung 2	172
					+(r)		omentum 3	173
acetic acid		-				+	skin 8	39
2,6-diaminotoluene	-	+				-(m)	liver 1.0	90,91
1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea (Methyl-CCNU)	+	(1)				-(m)	bone marrow 9, liver -	174
1-chloro-methylpyrene		+				+	stomach 1.3, skin 10	109
dichloroacetic acid	+/- (3)	-	+/-			+(m)	liver 2	175
dimethylarsinic acid		+				-	lung 1.3, kidney 1.0, bone marrow ?, bladder ?	63
6,11-dimethylbenzo[ <i>b</i> ]naphtho-[2,3- <i>d</i> ]thiophene	+	+				+	skin 5	108
eugenol	+/- (3)	+/-				-	liver 0.9	176
3-fluoroquinoline	-	-				-	liver 1.0, bone marrow 1.1, testis 1.6	177
5-fluoroquinoline	+ rat	+				+	liver 5, bone marrow 1.4, testis 1.6	177
phorone						-(m)	liver 2, kidney 2	42
leucomalachite green		+/-				+(r)	liver 3	178
D-limonene	+/- (3)	-				-(r)	liver 1.1, kidney 1.1	48
7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1- <i>b</i> ]furan	+	+			+(m)		spleen 2, testis 1, stomach 1, oesophagus 1.3, liver 0.8, small intestine 3, caecum 4, colon 2, bladder 2	151
					+(m)		small intestine 5, caecum 5	179
quinoline	+	+				+	(liver 4, bone marrow 1.5, testis 1.4)	177
						+	liver 4; kidney, lung and spleen approx. 1	106

toremifen	+/- (3)	+/-	+/-		-(r)		liver 1.4	43 44
trans-4-hydroxy-2-nonenal		+			-(m)		lung 1.1, liver 2, kidney 1.1	180
uracil	+				+(r)		bladder 5	181

- <sup>a</sup> The IARC classification is given in brackets:  
1: the substance is carcinogenic in humans  
2A: the substance is probably carcinogenic in humans (limited evidence in humans, sufficient evidence in experimental animals)  
2B: the substance is possibly carcinogenic in humans (limited evidence in humans, and less than sufficient evidence in experimental animals, or inadequate evidence in humans, but sufficient evidence in experimental animals)  
3: the substance cannot be classified in terms of its carcinogenicity in humans (the substance is placed in this group if it does not fit into any of the other groups)  
4: the substance is probably not carcinogenic in humans (evidence indicating the absence of carcinogenic properties in humans and in experimental animals)
- <sup>b</sup> In vitro, in vivo and total genotoxicity. In the overall verdict, more weight is given to the in vivo results. The verdict is based on classical genotoxicity assays and on indirect evidence from sources such as studies into the formation of DNA adducts
- <sup>c</sup> (m): mouse; (r): rat; (?): animal species not reported; +: at least one organ or tissue positive; -: all of the of the organs and tissues assayed are negative
- <sup>d</sup> organs and tissues investigated with quotient of mutation frequencies of treated and control groups (the values in brackets are low; this is a result of the pooled analysis per group or missing information about statistical processing); the highest value where there are multiple assay designs; -: no statistically significant increase in MF, but quotient unreported; ?: no verdict possible (group size too small)
- <sup>e</sup> +: positive; +/-: dubious; -: negative; empty cell: insufficiently investigated, or not at all.

