I

(Säädökset, jotka on julkaistava)

KOMISSION DIREKTIIVI 2000/32/EY,

annettu 19 päivänä toukokuuta 2000,

vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkintöjä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY mukauttamisesta tekniikan kehitykseen kahdennenkymmenennenkuudennen kerran (*)

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon vaarallisten aineiden luokitusta, pakkaamista ja merkitsemistä koskevien lakien, asetusten ja hallinnollisten määräysten lähentämisestä 27 päivänä kesäkuuta 1967 annetun neuvoston direktiivin 67/548/ETY ([1]), sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivillä 1999/33/EY ([2]), ja erityisesti sen 28 artiklan,

sekä katsoo seuraavaa:

(1) Direktiivin 67/548/ETY liite I sisältää vaarallisten aineiden luettelon sekä kunkin aineen luokitusta ja merkintöjä koskevat vaatimukset. Kyseisen liitteen vaarallisten aineiden luettelo olisi mukautettava tieteellisen ja teknisen nykytietämyksen perusteella. Tietyissä direktiivin kielitoisinnoissa on korjattava liitteen I yleisjohdannon ja taulukon A tietyt osat.

(2) Direktiivin 67/548/ETY liitteessä III on luettelo lausekkeista, jotka koskevat vaarallisiin aineisiin ja valmisteisiin liittyvien erityisten vaarojen luonnetta. Direktiivin 67/548/ETY liitteessä IV on luettelo lausekkeista, jotka koskevat vaarallisiin aineisiin ja valmisteisiin liittyviä turvallisuusohjeita. Direktiivin 67/548/ETY liitteessä VI on vaarallisten aineiden ja valmisteiden luokitus- ja merkintäopas. Direktiivin tietyissä kielitoisinnoissa on korjattava liitteen III, IV ja VI tietyt osat.

(3) Direktiivin 67/548/ETY liitteessä V säädetään menetelmistä aineiden ja valmisteiden fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien, toksisuuden ja ekotoksisuuden määrittämiseksi. Kyseinen liite on mukautettava tekniikan kehitykseen.

(4) Direktiivin 67/548/ETY liite IX sisältää lapsiturvallisia sulkimia koskevat säännökset. Nämä säännökset on mukautettava ja niitä on täydennettävä. On tarpeen laajentaa lapsiturvallisten sulkimien soveltamisalaa.

(5) Tässä direktiivissä säädetyt toimenpiteet ovat vaarallisten aineiden ja valmisteiden kaupan teknisten esteiden poistamiseksi annettujen direktiivien mukauttamista tekniseen kehitykseen käsittelevän komitean lausunnon mukaiset,

ON ANTANUT TÄMÄN DIREKTIIVIN:

1 artikla

Muutetaan direktiivi 67/548/ETY seuraavasti:

1. Muutetaan liite I seuraavasti:

   a) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 1A olevalla huomautuksella Q yleisjohdannossa oleva vastaava huomautus.

   b) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 1B olevilla riveillä vastaavat rivit taulukossa A.

   c) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 1C olevilla nimikkeillä vastaavat nimikkeet.

   d) Lisätään tämän direktiivin liitteessä 1D olevat nimikkeet.

2. Korvataan tämän direktiivin liitteessä 2 olevalla vaaralausekkeella vastaava lauseke liitteessä III.

3. Muutetaan liite IV seuraavasti:

   a) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 3A olevilla turvallisuusohjelausekkeilla vastaavat lausekkeet liitteessä IV.

(*) Annettu 27. mukautuksen jälkeen.
([1]) EYVL 196, 16.8.1967, s. 1.
([2]) EYVL L 199, 30.7.1999, s. 57.

b) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 3B olevilla turvallisuusohjeita koskevilla yhdistelmälausekkeilla vastaavat lausekkeet liitteessä IV.

4. Muutetaan liitteessä V oleva osa B seuraavasti:

a) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 4A olevalla tekstillä luku B.10.

b) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 4B olevalla tekstillä luku B.11.

c) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 4C olevalla tekstillä luku B.12.

d) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 4D olevalla tekstillä luku B.13 ja B.14.

e) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 4E olevalla tekstillä luku B.17.

f) Korvataan tämän direktiivin liitteessä 4F olevalla tekstillä luku B.23. Muutetaan vastaavasti selittävässä huomautuksessa oleva luvun B.23 otsikko.

g) Lisätään tämän direktiivin liitteessä 4G oleva teksti.

5. Poistetaan liitteessä V olevan osan C yleisjohdannon neljäs luetelmakohta.

6. Korvataan tämän direktiivin liitteessä 5 olevilla teksteillä vastaavat tekstit liitteessä VI.

7. Muutetaan liite IX tämän direktiivin liitteen 6 mukaisesti.

2 artikla

1. Jäsenvaltioiden on saatettava tämän direktiivin noudattamisen edellyttämät lait, asetukset ja hallinnolliset määräykset voimaan viimeistään 1 päivänä kesäkuuta 2001. Niiden on ilmoitettava tästä komissiolle viipymättä.

Näissä jäsenvaltioiden antamissa säädöksissä on viitattava tähän direktiiviin tai niihin on liitettävä tällainen viittaus, kun ne virallisesti julkaistaan. Jäsenvaltioiden on säädettävä siitä, miten viittaukset tehdään.

2. Jäsenvaltioiden on toimitettava komissiolle tässä direktiivissä tarkoitetuista kysymyksistä antamansa keskeiset kansalliset säännökset ja vastaavuustaulukko tämän direktiivin säännöksistä ja antamistaan kansallisista säädöksistä.

3 artikla

Tämä direktiivi tulee voimaan kolmantena päivänä sen jälkeen, kun se on julkaistu *Euroopan yhteisöjen virallisessa lehdessä*.

4 artikla

Tämä direktiivi on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 19 päivänä toukokuuta 2000.

Komission puolesta

Margot WALLSTRÖM

Komission jäsen

LIITE 1A

LIITE I YLEISJOHDANTO

Aineiden tunnistetietoja, luokitusta ja merkintöjä koskevien huomautusten selitykset

DA:

Note Q:

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

— en kortvarig biopersistensprøve ved inhalation har vist, at fibre, der er længere end 20 μm, har en vægtet halveringstid på mindre end 10 dage

— en kortvarig biopersistensprøve ved intratrakeal instillation har vist, at fibre, der er længere end 20 μm, har en vægtet halveringstid på mindre end 40 dage

— en egnet intra-peritoneal prøve ikke har vist kræftfremkaldende virkning, eller

— en egnet langvarig inhalationsprøve ikke har vist relevante sygdomsfremkaldende virkninger eller neoplastiske forandringer.

SV:

Note Q:

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

— ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid inhalation har visat att fibrer längre än 20 μm har en viktad halveringstid på mindre än 10 dagar

— ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid intratrakeal instillation har visat att fibrer längre än 20 μm har en viktad halveringstid på mindre än 40 dagar

— ett lämpligt intraperitonealt test har inte givit belägg för förhöjd cancerogenitet

— frånvaro av relevant patogenitet eller neoplastiska förändringar i ett lämpligt långtids inhalationstest.

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DE toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske IT toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

LIITE 1B

TAULUKKO A

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

LIITE 1C

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
006-011-00-7	karbaryyli (ISO) 1-naftyylimetyylikarbamaatti		200-555-0	63-25-2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-)22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	metaami-Na (ISO) natriummetyyliditiokarbamaatti		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	diuroni (ISO) 3-(3,4-diklоorifenyyli)-1,1-dimetyyliurea		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	propoksuuri (ISO) 2-(1-metyylietoksifenyyli)metyylikarbamaatti		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-017-00-X	aldikarbi (ISO) 2-metyyli-2-(metyylitio)propanaali-*O*-(*N*-metyylikarbamoyyli)oksiimi		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	aminokarbi (ISO) 4-dimetyyliamino-3-tolyylimetyylikarbamaatti		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	di-allaatti (ISO) *S*-(2,3-diklooriallyyli)-*N*,*N*-di-isopropyylitiokarbamaatti		218-961-1	2303-16-4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
006-020-00-6	barbaani (ISO) 4-klooribut-2-ynyyli-*N*-(3-kloorifenyyli)karbamaatti		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
006-023-00-2	merkaptodimetuuri (ISO) metiokarbi 3,5-dimetyyli-4-(metyylitio)fenyylimetyylikarbamaatti		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	proksaani-Na (ISO) natrium-*O*-isopropyyliditiokarbamaatti		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
006-026-00-9	karbofuraani (ISO) 2,3-dihydro-2,2-dimetyyli-7-bentsofuranyylimetyylikarbamaatti		216-353-0	1563-66-2	T+; R26/28 N; R50-53	T+; N R: 26/28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	dinobutoni (ISO) 2-(1-metyylipropyyli)-4,6-dinitrofenyyli-isopropyylikarbonaatti		213-546-1	973-21-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-029-00-5	dioksakarbi (ISO) 2-(1,3-dioksolan-2-yyli)fenyylimetyylikarbamaatti		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N; R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2-)37-45-61		
006-033-00-7	metoksuroni (ISO) 3-(3-kloori-4-metoksifenyyli)-1,1-dimetyyliurea		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pebulaatti (ISO) *S*-propyylibutyylietyylikarbamotioaatti		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)23-61		
006-035-00-8	pirimikarbi (ISO) 5,6-dimetyyli-2-dimetyyliaminopyrimidin-4-yyli-*N*,*N*-dimetyylikarbamaatti		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	promekarbi (ISO) 5-isopropyyli-3-tolyylimetyylikarbamaatti		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	sulfallaatti (ISO) 2-klooriallyylidietyyliditiokarbamaatti	E	202-388-9	95-06-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	triallaatti (ISO) *S*-2,3,3-trikloriallyylidi-isopropyylitiokarbamaatti		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
006-042-00-6	monuroni (ISO) 3-(4-kloorifenyyli)-1,1-dimetyyliurea		205-766-1	150-68-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-043-00-1	monuroni-TCA 3-(4-kloorifenyyli)-1,1-dimetyyliuroniumtrikloori-asetaatti		—	140-41-0	Xi; R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
006-045-00-2	metomyyli (ISO) 1-metyylitioetylideeniamiinimetyylikarbamaatti		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	bendiokarbi (ISO) 2,2-dimetyyli-1,3-bentsodioksol-4-yylimetyyli-karbamaatti		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	bufenkarbi (ISO) 3-(1-metyylibutyyli)fenyylimetyylikarbamaatin ja 3-(1-etyylipropyyli)fenyylimetyylikarbamaatin seos		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	etiofenkarbi (ISO) 2-etyylitiometyylifenyylimetyylikarbamaatti		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-050-00-X	fenuroni-TCA 1,1-dimetyyli-3-fenyyliuroniumtriklooriasetaatti		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)60-61		
006-053-00-6	isoprokarbi (ISO) *o*-kumenyylimetyylikarbamaatti		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-054-00-1	meksakarbaatti (ISO) 4-dimetyyliamino-3,5-ksylyylimetyylikarba-maatti		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-057-00-8	nitrapyriini (ISO) 2-kloori-6-trikloorimetyylipyridiini		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)24-61		
006-060-00-4	oksikarboksiini (ISO) 5,6-dihydro-2-metyyli-1,4-oksati-iini-3-karboksanilidi-4,4-dioksidi		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
006-069-00-3	tiofanaattimetyyli (ISO) 1,2-di-(3-metoksikarbonyyli-2-tioureidi)bent-seeni		245-740-7	23564-05-8	Muta. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-070-00-9	furmesykloksi *N*-sykloheksyyli-*N*-metoksi-2,5-dimetyyli-3-furamidi		262-302-0	60568-05-0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
006-088-00-7	benfurakarbi (ISO) etyyli-*N*-[2,3-dihydro-2,2-dimetyylibentsofuran-7-yylioksikarbonyyli(metyyli)aminotio]-*N*-isopropyyli-*β*-alaninaatti		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
007-012-00-5	*N*,*N*-dimetyylihydratsiini 1,1-dimetyylihydratsiini	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	1,2-dimetyylihydratsiini *N*,*N*′-dimetyylihydratsiini	E	—	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T; R45-23/24/25 3 % ≤ C < 25 %: T; R45-20/21/22 0,01 % ≤ C < 3 %: T; R45	
009-003-00-1	Fluorivetyhappo … %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-)7/9-26-36/37-45	C ≥ 7 %: T+; C; R26/27/28-35 1 % ≤ C < 7 %: T; R23/24/25-34 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	atsiinifossi-metyyli (ISO) atsinfossi-metyyli *O*,*O*-dimetyyli-4-oksobentsotriatsin-3-yylimetyyliditiofosfaatti		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	fentioni (ISO) *O*,*O*-dimetyyli-*O*-(4-metyylitio-m-tolyyli)tiofosfaatti		200-231-9	55-38-9	Muta. Cat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
015-056-00-1	atsiinifossi-etyyli (ISO) atsinfossi-etyyli *O*,*O*-dietyyli-4-oksobentsotriatsin-3-yylimetyyliditiofosfaatti		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	triatsofossi (ISO) *O*,*O*-dietyyli-*O*-1-fenyyli-1,2,4-triatsol-3-yylitiofosfaatti		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
016-013-00-X	rikkidikloridi		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
016-014-00-5	rikkitetrakloridi		—	13451-08-6	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
016-023-00-4	dimetyylisulfaatti	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25 %: T+; R45-25-26-34-43 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-22-26-34-43 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5 % ≤ C < 7 %: T; R45-22-23-36/37/38-43 3 % ≤ C < 5 %: T; R45-22-23-43 1 % ≤ C < 3 %: T; R45-23-43 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
016-024-00-X	dimeksaani (ISO) bis(metoksitiokarbonyyli)disulfidi		215-993-8	1468-37-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
016-071-00-6	trinatrium-3-amino-6,13-dikloori-10-((3-((4-kloori-6-(2-sulfofenyyliamino)-1,3,5-triatsin-2-yyli)amino)propyyli)amino)-4,11-trifenoksidioksatsiinidisulfonaatti		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
022-001-00-5	titaanitetrakloridi		231-441-9	7550-45-0	R14 C; R34	C R: 14-34 S: (1/2-)7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
030-004-00-8	dimetyylisinkki [1] dietyylisinkki [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F; R17 C; R34 N; R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2-)16-43-45-60-61		
050-002-00-0	syheksatiini (ISO) trisykloheksyylitinahydroksidi		236-049-1	13121-70-5	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)13-60-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
050-012-00-5	tetrasykloheksyylistannaani [1] klooritrisykloheksyylistannaani [2] butyylitrisykloheksyylistannaani [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 1 %: Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	fenbutatiinioksidi (ISO) fenbutatina-oksidi bis(tris(2-metyyli-2-fenyylipropyyli)tina)oksidi		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	lyijysulfokromaattikeltainen C.I. Pigment Yellow 34 [Tämä aine esiintyy Colour Index -luettelossa, Colour Index Constitution Number, C.I. 77603.]		215-693-7	1344-37-2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	lyijykromaattimolybdaattisulfaattipunainen C.I. Pigment Red 104 [Tämä aine esiintyy Colour Index -luettelossa, Colour Index Constitution Number, C.I. 77605.]		235-759-9	12656-85-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	kumeeni [1] propyylibentseeni [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2-)24-37-61-62		4
601-032-00-3	bentso[*a*]pyreeni bentso[*def*]kryseeni		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	bentso[*e*]asefenantryleeni bentso[*b*]fluoranteeni		205-911-9	205-99-2	Carc. Cat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-diklooribentseeni *p*-diklooribentseeni		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-jodipropeeni allyylijodidi		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7-26-45		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
603-076-00-9	2-butyyni-1,4-dioli but-2-yyni-1,4-dioli		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2-)26-36/37/39-45	C ≥ 50 %: T; R21-23/25-34-48/22 25 % ≤ C < 50 %: T; R21-23/25-36/38-48/22 10 % ≤ C < 25 %: Xn; R20/22-48/22 3 % ≤ C < 10 %: Xn; R20/22	
603-091-00-0	ekso-1-metyyli-4-(1-metyylietyyli)-7-oksabisyklo[2.2.1]heptan-2-oli		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2-)26		
603-093-00-1	ekso-(+/-)-1-metyyli-4-(1-metyylietyyli)-2-[(2-metyylifenyyli)metoksi]-7-oksabisyklo-[2.2.1]heptaani		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2-)23-61		
603-097-00-3	1,1′,1″-nitriilitripropan-2-oli tri-isopropanoliamiini		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2-)26-61		
603-117-00-0	propan-2-oli isopropyylialkoholi isopropanoli		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2-)7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	2-fenyylifenoli (ISO) bifenyl-2-oli 2-hydroksibifenyyli		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2-)22-61		
604-021-00-1	natrium-2-bifenylaatti 2-fenyylifenoli, natriumsuola		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2-)22-26-61		
604-024-00-8	4,4′-isobutyylietyylideenidifenoli		401-720-1	6807-17-6	Repr. Cat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	atsifluorifeeni [1] atsifluorifeeninatrium [2] 5-[2-kloori-4-(trifluorimetyyli)fenoksi]-2-nitrobentsoehappo [1] natrium-5-[2-kloori-4-(trifluorimetyyli)fenoksi]-2-nitrobentsoaatti [2]		256-634-5 [1] 263-560-7 [2]	50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-)24-39-60-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
604-043-00-1	monobentsoni 4-(fenyylimetoksi)fenoli		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	mekvinoli 4-metoksifenoli		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	glyoksaali … % etaani-1,2-dioni ... %	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10 %: Xn; R20-36/38-40-43 1 % ≤ C < 10 %: Xn; R40-43	
606-016-00-X	pindoni (ISO) 2-pivaloyyli-indaani-1,3-dioni		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	dikloni (ISO) 2,3-dikloori-1,4-naftokinoni		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	klordekoni (ISO) dekaklooripentasyklo[5,2,1,$0^{2,6}$,$0^{3,9}$,$0^{5,8}$] dekan-4-oni		205-601-3	143-50-0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	metributsiini (ISO) 4-amino-6-*tert*-butyyli-3-metyylitio-1,2,4-triatsin-5-oni		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	klooridatsoni (ISO) kloridatsoni 5-amino-4-kloori-2-fenyylipyridatsin-3-oni		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	kinometionaatti (ISO) 6-metyyli-1,3-ditiolo(4,5-b)kinoksalin-2-oni		219-455-3	2439-01-2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	triadimefoni (ISO) 1-(4-kloorifenoksi)-3,3-dimetyyli-1-(1,2,4-triatsol-1-yyli)butanoni		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
606-044-00-2	2,4,6-trimetyylibentsofenoni		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2-)26-60-61		
607-043-00-X	dikamba (ISO) 3,6-dikloori-2-metoksibentsoehappo 2,5-dikloori-6-metoksibentsoehappo		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-057-00-6	kumakloori (ISO) 3-[1-(4-kloorifenyyli)-3-oksobutyyli]-4-hydroksikumariini		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)37-61		
607-058-00-1	kumafuryyli (ISO) fumariini 4-hydroksi-3-[3-okso-1-(2-furyyli)butyyli] kumariini		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
607-079-00-6	kelevani (ISO) etyyli-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-dekakloori-4-hydroksipentasyklo(5,2,1,$0^{2,6}$,$0^{3,9}$,$0^{5,8}$) dek-4-yyli)-4-oksovaleraatti		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-097-00-4	bentseeni-1,2,4-trikarboksyylihapon 1,2-anhydridi trimellitiinianhydridi		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-143-00-3	valeriaanahappo pentaanihappo		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) 2,3,6-triklooribentsoehappo		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	benatsoliini (ISO) 4-kloori-2-oksobentsotiatsolin-3-yylietikkahappo		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)22-61		
607-156-00-4	klorfensoni (ISO) 4-kloorifenyyli-4-klooribentseenisulfonaatti		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-158-00-5	natriumklooriasetaatti kloorietikkahapon natriumsuola		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2-)22-37-45-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
607-159-00-0	klorobentsilaatti (ISO) etyyli-4,4′-diklooribentsilaatti		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
607-176-00-3	Seos: α-3-(3-(2H-bentsotriatsol-2-yyli)-5-tert-butyyli-4-hydroksifenyyli)propionyyli-ω-hydroksipoly(oksietyleeni);α-3-(3-(2H-bentsotriatsol-2-yyli)-5-tert-butyyli-4-hydroksifenyyli)propionyyli-ω-3-(3-(2H-bentsotriatsol-2-yyli)-5-tert-butyyli-4-hydroksifenyyli)propionyylioksipoly(oksietyleeni)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-188-00-9	natriumvety-N-karboksylaattoetyyli-N-oktadek-9-enyylimaleamaatti		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24/37-61		
607-209-00-1	Seos: O,O-di(1-metyylietyyli)tritio-bis-tioformaatti;O,O-di(1-metyylietyyli)tetratio-bis-tioformaatti;O,O-di(1-metyylietyyli)pentatio-bis-tioformaatti		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
607-213-00-3	etyyli-3,3-bis[(1,1-dimetyylipropyyli)peroksi]butyraatti		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2-)3/7-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-etoksietyyli-2-[4-(2,6-dihydro-2,6-diokso-7-fenyyli-1,5-dioksaindasen-3-yyli)fenoksi]asetaatti		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
607-243-00-7	natrium-3,6-dikloori-*o*-anisaatti [1] 3,6-dikloori-*o*-anishappo, 2,2′-iminodietanoliyhdiste (1:1) [2] 3,6-dikloori-*o*-anishappo, 2-aminoetanoliyhdiste (1:1) [3]		217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]	1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-248-00-4	naptalami-natrium natrium-2-[(1-naftalenyyliamino)karbonyyli]bentsoaatti		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
607-249-00-X	(1-metyyli-1,2-etaanidiyyli)bis[oksi(metyyli-2,1-etaanidiyyli)]diakrylaatti tripropyleeniglykolidiakrylaatti		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	C ≥ 10 %: Xi; R36/37/38-43 1 % ≤ C < 10 %: Xi; R43	
607-252-00-6	lambda-syhalotriini (ISO) (Z)-[(1*R*) ja (1*S*)]-*cis*-(α-syano-3-fenoksibentsyyli-3-(2,2-dikloorivinyyli)-2,2-dimetyylisyklopropaanikarboksylaatti		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2-)28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	fluroksipyyri (ISO) 4-amino-3,5-dikloori-6-fluori-2-pyridyylioksietikkahappo		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	akryylinitriili	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 20 %: T; R45-23/24/25-37/38-41-43 10 % ≤ C < 20 %: T; R45-23/24/25-41-43 5 % ≤ C < 10 %: T; R45-23/24/25-36-43 1 % ≤ C < 5 %: T; R45-23/24/25-43 0,2 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45	
608-016-00-5	tetraklooritereftaalinitriili 1,4-disyano-2,3,5,6-tetraklooribentseeni		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
609-030-00-4	dinoterbi (ISO) 2-*tert*-butyyli-4,6-dinitrofenoli	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	nitrofeeni (ISO) 2,4-dikloorifenyyli-4-nitrofenyylieetteri	E	217-406-0	1836-75-5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	teknatseeni (ISO) 1,2,4,5-tetrakloori-3-nitrobentseeni		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
611-008-00-4	4-aminoatsobentseeni 4-fenyyliatsoaniliini		200-453-6	60-09-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	trilitium-1-hydroksi-7-(3-sulfonaattianiliini)-2-(3-metyyli-4-(2-metoksi-4-(3-sulfonaattifenyyliatso)fenyyliatso)fenyyliatso)naftaleeni-3-sulfonaatti trilitium-4-hydroksi-3-(4-(2-metoksi-4-(3-sulfonaattifenyyliatso)fenyyliatso)-3-metyylifenyyliatso)-6-(3-sulfonaattianiliini)naftaleeni-2-sulfonaatti		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	4,4′-(4-iminosykloheksa-2,5-dienylideenimetyleeni)dianiliinihydrokloridi C.I. Basic Red 9		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-metoksianiliini *o*-anisidiini	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	bentsidiini 4,4′-diaminobifenyyli 1,1′-bifenyyli-4,4′-diamiini; bifenyyli-4,4′-yleenidiamiini	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T; R45-22 0,01 % ≤ C < 25 %: T; R45	
612-051-00-1	4,4′-diaminodifenyylimetaani 4,4′-metyleenidianiliini	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	4,4′-bi-*o*-toluidiinin suolat 3,3′-dimetyylibentsidiinin suolat *o*-toluidiinin suolat	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-metyyli-*m*-fenyleenidiamiini 2,4-tolueenidiamiini	E	202-453-1	95-80-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-piperatsin-1-yylietyyliamiini		205-411-0	140-31-8	Xn, R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
612-111-00-7	2-metyyli-*m*-fenyleenidiamiini 2,6-tolueenidiamiini		212-513-9	823-40-5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2-)24-36/37-61		
612-125-00-3	2-metyyli-*p*-fenyleenidiamiini 2-metyyli-1,4-bentseenidiamiini 2,5-tolueenidiamiini		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2-)24-37-45-61		
612-144-00-7	flumetraliini (ISO) *N*-(2-kloori-6-fluoribentsyyli)-*N*-etyyli-*α*,*α*,*α*-trifluori-2,6-dinitro-*p*-toluidiini		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
612-151-00-5	diaminotolueeni tolueenidiamiini	E	246-910-3	25376-45-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	morfamkvatti (ISO) 1,1′-bis-(3,5-dimetyylimorfoliinikarbonyylimetyyli)-4,4′-bipyridiliumioni		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-031-00-5	symkloseeni trikloori-isosyanuurihappo trikloori-1,3,5-triatsiinitrioni		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2-)8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-fenyyli-1,3,5-triatsiini-2,4-diyylidiamiini bentsoguanamiini 6-fenyyli-1,3,5-triatsiini-2,4-diamiini		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
613-042-00-5	imatsaliili (ISO) 1-[2-(allyylioksi)-2-(2,4-dikloorifenyyli)etyyli]-1*H*-imidatsoli		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
613-043-00-0	imatsaliilisulfaatti (ISO) 1-[2-(allyylioksi)etyyli-2-(2,4-dikloorifenyyli)-1*H*-imidatsoliumvetysulfaatti [1] (±)-1-[2-(allyylioksi)etyyli-2-(2,4-dikloorifenyyli)]-1*H*-imidatsoliumvetysulfaatti [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
613-066-00-6	terbumetoni (ISO) 2-*tert*-butyyliamino-4-etyyliamino-6-metoksi-1,3,5-triatsiini		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
613-091-00-2	morfamkvattidikloridi [1] morfamkvattisulfaatti [2]		225-062-8 [1]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-098-00-0	1-oktyyli-2-pyrrolidoni N-(n-oktyyli)-2-pyrrolidinoni		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	heksakonatsoli (ISO) (*RS*)-2-(2,4-dikloorifenyyli)-1-(1*H*-1,2,4-triatsol-1-yyli)heksan-2-oli		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-131-00-9	pyrokviloni (ISO) 1,2,5,6-tetrahydropyrroli[3,2,1-*ij*]kinolin-4-oni		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
613-134-00-5	myklobutaniili (ISO) 2-(4-kloorifenyyli-)-2-(1*H*-1,2,4-triatsol-1-yylimetyyli)heksaaninitriili		—	88671-89-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2-)36/37-46-61		
613-137-00-1	metabentstiatsuroni (ISO) 1-(1,3-bentsotiatsol-2-yyli)1,3-dimetyyliurea		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	metsulfuroni-metyyli metyyli-2-(4-metoksi-6-metyyli-1,3,5-triatsin-2-yylikarbamoyylisulfonyyli)bentsoaatti		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	nikotiini (ISO) 3-(*N*-metyyli-2-pyrrolidinyyli)pyridiini		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
614-006-00-1	brusiini 2,3-dimetoksistrykniini		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
614-007-00-7	brusiinisulfaatti [1] brusiininitraatti [2] stryknidin-10-oni, 2,3-dimetoksi-, mono[(*R*)-1-metyyliheptyyli-1,2-bentseenidikarboksylaatti] [3] stryknidin-10-oni, 2,3-dimetoksi-, (*S*)-mono(1-metyyliheptyyli)-1,2-bentseenidikarboksylaattiyhdiste (1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		
615-006-00-4	2-metyyli-*m*-fenyleenidi-isosyanaatti [1] tolueeni-2,6-di-isosyanaatti [1] 4-metyyli-*m*-fenyleenidi-isosyanaatti [2] tolueeni-2,4-di-isosyanaatti [2] *m*-tolyylideenidi-isosyanaatti [3] tolueenidi-isosyanaatti [3]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C ≥ 20 %: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7 % ≤ C < 20 %: T+; R26-40-42/43 1 % ≤ C < 7 %: T; R23-40-42/43 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20-42	2
616-010-00-9	kloramin T (natriumsuola) tosyylikloori amidinatrium		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2-)7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	pyrakarbolidi (ISO) 3,4-dihydro-6-metyyli-*N*-fenyyli-2H-pyraani-5-karboksamidi		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	symoksaniili 2-syano-*N*-[(etyyliamino)karbonyyli]-2-(metoksi-imino)asetamidi		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
617-004-00-9	1,2,3,4-tetrahydro-1-naftyylihydroperoksidi tetraliinihydroperoksidi		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-)3/7-14-26 –36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C; R22-34 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	bis(α,α-dimetyylibentsyyli)peroksidi dikumyyliperoksidi		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	dibentsoyyliperoksidi bentsoyyliperoksidi		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2-)3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	klordimeformi (ISO) N^2-(4-kloori-o-tolyyli)-N^1,N^1-dimetyyliformamidiini		228-200-5	6164-98-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
650-008-00-9	dratsoksoloni (ISO) 4-(2-kloorifenyylihydratsoni)-3-metyyli-5-isoksatsoloni		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	klordimeformihydrokloridi N′-(4-kloori-*o*-tolyyli)-*N*,*N*-dimetyyliformamidiinimonohydrokloridi N^2-(*4-kloori-o*-tolyyli)-N^1,N^1-dimetyyliformamidiinihydrokloridi		243-269-1	19750-95-9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
650-033-00-5	esfenvaleraatti (ISO) (*S*)-*α*-syano-3-fenoksibentsyyli-(*S*)-2-(4-kloorifenyyli)-3-metyylibutyraatti		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2-)24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	triasulfuroni (ISO) 1-[2-(2-kloorietoksi)fenyylisulfonyyli]-3-(4-metoksi-6-metyyli-1,3,5-triatsin-2-yyli)urea		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

LIITE 1D

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
006-090-00-8	2-((3-jodi-2-propynyyli)oksi)-etyylifenyylikarbamaatti		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
014-016-00-0	Seos: 1,3-diheks-5-en-1-yyli-1,1,3,3-tetrametyylidisiloksaani; 1,3-diheks-n-en-1-yyli-1,1,3,3-tetrametyylidisiloksaani		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	kalsium-P,P′-(1-hydroksietyleeni)bis (vetyfosfonaatti)dihydraatti		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Seos: tiobis(4,1-fenyleeni)-S,S,S′,S′-tetrafenyylidisulfoniumbisheksafluorofosfaatti;difenyyli(4-fenyylitiofenyyli)sulfoniumheksa-fluorofosfaatti		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-bis(2,6-di-tert-butyyli-4-metyylifenoksi)-2,4,8,10-tetraoksi-3,9-difosfaspiro[5.5]undekaani		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	3-(hydroksifenyylifosfinyyli)propaanihappo		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601-050-00-1	bentseeni, C_{10}-C_{13}-alkyylijohdannaiset		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-fenyylibut-1-eeni		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
602-083-00-4	difenyylieetteri, pentabromijohdannainen pentabromidifenyylieetteri		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-dikloori-1-fluorietaani		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(fenyylimetoksi)naftaleeni		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
603-129-00-6	1-tert-butoksipropan-2-oli		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603-130-00-1	Isomeerien seos: α-((dimetyyli)bifenyyli)-ω-hydroksipoly(oksietyleeni)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)39-61		
603-131-00-7	(3:1) seos: 1-deoksi-1-[metyyli-(1-oksododekyyli)amino]-D-glusitoli; 1-deoksi-1-[metyyli-(1-oksotetradekyyli)amino]-D-glusitoli		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-132-00-2	2-hydroksimetyyli-9-metyyli-6-(1-metyylietyyli)-1,4-dioksaspiro[4.5]dekaani		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61		
603-133-00-8	Seos; 3-[(4-amino-2-kloori-5-nitrofenyyli)amino]propaani-1,2-dioli;3,3′-(2-kloori-5-nitro-1,4-fenyleenidi-imino)bis(propaani-1,2-dioli)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-36-61		
603-134-00-3	Substituoitujen dodekyyli- ja/tai tetradekyylidifenyylieettereiden seos. Yhdiste tuotetaan käyttäen Friedel Crafts -reaktiota. Katalyytti poistetaan reaktiotuotteesta. Difenyylieetteri substituoidaan C1–C10 alkyyliryhmillä. Alkyyliryhmät ovat sitoutuneet satunnaisesti C1:n ja C6:n välille. Käytetään lineaarisia C12- ja C14-ketjuja suhteessa 50/50.		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bis[[2,2′,2″-nitrilotris(etanolaatto)]-1-N,O]-bis[2-(2-metoksietoksi)etoksi]-titaani		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
603-136-00-4	3-((4-(bis(2-hydroksietyyli)amino)-2-nitrofenyyli)amino)-1-propanoli		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
603-137-00-X	Seos: 1-deoksi-1-[metyyli-(1-oksoheksadekyyli)amino]-D-glusitoli; 1-deoksi-1-[metyyli-(1-okso-oktadekyyli)amino]-D-glusitoli		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-dimetyyli-3-hydroksipropyyli)tolueeni		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
604-050-00-X	4-kloori-*o*-kresoli–4-kloori-2-metyylifenoli		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: T; C; R23-35 10 % ≤ C < 25 %: C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R20-34 3 % ≤ C < 5 %: Xn; R20-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37/38	
604-051-00-5	3,5-bis((3,5-di-tert-butyyli-4-hydroksi)bentsyyli)-2,4,6-trimetyylifenoli		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2′-metyleenibis(6-(2H-bentsotriatsol-2-yyli)-4-(1,1,3,3-tetrametyylibutyyli)fenoli)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-metyyli-4-(1,1-dimetyylietyyli)-6-(1-metyylipentadekyyli)-fenoli		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
604-054-00-1	Seos: 2-metoksi-4-(tetrahydro-4-metyleeni-2H-pyran-2-yyli)-fenoli; 4-(3,6-dihydro-4-metyyli-2H-pyran-2-yyli)-2-metoksifenoli		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
604-055-00-7	2,2′-((3,3′,5,5′-tetrametyyli-(1,1′-bifenyyli)-4,4′-diyyli)-bis(oksimetyleeni))-bis-oksiraani		413-900-7	85954-11-6	Muta.Cat.3; R40	Xn R: 40 S: (2-)22-36-37		
605-027-00-7	Seos: 3a,4,5,6,7,7a-heksahydro-4,7-metaano-1H-indeeni-6-karboksaldehydi; 3a,4,5,6,7,7a-heksahydro-4,7-metaano-1H-indeeni-5-karboksaldehydi		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
606-051-00-0	4-pentyylisykloheksanoni		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-dibutyyliamino)-2-hydroksi-2′-karboksibentsofenoni		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	fluroksipyyri-meptyyli (ISO) [1] fluroksipyyri-butometyyli (ISO) [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
607-273-00-0	ammonium-7-(2,6-dimetyyli-8-(2,2-dimetyylibutyryylioksi)-1,2,6,7,8,8a-heksahydro-1-naftyyli)-3,5-dihydroksiheptanoaatti		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	2-(N-bentsyyli-N-metyyliamino)etyyli-3-amino-2-butenoaatti		405-350-1	54527-73-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-275-00-1	natriumbentsoyylioksibentseeni-4-sulfonaatti		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-276-00-7	bis[(1-metyyli-imidatsoli)-(2-etyyli-heksanoaatti)], sinkkikompleksi		405-635-0	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-277-00-2	Seos: 2-(heksyylitio)etyyliamiinivetykloridi; natriumpropionaatti		405-720-2	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-278-00-8	Isomeerien seos: natriumfenetyylinaftaleenisulfonaatti;natriumnaftyylietyylibentseenisulfonaatti		405-760-0	—	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-279-00-3	Seos: n-oktadekyyliaminodietyylibis(vetymaleaatti);n-oktadekyyliaminodietyylivetymaleaatti-vetyftalaatti		405-960-8	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-280-00-9	natrium-4-kloori-1-hydroksibutaani-1-sulfonaatti		406-190-5	54322-20-2	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)22-26-36/37		
607-281-00-4	Seos: haaroittuneet ja suoraketjuiset C7-C9-alkyyli-3-[3-(2H-bentsotriasol-2-yyli)-5-(1,1-dimetyylietyyli)-4-hydroksifenyyli]propionaatti (C7+ C9 6%, C8 92%)		407-000-3	127519-17-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	2-asetoksimetyyli-4-bentsyylioksibut-1-yyliasetaatti		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
607-283-00-5	E-etyyli-4-okso-4-fenyylikrotonaatti		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	(9:1) seos: natrium-3,3′-(1,4-fenyleenibis(karbonyyli-imino-3,1-propaanidiyyli-imino))bis (10-amino-6,13-dikloori)-4,11-trifenodioksatsiinidisulfonaatti;litium-3,3′-(1,4-fenyleenibis (karbonyyli-imino-3,1-propaanidiyyli-imino))bis(10-amino-6,13-dikloori)-4,11-trifenodioksatsiinidisulfonaatti		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Seos: 7-(((3-aminofenyyli)sulfonyyli)amino)-naftaleeni-1,3–disulfonihappo; natrium-7-(((3-aminofenyyli)sulfonyyli)amino)-naftaleeni-1,3-disulfonaatti,kalium-7-(((3-aminofenyyli)sulfonyyli)amino)-naftaleeni-1,3-disulfonaatti		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-286-00-1	Seos: natrium/kalium-7-[[[3-[[4-((2-hydroksinaftyyli)atso)fenyyli]atso]fenyyli]sulfonyyli]amino]naftaleeni-1,3-disulfonaatti		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-287-00-7	O′-metyyli-O-(1-metyyli-2-metakryylioyylioksi-etyyli)-1,2,3,6-tetrahydroftalaatti		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	Tetranatrium-(c-(3-(1-(3-(e-6-dikloori-5-syanopyrimidiini-f-yyli(metyyli)amino)propyyli)-1,6-dihydro-2-hydroksi-4-metyyli-6-oksi-3-pyridyyliatso)-4-sulfonaattifenyylisulfamoyyli)ftalosyaniini-a,b,d-trisulfonaatto(6-))nikkelaatti II, missä a on 1 tai 2 tai 3 tai 4, b on 8 tai 9 tai 10 tai 11, c on 15 tai 16 tai 17 tai 18, d on 22 tai 23 tai 24 tai 25 ja missä e ja f yhdessä ovat 2 ja 4 tai 4 ja 2		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37-61		
607-289-00-8	3-(3-(4-(2,4-bis(1,1-dimetyylipropyyli)fenoksi)butyyliaminokarbonyyli-4-hydroksi-1-naftalenyyli)tio)propaanihappo		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Seos (ainesuhde tuntematon): ammonium-1-C14-C18-alkyylioksikarbonyyli-2-(3-allyyli-oksi-2-hydroksipropoksikarbonyyli)etaani-1-sulfonaatti; ammonium-2-C14-C18-alkyylioksikarbonyyli-1-(3-allyylioksi-2-hydroksipropoksikarbonyyli))etaani-1-sulfonaatti		410-540-2	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-291-00-9	dodekyyli-ω-(C5/C6-sykloalkyyli) alkyyli-karboksylaatti		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
607-292-00-4	Seos: [1-(metoksimetyyli)-2-(C12-alkoksi)-etoksi]etikkahappo;[1-metoksimetyyli)-2-(C14-alkoksi)-etoksi]etikkahappo		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-293-00-X	Seos: N-aminoetyylipiperatsonium-mono-2,4,6-trimetyylinonyylidifenyylieetteri-di-sulfonaatti;N-aminoetyylipiperatsonium-di-2,4,6-trimetyylinonyylidifenyylieetteri-di-sulfonaatti		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
607-294-00-5	natrium-2-bentsoyylioksi-1-hydroksietaani-sulfonaatti		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-295-00-0	Seos: tetranatrium-fosfonoetaani-1,2-dikarboksylaatti; heksanatrium-fosfonobutaani-1,2,3,4-tetrakarboksylaatti		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-296-00-6	Pentaerytriolin tetraesterit heptaanihapon ja 2-etyyliheksaanihapon kanssa, seos		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	(E-E)-3,3′-(1,4-fenyleenidimetyylideeni)bis-(2-oksobornaani-10-sulfonihappo)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-298-00-7	2-(trimetyyliammonium)etoksikarboksibentseeni-4-sulfonaatti		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-36/37		
607-299-00-2	metyyli-3-(asetyylitio)-2-metyyli-propanaatti		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-300-00-6	trinatrium-[2-(5-kloori-2,6-difluoripyrimidin-4-yyliamino)-5-(b-sulfamoyyli-c,d-sulfonaattoftalosyanin-a-yyli-K4,N29,N30,N31,N32-sulfonyyliamino)bentsoaatto(5-)]kupraatti(II) missä a=1,2,3 tai 4 b=8,9,10 tai 11 c=15,16,17 tai 18 d=22,23,24 tai 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-301-00-1	Seos: dodekaanihappo;dodekaanihapon poly(1-7)laktaattiesterit		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
607-302-00-7	Seos: tetradekaanihappo;tetradekaanihapon poly(1-7)laktaattiesterit		411-910-6	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	1-syklopropyyli-6,7-difluori-1,4-dihydro-4-oksokinoliini-3-karboksyylihappo		413-760-7	93107-30-3	Repr. Cat.3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-kloorifenyyli)-2-fenyyli-2-[(1H-1,2,4-triatsol-1-yyli)metyyli]butaaninitriili		406-140-2	114369-43-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butyyli-N-fenetyyliamino)fenyyli)etyleeni-1,1,2-trikarbonitriili		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis(bentsyylioksi)fenyyliasetonitriili		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	hydratsiini-tri-nitrometaani		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-bromi-1-(2-furyyli)-2-nitroetyleeni		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	(2:1:1) seos: trinatrium-N(1′)-N(2):N(1‴)-N(2″)-η-6-[2-amino-4-(tai 6)-hydroksi-(tai 4-amino-2-hydroksi)fenyyliatso]-6″-(1-karbaniloyyli-2-hydroksiprop-1-enyyliatso)-5′,5‴-disulfamoyyli-3,3″-disulfonaattobis(naftaleen-2,1′-atsobentseeni-1,2′-diolaatto-O(1),O(2′))-kromaatti;trinatrium-N(1′)-N(2):N(1‴)-N(2″)-η-6,6″-bis (1-karbaniloyyli-2-hydroksiprop-1-enyyliatso)-5′,5‴-disulfamoyyli-3,3″-disulfonaattobis(naftaleeni-2,1′atsobentseeni-1,2′-diolaatto-O(1), O(2′))-kromaatti;trinatrium-N(1′)-N(2):N(1‴)-N(2″)-η-6,6″-bis[2-amino-4-(tai 6)-hydroksi-(tai 4-amino-2-hydroksi)fenyyliatso]5′,5‴-disulfamoyyli-3,3″-disulfonaattobis(naftaleeni-2,1′atsobentseeni-1,2′-diolaatto-O(1), O(2′))-kromaatti		402-850-1		Xi; R41 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
611-044-00–0	Seos: tert-alkyyli(C12-C14)ammonium-bis[1-[(2-hydroksi-5-nitrofenyyli)atso]-2-naftalenolaatto(2-)]-kromaatti(1-); tert-alkyyli(C12-C14)ammonium-bis[1-[(2-hydroksi-4-nitrofenyyli)atso]-2-naftalenolaatto(2-)]-kromaatti(1-); tert-alkyyli(C12-C14)ammonium-bis[1-[[5-(1,1-dimetyylipropyyli)-2-hydroksi-3-nitrofenyyli]atso]-2-naftalenolaatto(2-)]-kromaatti(1-); tert-alkyyli(C12-C14)ammonium-[[1-[(2-hydroksi-5-nitrofenyyli)atso]-2-naftalenolaatto(2-)]-[1-[(2-hydroksi-5-nitrofenyyli)atso]-2-naftalenolaatto(2-)]]-kromaatti(1-); tert-alkyyli(C12-C14)ammonium-[[1-[[5-(1,1-dimetyylipropyyli)-2-hydroksi-3-nitrofenyyli]atso]-2-naftalenolaatto(2-)]-[1-[(2-hydroksi-5-nitrofenyyli)atso]-2-naftalenolaatto(2-)]]-kromaati(1-); C12-14-tert-alkyyliammonium((1-(4(tai 5)-nitro-2-oksidofenyyliatso)-2-naftfolaatto)(1-(3-nitro-2-oksido-5-pentyylifenyyliatso)-2-naftolaatto))kromaatti(1-)		403-720-7	117527-94-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-asetoksibutyyli)-N-etyyli]amino-2-metyylifenyyliatso]-3-asetyyli-5-nitrotiofeeni		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4′-diamino-2-metyyliatsobentseeni		407-590-2	43151-99-1	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R50-53	T; N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	(1:1) seos: 2-[[4-[N-etyyli-N-(2-asetoksietyyli)amino]fenyyli]atso]-5,6-diklooribentsotiatsoli;2-[[4-[N-etyyli-N-(2-asetoksietyyli)amino]fenyyli]atso]-6,7-diklooribentsotiatsoli		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	(1:1) seos: 2-[[4-[bis(2-asetoksietyyli)amino]fenyyli]atso]-5,6-diklooribentsotiatsoli;2-[[4-[bis(2-asetoksietyyli)amino]fenyyli]atso]-6,7-diklooribentsotiatsoli		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
611-049-00-8	7-[4-(3-dietyyliaminopropyyliamino)-6-(3-dietyyliammoniopropyyliamino)-1,3,5-triatsin-2-yyliamino]-4-hydroksi-3-(4-fenyyliatsofenyyliatso)-naftaleeni-2-sulfonaatti, etikkahappo, maitohappo (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-(22-36/37-61		
611-051-00-9	2-(4-(N-etyyli-N-(2-hydroksi)etyyli)amino-2-metyylifenyyli)atso-6-metoksi-3-metyyli-bentsotiatsoliumkloridi		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	mononatrium-akva-[5-[[2,4-dihydroksi-5-[(2-hydroksi-3,5-dinitrofenyyli)atso]fenyyli]atso]-2-naftaleenisulfonaatti], rautakompleksi		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Seos: triheksadekyylimetyyliammoniumkloridi;diheksadekyylidimetyyliammoniumkloridi		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
612-157-00-8	(Z)-1-bentso[b]tien-2-yylietanonioksiimihydrokloridi		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	Seos: bis(5-dodekyyli-2-hydroksibentsaldoksimaatti)-kupari (II) C12-alkyyliryhmä on haaroittunut; 4-dodekyylisalisyylialdoksiimi		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Reaktiotuote: trimetyyliheksametyleenidiamiini (seos 2,2,4-trimetyyli-1,6-heksaanidiamiini ja 2,4,4-trimetyyli-1,6-heksaanidiamiini, mainittu EINECS-luettelossa), Epoksidi 8 (mono[(C10-C16-alkyloksi)metyyli]oksiraani-johdannaisia) ja p-tolueenisulfonihappo		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-tert-butyyli-5-(4-tert-butyylibentsyylitio)-4-klooripyridatsiin-3(2H)oni		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25–50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2′-[3,3′-(piperatsiini-1,4-diyyti)dipropyyli]bis(1H-bentsimidatso[2,1-b]bentso[l,m,n][3,8]fenantroliini-1,3,6-trioni		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
613-151-00-8	1-(3-mesyylioksi-5-trityylioksi-2-D-treofuryyli) tymiini		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	fenyyli-N-(4,6-dimetoksipyrimidin-2-yyli)karbamaatti		406-600-2	89392-03-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-triklooripyridiini		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-kloori-6-metoksipyrimidiini		410-050-9	5734-65-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613-155-00-X	5-kloori-2,3-difluoripyridiini		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2-)23-36-61		
613-156-00-5	2-butyyli-4-kloori-5-formyyli-imidatsoli		410-260-0	83857-96-9	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-157-00-0	2,4-diamino-5-metoksimetyylipyrimidiini		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi; R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2-)22-26-36		
613-158-00-6	2,3-dikloori-5-trifluorimetyylipyridiini		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-dimetyylietyyli))fenyyli]etoksi] kinatsoliini		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N; R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
613-160-00-7	(1S)-2-metyyli-2,5-diatsobisyklo[2.2.1] heptaanidivetybromidi		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615-022-00-1	metyyli-3-isosyanaattosulfonyyli-2-tiofeenikarboksylaatti		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2-)22-30-35-36/37		

Indeksinro	Kemikaalin nimi	Huomautukset koskevat aineita	EY-nro	CAS-nro	Luokitus	Merkinnät	Pitoisuusrajat	Huomautukset koskevat seoksia
615-023-00-7	2-(isosyanaattosulfonyylimetyyli)bentsoehapon metyyliesteri		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. Cat.3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2-)23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-dikloori-4-etyyli-2-hydroksifenyyli)-2-(3-pentadekyylifenoksi)-butaaniamidi		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2′-(4-kloori-3-syano-5-formyyli-2-tienyyliatso)-5′-dietyyliamino-2-metoksiasetanilidi		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-kloori-7-metyylipyratsoli(1,5-b)-1,2,4-triatsol-4-yyli)propyyli)-2-(2,4-di-tert-pentyylifenoksi)oktanamidi		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	Seos: 2,2′,2″,2‴-(etyleenidinitrilotetrakis-N,N-di(C16)alkyyliasetamidi; 2,2′,2″,2‴-(etyleenidinitrilotetrakis-N,N-di(C18) alkyyliasetamidi		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616-048-00-6	3′-trifluorimetyyli-isobutyranilidi		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-bis(1,1-dimetyylietyyli)fenoksi)-N-(3,5-dikloori-4-etyyli-2-hydroksifenyyli)-heksaaniamidi		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-dikloori-4-(1,1,2,3,3,3-heksafluoripropoksi)-fenyyli-aminokarbonyyli]-2,6-difluoribentsamidi		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
616-051-00-2	Seos: 2,4-bis(N′-(4-metyylifenyyli)-ureido)-tolueeni; 2,6 -bis(N′-(4-metyylifenyyli)-ureido)-tolueeni		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	bis(4-metyylibentsoyyli)peroksidi		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2-)7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	syprokonatsoli (ISO) (2*RS*,3*RS*;2*RS*,3*SR*)-2-(4- kloorifenyyli)-3-syklopropyyli-1-(1*H*-1,2,4-triatsol-1-yyli)butan-2-oli		—	94361-06-5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2-)36/37-60-61		

LIITE 2

R 66

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

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske DE toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

(Ei koske SV toisintoa)

LIITE 3A

S 23

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

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske DE toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske IT toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

(Ei koske SV toisintoa)

S 26

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

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske IT toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

(Ei koske SV toisintoa)

S 56

DE: Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

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

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

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

(Ei koske SV toisintoa)

LIITE 3B

S 27/28

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

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske IT toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

(Ei koske SV toisintoa)

S 29/56

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

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

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

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

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

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

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

LIITE 4A

"B.10. MUTAGEENISUUS — KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKÄSSOLUILLA *IN VITRO*

1 **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

In vitro -kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa aineet, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkässoluissa (1) (2) (3). Rakenteelliset poikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, mutta myös kromosomityyppisiä poikkeavuuksia esiintyy. Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että kemiallinen aine voi aiheuttaa numeerisia poikkeavuuksia. Tätä menetelmää ei ole kuitenkaan suunniteltu numeeristen poikkeavuuksien mittaamiseen, eikä sitä käytetä rutiininomaisesti tähän tarkoitukseen. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat, jotka aiheuttavat muutoksia somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä, ovat osallisina syövän synnyssä ihmisillä ja koe-eläimillä.

In vitro -kromosomipoikkeavuustestissä voidaan käyttää pysyvien solulinjojen viljelmiä, solukantoja tai primaarisia soluviljelmiä. Käytettävien solujen valintakriteerejä ovat solujen kasvukyky viljelmässä, karyotyypin pysyvyys, kromosomiluku, kromosomien diversiteetti ja kromosomipoikkeavuuksien spontaanifrekvenssi.

In vitro -testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiota. Tällainen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei pysty täysin jäljittelemään *in vivo* -olosuhteita nisäkkäissä. On pyrittävä välttämään erityisesti sellaisia olosuhteita, joissa saatavat positiiviset tulokset eivät heijasta aineen luontaista mutageenisuutta ja saattavat johtua pH:n muutoksista, osmolaliteetista tai voimakkaasta sytotoksisuudesta (4) (5).

Tätä testiä käytetään nisäkkäiden mahdollisten mutageenien ja karsinogeenien seulontaan. Monet yhdisteet, joilla saadaan positiivinen tulos tässä testissä, ovat nisäkkäiden karsinogeeneja. Tämän testin ja karsinogeenisuuden välillä ei ole kuitenkaan täydellistä korrelaatiota. Korrelaatio riippuu kemiallisista ominaisuuksista, ja yhä useammat tutkimustulokset viittaavat siihen, että on olemassa karsinogeeneja, joita ei voida havaita tällä testillä, koska ne näyttävät vaikuttavan muiden mekanismien kuin suoran DNA-vaurion välityksellä.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2. MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleen yhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleen yhtymisenä samassa kohdassa.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen tuma ei etene mitoosiin vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, … kromatidia.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidin (kromatidien) siirtymä.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafaasissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Numeerinen poikkeavuus: käytetyille soluille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (*n*) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä (3*n*, 4*n* jne.).

Rakenteellinen poikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Soluviljelmät altistetaan tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Kun soluviljelmät on altistettu tutkittavalle aineelle, ne käsitellään etukäteen määrätyin välein metafaasin pysäyttävällä aineella (esim. Colcemid® tai kolkisiini), solut kerätään ja värjätään, ja metafaasissa olevat solut analysoidaan mikroskooppisesti kromosomipoikkeavuuksien havaitsemiseksi.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Solut*

Testissä voidaan käyttää eri solulinjoja, solukantoja tai primaarisia soluviljelmiä, myös ihmisen soluja (esim. kiinanhamsterin fibroblasteja, ihmisen tai muun nisäkkään perifeerisen veren lymfosyyttejä).

1.4.1.2 *Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet*

Soluviljelmien ylläpidossa on käytettävä soveltuvia kasvatusalustoja ja inkubaatio-olosuhteita (kasvatusastiat, CO_2-pitoisuus, lämpötila ja kosteus). Pysyvistä solulinjoista ja kannoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja mahdollinen mykoplasmakontaminaatio. Kontaminoituneita viljelmiä ei pidä käyttää. Solujen normaali solusyklin kesto ja käytetyt viljelyolosuhteet on tunnettava.

1.4.1.3 *Soluviljelmien valmistelu*

Pysyvät solulinjat ja solukannat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä, kylvetään kasvatusväliaineeseen sellaiseen tiheyteen, että soluviljelmät eivät saavuta konfluenttisuutta ennen solujen keräämisajankohtaa, ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

Lymfosyytit: antikoagulanteilla (esim. hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai terveiltä luovuttajilta saatuja erotettuja lymfosyyttejä lisätään mitogeenia (esim. fytohemagglutiniinia) sisältävään kasvatusväliaineeseen ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

1.4.1.4 *Metabolinen aktivaatio*

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (6) (7) (8) (9) tai fenobarbitonin ja β-naftoflavonin (10) (11) (12) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria.

Postmitokondriaalisen jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue lopullisessa testiväliaineessa 1—10 % v/v. Metabolinen aktivaatiojärjestelmä voi vaihdella sen mukaan, mihin kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. Joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampaa kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta.

Monilla kehitetyillä menetelmillä, kuten yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetuilla solulinjoilla, joissa ilmentyy spesifisiä aktivaatioentsyymejä, saattaa olla endogeenista aktivaatiovaikutusta. Käytettyjen solulinjojen valinnan on oltava tieteellisesti perusteltua (esim. sytokromi P450 -isoentsyymin merkitys tutkittavan aineen metabolialle).

1.4.1.5 *Tutkittava aine / valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen solujen käsittelyä. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikuttaa solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä. Vesi voidaan poistaa lisäämällä molekyylisiivilä.

1.4.2.2 *Altistuspitoisuudet*

Huomioonotettavia kriteerejä suurinta pitoisuutta määritettäessä ovat sytotoksisuus, liukoisuus testijärjestelmään ja pH:n tai osmolaliteetin muutokset.

Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solujen eheyden ja solukasvun indikaattoreita, kuten konfluenttisuuden astetta, elinkykyisten solujen määrää tai mitoosi-indeksiä. Sytotoksisuus ja liukoisuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavassa kokeessa.

Vähintään kolmea analysoitavissa olevaa pitoisuutta on käytettävä. Mikäli sytotoksisuutta esiintyy, näiden pitoisuuksien on katettava alue, jossa suurimmalla pitoisuudella on maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta, mikä tarkoittaa yleensä sitä, että pitoisuudet voivat poiketa toisistaan enintään kertoimella 2—$\sqrt{10}$. Solujen keräämisajankohtana suurimpaan pitoisuuteen tulisi liittyä merkittävä konfluenttisuuden asteen, solumäärän tai mitoosi-indeksin pieneneminen (kaikkien osalta yli 50 %). Mitoosi-indeksi on vain epäsuora sytotoksisten/sytostaattisten vaikutusten mitta, ja se riippuu altistuksesta kuluneesta ajasta. Mitoosi-indeksi hyväksytään kuitenkin suspensioviljelmissä, joissa muiden myrkkyvaikutusta mittaavien menetelmien käyttö saattaa olla hankalaa ja epäkäytännöllistä. Tietoja solusyklin kinetiikasta, kuten keskimääräistä generaatioaikaa (average generation time, AGT), voidaan käyttää täydentävinä tietoina. AGT on kuitenkin yleinen keskiarvo, joka ei aina paljasta hidastuneiden alapopulaatioiden olemassaoloa, ja vähäinenkin generaatioajan piteneminen voi siirtää poikkeavuuksien optimaalista toteamisaikaa hyvinkin paljon myöhemmäksi.

Soluille suhteellisen myrkyttömiä aineita tutkittaessa suurimman testattavan pitoisuuden on oltava 5 μl/ml, 5 mg/ml tai 0,01 M, sen mukaan, mikä näistä pitoisuuksista on pienin.

Testattaessa huonosti veteen liukenevia aineita, jotka ovat myrkyttömiä liukenemattoman pitoisuuden alittavina pitoisuuksina, suurimman käytetyn annoksen aikaansaaman pitoisuuden on ylitettävä liukoisuusraja lopullisessa kasvatusväliaineessa altistusjakson lopussa. Joissakin tapauksissa (esim. kun myrkkyvaikutus todetaan ainoastaan pienimmän liukenemattoman pitoisuuden ylittävillä pitoisuuksilla) on suositeltavaa testata useampia kuin yksi pitoisuus, jossa havaitaan näkyvää saostumista. Liukoisuus kannattaa arvioida sekä käsittelyn alussa että lopussa, sillä se voi muuttua koejärjestelmässä altistuksen aikana esimerkiksi solujen, S9:n, seerumin ym. vaikutuksesta. Liukenemattomuus voidaan havaita paljaalla silmällä. Sakan ei pitäisi vaikuttaa laskentaan.

1.4.2.3 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

Jokaisessa kokeessa on käytettävä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontrolleja, sekä metabolisen aktivaation läsnäollessa että ilman sitä. Metabolista aktivaatiota käytettäessä positiivisena kontrollina on käytettävä sellaista kemiallista ainetta, joka vaatii aktivaatiota mutageenisen vasteen aikaansaamiseksi.

Positiivisina kontrolliaineina on käytettävä tunnettua klastogeenia altistustasoina, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa olevan lisääntymisen taustaan verrattuna, mikä osoittaa koejärjestelmän herkkyyden.

Positiivisen kontrolliaineen pitoisuudet on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Metabolinen aktivaatio	Aine	CAS nro	EINECS nro
Ei eksogeenista metabolista aktivaatiota	metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3	200-625-0
	etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
	etyylinitrosourea	759-73-9	212-072-2
	mitomysiini C	50-07-7	212-072-2
	4-nitrokinoliini-*N*-oksidi	56-57-5	200-281-1
Eksogeeninen metabolinen aktivaatio	Bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5
	syklofosfamidi syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvan positiivisen kemiallisen kontrolliaineen käyttöä on harkittava, mikäli tällainen aine on käytettävissä.

Jokaisena solujen keräämisajankohtana on otettava näytteet myös negatiivisista kontrolleista, jotka koostuvat tutkittavaa ainetta sisältävässä kasvatusväliaineessa olevasta liuottimesta tai pelkästä kantaja-aineesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä. Lisäksi on käytettävä myös käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat tiedot kontrollista osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.4.3 **Testin suorittaminen**

1.4.3.1 *Altistaminen tutkittavalle aineelle*

Lisääntyvät solut altistetaan tutkittavalle aineelle metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa ja ilman sitä. Lymfosyyttien altistus on aloitettava noin 48 tunnin kuluttua mitogeenisesta stimulaatiosta.

1.4.3.2 Normaalisti jokaisesta pitoisuudesta tulisi tehdä kaksi rinnakkaista viljelmää, ja niiden käyttöä suositellaan erityisesti negatiivisissa/liuotinkontrolliviljelmissä. Mikäli aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että rinnakkaisviljelmien välillä on vain hyvin vähäisiä eroja (13) (14), yhden viljelyn käyttö kustakin pitoisuudesta saattaa olla hyväksyttävää.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita on testattava asianmukaisilla menetelmillä, kuten suljetuissa kasvatusastioissa (15) (16).

1.4.3.3 *Näytteiden keräämisajankohdat*

Ensimmäisessä kokeessa soluja on altistettava tutkittavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä 3—6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua altistuksesta (12). Jos tässä menettelyssä saadaan negatiiviset tulokset sekä metabolisen aktivaation läsnäollessa että ilman sitä, on tehtävä uusi testi ilman aktivaatiota, ja altistusta on jatkettava yhtäjaksoisesti siihen asti, kun näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalia solusykliä vastaavan ajan kuluttua. Tietyt kemialliset aineet saatetaan havaita helpommin, kun altistus/näytteenottoaika on pitempi kuin 1,5 solusykliä. Metabolisen aktivaation läsnäollessa saadut negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista pidetä tarpeellisena, perustelut on esitettävä.

1.4.3.4 *Kromosomipreparaatti*

Soluviljelmiä käsitellään Colcemid®illa tai kolkisiinilla yleensä 1—3 tunnin ajan ennen näytteiden keräämistä. Jokaisen viljelmän näytteet kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaattien valmistusta varten. Kromosomipreparaattien valmistukseen kuuluu solujen hypotoninen käsittely, fiksointi ja värjäys.

1.4.3.5 *Analyysi*

Kaikki objektilasit, myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska fiksaatio johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja kromosomien menettämiseen, lasketuissa soluissa tulisi olla sentromeerejä modaalista lukumäärää vastaava määrä ± 2 kaikissa solutyypeissä. Kustakin pitoisuudesta ja kontrollista olisi laskettava vähintään 200 hyvin levinnyttä metafaasia, jotka jakautuvat tasaisesti rinnakkaisviljelmien kesken, mikäli niitä käytetään. Lukumäärää voidaan pienentää, mikäli aberraatioita todetaan runsaasti.

Vaikka testillä pyritään ensisijaisesti toteamaan rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet, on tärkeää rekisteröidä myös polyploidia ja endoreduplikaatio, mikäli näitä esiintyy.

2 TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Kokeellinen yksikkö on solu, joten on arvioitava niiden solujen prosentuaalinen määrä, joissa on rakenteellinen kromosomipoikkeavuus (poikkeavuuksia). Eri tyyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava ja niiden lukumäärät ja esiintymistaajuudet altistetuissa viljelmissä ja kontrolliviljelmissä on mainittava. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan poikkeavuuksien kokonaistaajuuteen.

Lisäksi on rekisteröitävä kaikissa testiviljelmissä ja negatiivisissa kontrolliviljelmissä tehdyt samanaikaiset sytotoksisuusmittaukset pääasiallisissa kromosomipoikkeavuustesteissä.

Tulokset on ilmoitettava kutakin viljelmää kohti. Lisäksi on esitettävä yhteenveto kaikista tiedoista taulukkomuodossa.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa. Negatiivisten tulosten vahvistamisen tarvetta on käsitelty kohdassa 1.4.3.3. Jatkokokeissa on harkittava tutkimusparametrien modifiointia arvioitavien olosuhteiden laajentamiseksi. Mahdollisia modifioitavia tutkimusparametrejä ovat pitoisuusvälit ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisten tulosten määrittämiseen on useita kriteerejä, kuten kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän lisääntyminen, joka on riippuvainen tutkittavan aineen pitoisuudesta tai on toistettavissa. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (3) (13). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Polyploidisten solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine pystyy estämään mitoottisia prosesseja ja aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia. Endoreduplikoituneita kromosomeja sisältävien solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine kykenee pysäyttämään solusyklin etenemisen (17) (18).

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä koejärjestelmässä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

In vitro -kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa rakenteelisia kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkkäiden somaattisissa soluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia viljellyissä nisäkkäiden somaattisissa soluissa.

3 **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Solut:

— solutyyppi ja solujen lähde,

— karyotyypin ominaisuudet ja käytetyn solutyypin soveltuvuus,

— mykoplasman puuttuminen, tarvittaessa,

— tiedot solusyklin pituudesta,

— verenluovuttajien sukupuoli, kokoveri vai eristetyt lymfosyytit, käytetty mitogeeni,

— siirtojen lukumäärä, tarvittaessa,

— soluviljelmän ylläpitomenetelmät, tarvittaessa,

— kromosomien modaalinen lukumäärä.

Koeolosuhteet:

— metafaasin estämiseen käytetty aine, sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto,

— pitoisuuksien ja soluviljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esim. sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset, mikäli tiedot ovat käytettävissä,

— kasvatusväliaineen koostumus, CO_2-pitoisuus, tarvittaessa,

— tutkittavan aineen pitoisuus,

— lisätyn kantaja-aineen ja tutkittavan aineen määrä,

— inkubaatiolämpötila,

— inkubaatioaika,

— altistuksen kesto,

— solutiheys kylvämisen aikana, tarvittaessa,

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, myös sen hyväksyttävyyskriteerit,

— positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— objektilasien valmistelumenetelmät,

— kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit,

— analysoitujen metafaasien lukumäärä,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— positiivisten, negatiivisten tai epäselvien tulosten kriteerit.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit, esim. konfluenttisuuden aste, solusykliä koskevat tiedot, solumäärät, mitoosi-indeksi,

— saostumisen merkit,

— tiedot tutkittavaa ainetta sisältävän kasvatusväliaineen pH:sta ja osmolaliteetista, jos määritetty,

— kromosomipoikkeavuuksien, myös aukkojen, määrittely (gaps),

— kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ilmoitetaan kunkin altistetun viljelmän ja kontrolliviljelmän osalta erikseen,

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollien tulokset,

— aikaisemmat tutkimustulokset negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

(1) Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A., (ed) Plenum Press, New York and London, s. 1–29.

(2) Ishidate, M.Jr. and Sofumi, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, s. 427–432.

(3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environs, Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), s. 1–175.

(4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, s. 147–204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, s. 297–305.

(6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, s. 347–364.

(7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, s. 173–215.

(8) Natarajan, A.T., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, s. 83–90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, s. 277–290.

(10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 175–177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A. Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F.J. Fouts, J.R. Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

(12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994). Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, s. 241–261.

(13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 141–154.

(14) Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994), replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, s. 139–149.

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

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

(17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, s. 403–413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983), Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, s. 1362–1364."

LIITE 4B

"B.11 MUTAGEENISUUS — KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKKÄIDEN LUUYTIMESSÄ *IN VIVO*

1 MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäillä *in vivo* tehtävää kromosomipoikkeavuustestiä käytetään tutkittavan aineen aiheuttamien rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien osoittamiseen nisäkkäiden, yleensä jyrsijöiden, luuydinsoluissa (1) (2) (3) (4). Rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että kemiallinen aine voi aiheuttaa numeerisia poikkeavuuksia. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, mutta myös kromosomityyppisiä mutaatioita esiintyy. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että kromosomimutaatiot ja niihin liittyvä tapahtumat, jotka aiheuttavat muutoksia somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä, ovat osallisina syövän synnyssä ihmisillä ja kokeellisissa järjestelmissä.

Tässä testissä käytetään rutiinimaisesti jyrsijöitä. Luuydin on tämän testin kohdekudos, sillä sen verisuonitus on hyvin runsasta ja se sisältää solupopulaation, jonka solusykli on nopea ja joka on helppo eristää ja prosessoida. Tätä menetelmää ei käytetä muilla lajeilla eikä muissa kohdekudoksissa.

Tämä kromosomipoikkeavuustesti soveltuu erityisesti mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin, joskin näissä saattaa esiintyä eroja lajien ja kudosten välillä. *In vivo* -testiä voidaan käyttää myös *in vitro* -testissä havaitun mutageenisen vaikutuksen jatkotutkimuksena.

Jos on saatu viitteitä siitä, ettei tutkittava aine tai sen reaktiivinen metaboliitti pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen jälkeen tuma ei etene mitoosiin vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, … kromatidia.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidin (kromatidien) siirtymä

Numeerinen poikkeavuus: käytetyille soluille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (*n*) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä (3*n*, 4*n* jne.).

Rakenteellinen poikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esim. kolkisiinia tai Colcemid®ia). Tämän jälkeen luuydinsoluista tehdään kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevien solujen kromosomipoikkeavuudet analysoidaan.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Eläinlajien valinta*

Yleisesti käytettyjä eläinlajeja ovat rotta, hiiri ja kiinanhamsteri, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä aikuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa, mutta kosteustavoitteen on oltava 50—60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret aikuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan.

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmistettava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan kumpaakin sukupuolta olevat rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa rakenteellisia poikkeavuuksia *in vivo* altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan poikkeavuuksien havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Positiivisten kontrollien annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien iden-

titeettiä. Positiivinen kontrolli voidaan antaa eri reittiä kuin tutkittava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
Etyylinitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
Syklofosfamidi Syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietyleenimelamiini	51–18–3	200-083-5

Pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta saaneista negatiivisista kontrolleista, joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenottokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuudessa ovat hyväksyttävällä tasolla. Jos negatiivisista kontrolleista otetaan vain yksi näyte, se tulisi ottaa ensimmäisellä näytteenottokerralla. Lisäksi on käytettävä myös käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleilla aikaisemmin tehdyt tutkimukset tai julkaistut tulokset osoittavat, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa eläintä kumpaakin sukupuolta. Vain toista sukupuolta voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla samaa altistusreittiä käyttäen tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavat aineet tulisi antaa mieluiten kerta-annoksena. Ne voidaan kuitenkin antaa myös jaettuina annoksina, eli kahtena altistuksena saman päivän aikana vain muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista. Muut annosteluohjelmat on perusteltava tieteellisesti.

Näytteet on otettava kahtena ajankohtana saman päivän aikana altistuksen jälkeen. Jyrsijöillä ensimmäisen näytteenottovälin pituus on 1,5 normaalia solusykliä (solusyklin pituus on normaalisti 12—18 tuntia) altistuksen jälkeen. Koska tutkittavan aineen soluunottoon ja metaboloitumiseen kuluva aika ja sen vaikutus solusyklin kinetiikkaan voi muuttaa kromosomipoikkeavuuksien optimaalista havaitsemisajankohtaa, myöhempi näyte tulisi kerätä 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä näytteestä. Jos tutkittavaa ainetta annetaan pitempään kuin yhden päivän ajan, yksi näyte on otettava 1,5 normaalin solusyklin kuluttua viimeisestä altistusajankohdasta.

Ennen lopettamista eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos ainetta, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esim. Colcemid®ia tai kolkisiinia). Eläimistä otetaan näytteet sopivan ajan kuluttua tämän jälkeen. Hiirillä tämä väli on noin 3—5 tuntia; kiinanhamstereilla se on noin 4—5 tuntia. Solut kerätään luuytimestä ja analysoidaan kromosomipoikkeavuuksien toteamiseksi.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (5). Mikäli myrkkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostasoa. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaa annosteluohjelmaa käytettäessä suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit) saattavat edellyttää toisenlaisia annoksenmäärityskriteerejä, ja niitä pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia luuytimessä (esim. mitoosi-indeksi pienenee yli 50 %).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivän aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Pitempään kestävissä tutkimuksissa raja-annos on 2 000 mg painokiloa kohti vuorokaudessa, jos altistusta jatketaan enintään 14 vuorokautta, ja 1 000 mg/kg/vrk, jos altistus kestää yli 14 vuorokautta. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Kromosomipreparaatin valmistus**

Luuydintä kerätään heti eläinten lopettamisen jälkeen, käsitellään hypotonisella liuoksella ja fiksoidaan. Tämän jälkeen solut levitetään objektilaseille ja värjätään.

1.5.7 **Analyysi**

Mitoosi-indeksi on määritettävä sytotoksisuuden mittana vähintään 1 000 solusta eläintä kohti kaikista tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä (myös positiivisista kontrolleista) ja altistamattomista negatiivisista kontrollieläimistä.

Jokaisesta eläimestä on analysoitava vähintään 100 solua. Määrä voi olla pienempi, mikäli havaitaan runsaasti poikkeavuuksia. Kaikki objektilasit, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska objektilasien valmistelu johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja kromosomien menettämiseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua $2n \pm 2$.

2 **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Yksittäisten eläinten tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Jokaisesta eläimestä on arvioitava laskettujen solujen lukumäärä poikkeavuuksien lukumäärä solua kohti ja niiden solujen prosentuaalinen osuus, joissa on yksi tai useampia rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia. Eri tyyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava ja niiden lukumäärä ja esiintymistaajuus on ilmoitettava koe- ja kontrolliryhmien osalta. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan, mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuteen. Ellei viitteitä sukupuolten välisistä vasteeroista ole havaittavissa, molempien sukupuolten tiedot voidaan yhdistää tilastollista analyysiä tehtäessä.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen suhteellisen lukumäärän annoksesta riippuva suureneminen tai kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisessä annosryhmässä yhdellä näytteenottokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (6). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine pystyy aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia. Endoreduplikaation lisääntyminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine kykenee pysäyttämään solusyklin etenemisen (7) (8).

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi tehtyjen kokeiden lukumäärästä riippumatta.

In vivo -kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen (esim. systeeminen toksisuus) on pohdittava.

3 **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Koeolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit,

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— annostasojen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— antotavan valintaperusteet,

— menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen, tarvittaessa,

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk), tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenkeräysohjelmasta,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— metafaasin pysäyttämisessä käytetty aine, sen pitoisuus ja käsittelyn kesto,

— objektilasien valmistusmenetelmät,

— kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit,

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti,

— kriteerit, joiden perustella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— mitoosi-indeksi,

— kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen,

— kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat,

— kromosomipoikkeavuuksia sisältäneiden solujen lukumäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat,

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisen negatiivisen kontrollin tulokset,

— aikaisemmat negatiivisesta kontrollista saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— rinnakkaisen positiivisen kontrollin tulokset.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4 KIRJALLISUUTTA

(1) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J.M. Parry (eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., s. 275–306.

(2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, s. 157–165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D.J. Kirkland (Ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

(4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, s. 312, 305–312.

(5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 313–319.

(6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge, s. 184–232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, s. 403–413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, s. 1362–1364."

LIITE 4C

”B.12 MUTAGEENISUUS — MIKROTUMATESTI NISÄKKÄÄN PUNASOLUISSA *IN VIVO*

1 MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäiden *in vivo* -mikrotumatestiä käytetään tutkittavan aineen aiheuttamien kromosomivaurioiden tai mitoosilaitteen vaurioiden toteamiseen erytroblasteissa analysoimalla eläinten, yleensä jyrsijöiden, luuytimestä kerättyjä punasoluja ja/tai perifeerisiä verisoluja.

Mikrotumatestin tarkoituksena on tunnistaa sellaisia sytogeneettisiä vaurioita aiheuttavat aineet, jotka johtavat hitaasti liikkuvia (lagging) kromosomifragmentteja tai kokonaisia kromosomeja sisältävien mikrotumien muodostumiseen.

Kun luuytimen erytroblasti kehittyy polykromaattiseksi punasoluksi, päätuma irtoaa solusta, ja mahdollinen muodostunut mikrotuma saattaa jäädä muutoin tumattomaan solulimaan. Päätuman puuttuminen helpottaa mikrotumien havaitsemista näissä soluissa. Mikrotumaisten polykromaattisten punasolujen suurentunut esiintymistaajuus altistetuilla eläimillä on osoitus tutkittavan aineen aiheuttamasta kromosomivauriosta.

Tässä testissä käytetään rutiinimaisesti jyrsijöiden luuydintä, sillä polykromaattiset punasolut muodostuvat luuytimessä. Mikrotumaiset epäkypsät (polykromaattiset) punasolut voidaan mitata yhtä hyvin perifeerisestä verestä miltä tahansa eläinlajilta, jonka perna ei kykene poistamaan mikrotumaisia punasoluja tai jonka on todettu olevan riittävän herkkä rakenteellisia tai numeerisia kromosomipoikkeavuuksia aiheuttavien aineiden osoittamiseen. Mikrotumien erottamisessa voidaan käyttää useita kriteerejä. Näitä ovat kinetokorin tai sentromeerisen DNA:n osoittaminen mikrotumissa tai puuttuminen niistä. Mikrotumaisten epäkypsien (polykromaattisten) punasolujen esiintymistaajuus on pääasiallinen tulos. Perifeerisen veren kypsien (normokromaattisten) punasolujen lukumäärää, jossa esiintyy mikrotumia tietyssä määrässä kypsiä punasoluja, voidaan myös käyttää analyysin tuloksena, kun eläimet saavat tutkittavaa ainetta jatkuvasti vähintään 4 viikon ajan.

Tämä nisäkkäiden *in vivo* -mikrotumatesti soveltuu erityisesti mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin, joskin näissä saattaa esiintyä eroja eri lajeilla, eri kudoksissa ja geneettisissä tuloksissa. *In vivo* -analyysi on hyödyllinen myös *in vitro* -koejärjestelmässä havaitun mutageenisen vaikutuksen jatkotutkimuksena.

Jos on saatu viitteitä siitä, että testattava aine, tai sen reaktiivinen metaboliitti, ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Sentromeeri (kinetokori): Kromosomin alue (alueita), joihin sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärkromosomien järjestäytynyt siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Mikrotumat: Pieniä solun päätumasta erillisiä ja niiden rinnalla esiintyviä tumia, jotka muodostuvat mitoosin (meioosin) telofaasin aikana hitaasti liikkuvista (lagging) kromosomikappaleista tai kokonaisista kromosomeista.

Normokromaattinen punasolu: Kypsä punasolu, josta puuttuvat ribosomit ja joka voidaan erottaa polykromaattisista punasolujen esiasteista ribosomiselektiivisillä väriaineilla.

Polykromaattinen punasolu: Punasolun esiaste, kehityksen välivaiheessa oleva (epäkypsä) punasolu, jossa on edelleen ribosomeja ja joka voidaan tämän perusteella erottaa kypsistä, normokromaattisista punasoluista ribosomiselektiivisillä väriaineilla.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle sopivaa antotapaa käyttäen. Jos käytetään luuydintä, eläimet lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta, luuydin poistetaan ja preparaatit valmistetaan ja värjätään (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Käytettäessä perifeeristä verta verinäytteet otetaan sopivina ajankohtina altistuksen jälkeen, tehdään sivelyvalmisteet ja värjätään (4) (8) (9) (10). Perifeeristä verta käyttävissä tutkimuksissa viimeisen altistuksen ja solujen keräämisen välisen ajan tulisi olla mahdollisimman lyhyt. Preparaatit analysoidaan mikrotumien toteamiseksi.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Luuydintä käytettäessä hiiret tai rotat ovat suositeltavia koe-eläimiä, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Perifeerisestä verestä tehtävissä tutkimuksissa koe-eläimiksi suositellaan hiiriä. Koe-eläimenä voidaan kuitenkin käyttää mitä tahansa sopivaa nisäkäslajia, jonka perna ei poista mikrotumaisia punasoluja tai jonka on osoitettu olevan riittävän herkkä rakenteellisia tai numeerisia poikkeavuuksia aiheuttavien aineiden toteamiseen. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä eläimiä. Tutkimuksen alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa mainitut, mutta kosteustavoitteen on oltava 50—60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret aikuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä.

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan kumpaakin sukupuolta olevat rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa mikrotumia *in vivo* altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Positiivinen kontrolliaine voidaan antaa eri reittiä pitkin kuin tutkittava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmän kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
N-etyyli-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
Syklofosfamidi Syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietyleenimelamiini	51–18–3	200-083-5

Negatiivisista kontrolleista, jotka ovat saaneet pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenottokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut mikrotumia sisältävien solujen esiintymistaajuudessa ovat hyväksyttävällä tasolla. Jos negatiivisista kontrolleista otetaan vain yksi näyte, se tulisi ottaa ensimmäisellä näytteenottokerralla. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat kontrolleista tehdyt tutkimukset ja julkaistut tulokset osoittavat, ettei valittu liuotin/kantaja-aine aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

Jos käytetään perifeeristä verta, rinnakkaiseksi negatiiviseksi kontrolliksi voidaan hyväksyä myös ennen altistusta otettu näyte, mutta vain lyhytaikaisissa perifeerisestä verestä tehtävissä testeissä (esim. 1—3 altistusta), mikäli saadut tulokset ovat aikaisempiin kontrollista saatuihin tutkimustuloksiin perustuvalla odotetulla alueella.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa eläintä kumpaakin sukupuolta (11). Vain toista sukupuolta voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla ja samaa antoreittiä käyttämällä tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Mitään standardia altistusohjelmaa (kuten 1, 2 tai useampia altistuksia 24 tunnin välein) ei voida suositella. Pitempien altistusohjelmien aikana kerätyt näytteet ovat hyväksyttäviä, mikäli positiivinen vaikutus on osoitettu tässä tutkimuksessa tai negatiivisessa tutkimuksessa on osoitettu myrkkyvaikutusta tai raja-annosta on käytetty ja annostelua on jatkettu näytteenoton ajankohtaan asti. Tutkittavat aineet voidaan antaa myös jaettuina annoksina, eli kaksi altistuskertaa samana päivänä muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista.

Testi voidaan tehdä kahdella tavalla:

a) Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle yhden kerran. Luuydinnäytteitä otetaan vähintään kaksi kertaa siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 24 tunnin kuluttua altistuksesta ja viimeinen viimeistään 48 tunnin kuluttua altistuksesta ja näytteenottokertojen välillä on sopiva väli. Mikäli näytteitä otetaan aikaisemmin kuin 24 tunnin kulutta, perustelut on esitettävä. Perifeerisestä verestä otetaan näytteitä

vähintään kaksi kertaa siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 36 tunnin kuluttua altistuksesta ja seuraavat sopivan ajan kuluttua siitä, kuitenkin viimeistään 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Mikäli positiivinen vaste havaitaan yhden näytteenottokerran jälkeen, lisänäytteitä ei tarvita.

b) Jos päivittäisiä altistuskertoja on 2 tai enemmän (esim. kaksi tai useampia altistuksia 24 tunnin välein), näytteet on kerättävä luuytimestä kerran 18—24 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta ja perifeerisestä verestä kerran 36—48 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta (12).

Tarvittaessa voidaan näytteitä ottaa muinakin ajankohtina.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (13). Mikäli myrkkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostasoa. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaa annosteluohjelmaa käytettäessä suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit) saattavat edellyttää toisenlaisia annoksenmäärityskriteerejä, ja niitä pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia luuytimessä (esim. punasolujen esiasteiden osuuden pieneneminen punasolujen kokonaismäärästä luuytimessä tai perifeerisessä veressä).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivän aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Pitempään kestävissä tutkimuksissa raja-annos on 2 000 mg painokiloa kohti vuorokaudessa, jos altistusta jatketaan enintään 14 vuorokautta, ja 1 000 mg/kg/vrk, jos altistus kestää yli 14 vuorokautta. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Luuydin-/veripreparaatit**

Luuydinsolut kerätään yleensä reisiluista tai sääriluista heti koe-eläinten lopettamisen jälkeen. Solut otetaan reisi- tai sääriluista, niistä tehdään preparaatit ja ne värjätään vakiintuneilla värjäysmenetelmillä. Perifeerinen veri kerätään häntälaskimosta tai muusta sopivasta verisuonesta. Verisolut värjätään heti supravitaaliväreillä (8) (9) (10) tai niistä tehdään ensin sivelyvalmisteet ja värjätään sen jälkeen. DNA-spesifisten väriaineiden käyttö [esim. akridiinioranssi (14) tai Hoechst 33258 plus pyroniini-Y (15)] voi eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Tämä etu ei sulje pois tavanomaisten väriaineiden (esim. Giemsa) käyttöä. Myös muita järjestelmiä [esim. selluloosapylväitä tumallisten solujen poistamiseksi (16)] voidaan käyttää, mikäli nämä menetelmät on laboratoriossa osoitettu riittävän toimiviksi mikrotumapreparaattien valmistamisessa.

1.5.7 **Analyysi**

Punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä (esiasteet + kypsät punasolut) määritetään jokaisen eläimen osalta erikseen laskemalla yhteensä vähintään 200 punasolua luuytimestä ja 1 000 punasolua perifeerisestä verestä (17). Kaikki objektilasit, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava

toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Vähintään 2 000 punasolun esiastetta lasketaan eläintä kohti mikrotumaisten punasolujen esiasteiden esiintymistiheyden määrittämistä varten. Lisätietoja voidaan saada laskemalla mikrotumat kypsistä punasoluista. Objektilaseja analysoitaessa punasolujen esiasteiden osuuden punasolujen kokonaismäärästä tulisi olla vähintään 20 % kontrolliarvosta. Kun koe-eläimille annetaan tutkittavaa ainetta jatkuvasti 4 viikon ajan tai pitempään, voidaan laskea myös vähintään 2 000 kypsää punasolua eläintä kohti mikrotumien esiintymistiheyden toteamiseksi. Automaattiset analyysijärjestelmät (kuva-analyysi ja solususpensioiden virtaussytometria) ovat hyväksyttäviä vaihtoehtoja manuaaliselle arvioinnille, mikäli ne perustellaan ja validoidaan asianmukaisesti.

2 TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Yksittäisten eläinten tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Punasolujen esiasteiden laskettu määrä, mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä ja punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä on lueteltava kunkin analysoidun eläimen osalta erikseen. Mikäli eläimille annetaan tutkittavaa ainetta jatkuvasti 4 viikon ajan tai pitempään, myös kypsien punasolujen tiedot on ilmoitettava, mikäli niitä on kerätty. Punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä ja, jos katsotaan aiheelliseksi, mikrotumaisten punasolujen prosentuaalinen määrä ilmoitetaan jokaisen eläimen osalta. Ellei viitteitä sukupuolten välisistä vaste-eroista ole havaittavissa, molempien sukupuolten tiedot voidaan yhdistää tilastollista analyysiä tehtäessä.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten mikrotumaisten solujen lukumäärän annoksesta riippuva suureneminen tai mikrotumaisten solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisessä annosryhmässä yhdellä näytteenottokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (18) (19). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella, mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Testattava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Mikrotumatestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa mikrotumia, jotka ovat seurausta kromosomivauriosta tai mitoosilaitteen vauriosta testatun lajin punasoluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa mikrotumia testattujen lajien punasolujen esiasteissa.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen (esim. systeeminen toksisuus) on pohdittava.

3 RAPORTOINTI

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Koeolosuhteet:

— positiivisia ja negatiivisia (kantaja-aine/liuotin) kontrolleja koskevat tiedot,

— raja-annostutkimuksen tulokset, jos tehty,

— annostasojen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelujen yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— antotavan valintaperusteet,

— menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen, tarvittaessa,

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk), tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteenotto-ohjelmasta,

— objektilasien valmistusmenetelmät,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden laskentakriteerit,

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti,

— kriteerit, joiden perustella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit

— punasolujen esiasteiden osuus punasolujen kokonaismäärästä,

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä, ilmoitetaan erikseen jokaisesta eläimestä,

— mikrotumaisten punasolujen esiasteiden keskiarvo ± keskihajonta ryhmää kohti,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät,

— samanaikaiset ja aikaisemmat negatiivisilla kontrolleilla saadut tulokset,

— rinnakkaisen positiivisen kontrollin tiedot.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4 **KIRJALLISUUTTA**

(1) Heddle, J.A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, s. 187–190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, s. 9–15.

(3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, s. 61–118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, s. 29–80.

(5) MacGregor, J.T., Schlegel, R., Choy, W.N. and Wehr, C.M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, s. 555–558.

(6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, s. 103–112.

(7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R. and Shelby, M.E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, s. 513–522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, s. 245–249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridime Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS, *Mutation Res.*, 278, s. 83–98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, s. 53–159.

(11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, s. 293–304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, s. 313–319.

(13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 313–319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, s. 241–247.

(15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, s. 269–275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, s. 91–104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, s. 97–99.

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D.J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.

(19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D.J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232."

LIITE 4D

"B.13/14 MUTAGEENISUUS — TAKAISINMUTAATIOTESTI BAKTEEREILLA

1 **MENETELMÄ**

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä käytetään *Salmonella typhimurium*- ja *Escherichia coli* -bakteereiden aminohappoja vaativia kantoja sellaisten pistemutaatioiden havaitsemiseksi, joihin liittyy DNA:n yhden tai useamman emäsparin korvautuminen, ylimäärä tai deleetio (1) (2) (3). Tämän bakteereilla tehtävän takaisinmutaatiotestin periaate on, että se paljastaa mutaatiot, jotka korjaavat testikannassa olevat mutaatiot ja palauttavat bakteerien toiminnallisen kyvyn syntetisoida essentiaalista aminohappoa. Revertantit bakteerit tunnistetaan siitä, että ne pystyvät kasvamaan, vaikka testibakteerikannan ennen takaisinmutaatiota tarvitsema aminohappo puuttuu.

Pistemutaatiot aiheuttavat monia ihmisen geneettisiä sairauksia, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä olevat pistemutaatiot ovat osallisina ihmisten ja koe-eläinten kasvainten muodostumisessa. Bakteereilla tehtävä takaisinmutaatiotesti on nopea, edullinen ja suhteellisen helposti toteutettava testi. Monilla testikannoilla on useita ominaisuuksia, joiden ansiosta ne osoittavat herkästi mutaatiot. Näitä ovat esimerkiksi herkästi reagoivat DNA-jaksot takaisinmutaatiokohdissa, solujen lisääntynyt läpäisevyys suurille molekyyleille ja DNA:n korjausjärjestelmien eliminoituminen tai virheille alttiiden DNA:n korjausprosessien lisääntyminen. Testikantojen spesifisyys voi tuottaa hyödyllistä tietoa genotoksisten aineiden aiheuttamien mutaatioiden tyypistä. Käytettävissä on hyvin laaja tietokanta bakteerien takaisinmutaatiotestien tuloksista erittäin monissa rakenteissa, ja vakiintuneita menetelmiä on kehitetty fysikaaliskemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaisten kemiallisten aineiden, myös haihtuvien yhdisteiden, testaamista varten.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Takaisinmutaatiotesti joko *Salmonella typhimurium*- tai *Escherichia coli* -bakteereilla osoittaa aminohappoa vaativassa kannassa (edellisessä histidiini ja jälkimmäisessä tryptofaani) mutaation, jonka seurauksena syntyy ulkopuolisesta aminohapon saannista riippumaton kanta.

Emäsparin korvautumista aiheuttavat mutageenit ovat aineita, jotka aiheuttavat emäksen vaihtumisen DNA:ssa. Takaisinmutaatiotestissä tämä vaihtuminen saattaa tapahtua alkuperäisen mutaation kohdassa tai jossakin muussa bakteerigenomin kohdassa.

Lukukehyksensiirtomutageenit ovat aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA:ssa, mikä muuttaa lukukehystä (reading frame) RNA:ssa.

1.3 ALUSTAVAT VALMISTELUT

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä käytetään prokaryoottisoluja, jotka poikkeavat nisäkässoluista soluunoton, metabolian, kromosomirakenteen ja DNA:n korjautumisprosessien suhteen. *In vitro* -testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää. *In vitro* -metaboliset aktivaatiojärjestelmät eivät pysty täysin jäljittelemään nisäkässolujen *in vivo* -olosuhteita. Testistä ei sen vuoksi voida suoraan päätellä aineen mutageenisuutta ja karsinogeenisuutta nisäkkäillä.

Bakteereilla tehtävää takaisinmutaatiotestiä käytetään yleisesti genotoksisuuden, ja varsinkin pistemutaatioita aiheuttavan vaikutuksen, alustavana seulontamenetelmänä. Laaja tietokanta on osoittanut, että monilla kemiallisilla aineilla, joilla saadaan positiivinen tulos tässä tutkimuksessa, todetaan mutageenista vaikutusta myös muissa tutkimuksissa. On myös esimerkkejä mutageenisista aineista, joita ei voida todeta tällä testillä. Nämä

epäonnistumiset voivat johtua todetun tulostapahtuman spesifisestä luonteesta, metabolisen aktivaation eroista tai aineen erilaisesta biologisesta hyödynnettävyydestä. Toisaalta takaisinmutaatiotestin herkkyyttä lisäävät tekijät voivat johtaa mutageenisen aktiivisuuden liialliseen stimulaatioon.

Bakteereilla tehtävä takaisinmutaatiotesti ei välttämättä sovellu tiettyjen kemiallisten aineryhmien testaamiseen. Tällaisia ovat esimerkiksi voimakkaasti bakterisidiset yhdisteet (esim. tietyt antibiootit) ja aineet, joiden arvellaan (tai tiedetään) vaikuttavan erityisesti nisäkässolun kahdentumisjärjestelmään (esim. jotkut topoisomeraasin estäjät ja jotkut nukleosidianalogit). Nisäkkäillä tehtävät mutaatiotestit saattavat soveltua paremmin näihin tapauksiin.

Vaikka monet tässä testissä positiivisen tuloksen antavat kemialliset aineet ovat karsinogeenisia nisäkkäillä, korrelaatio ei ole ehdoton. Se riippuu aineryhmän kemiallisista ominaisuuksista, eikä kaikkia karsinogeeneja voida todeta tällä testillä, koska ne vaikuttavat muiden, ei-genotoksisten mekanismien tai bakteerisoluista puuttuvien mekanismien välityksellä.

1.4 TESTIN PERIAATE

Bakteerisolususpensiot altistetaan tutkittavalle aineelle eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa tai ilman sitä. Maljainkorporoitumismenetelmässä nämä suspensiot sekoitetaan 'overlay'-agariin ja levitetään heti minimaalisen kasvualustan pinnalle. Preinkubaationmenetelmässä tutkittavaa ainetta sisältävää seosta inkuboidaan, minkä jälkeen se sekoitetaan 'overlay'-agariin ennen kuin se levitetään minimaalisen kasvualustan pinnalle. Molemmissa menetelmissä revertantit pesäkkeet lasketaan 2—3 päivän inkubaatioajan jälkeen ja niiden määrää verrataan spontaanien revertanttien pesäkkeiden määrään pelkkää liuotinta sisältävissä kontrollimaljoissa.

Takaisinmutaatiotesti bakteereilla voidaan tehdä useilla eri menetelmillä. Yleisesti käytettyjä ovat maljainkorporoitumismenetelmä (1) (2) (3) (4), preinkubaatiomenetelmä (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuaatiomenetelmä (9) (10) ja suspensiomenetelmä (11). Kaasujen ja höyryjen testaamiseen käytettäviä muunnelmia on myös kuvattu (12).

Tässä menetelmässä kuvataan pääasiassa maljainkorporoitumis- ja preinkubaatiomenetelmiä. Niillä molemmilla voidaan tehdä kokeita sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Jotkut aineet voidaan havaita tehokkaammin preinkubaatiomenetelmällä. Nämä kuuluvat sellaisiin kemiallisten aineiden ryhmiin, joihin kuuluu lyhytketjuisia alifaattisia nitrosoamiineja, kaksiarvoisia metalleja, aldehydejä, atsovärejä ja diatsoyhdisteitä, pyrollitsidiinialkaloideja, allyyliyhdisteitä ja nitroyhdisteitä (3). On todettu myös, että tiettyjä mutageeniryhmiä ei pystytä aina toteamaan standardeilla menetelmillä, kuten maljainkorporoitumis- tai preinkubaatiomenetelmällä. Näitä on pidettävä erikoistapauksina, ja niiden toteamiseen tulisi ehdottomasti käyttää vaihtoehtoisia menetelmiä. Seuraavat erikoistapaukset on voitu tunnistaa (sekä esimerkkejä toimenpiteistä, joita voidaan käyttää niiden toteamisessa): atsovärit ja diatsoyhdisteet (3) (5) (6) (13), kaasut ja haihtuvat kemialliset aineet (12) (14) (15) (16) ja glykosidit (17) (18). Poikkeaminen standardista menetelmästä on perusteltava tieteellisesti.

1.5 TESTIN KUVAUS

1.5.1 **Testin valmistelu**

1.5.1.1 *Bakteerit*

Tuoreita bakteeriviljelmiä on kasvatettava myöhäiseen eksponentiaaliseen tai varhaiseen stationääriseen kasvuaiheeseen (noin 10^9 solua/ml). Myöhäisessä stationärivaiheessa olevia viljelmiä ei pidä käyttää. Oleellista on, että kokeessa käytettävät viljelmät sisältävät elinkykyisiä soluja suurina tittereinä. Titteri voidaan osoittaa joko aikaisemmissa kontrollitutkimuksissa saatujen kasvukäyrien perusteella tai määrittämällä jokaisessa analyysissä elinkykyisten solujen lukumäärät maljakokeella.

Suositeltu inkubaatiolämpötila on 37 °C.

On käytettävä vähintään viittä bakteerikantaa. Näihin tulee sisältyä neljä *S. typhimurium* -kantaa (TA 1535; TA 1537 tai TA97a tai TA97; TA98; ja TA100), joiden on osoitettu olevan luotettavia ja joilla on saatu toistettavissa oleva vaste eri laboratorioissa. Näissä neljässä *S. typhimurium* -kannassa on GC-emäsparit primaarisessa takaisinmutaatiokohdassa, ja tiedetään, että ne eivät ehkä paljasta tiettyjä hapettavia mutageeneja, ristisidoksia muodostavia aineita eivätkä hydratsiineja. Tällaiset aineet voidaan todeta *E. coli* WP2 -kannoilla tai *S. typhimurium* TA 102 -kannalla (19), joissa on AT-emäspari primaarisessa takaisinmutaatiokohdassa. Suositeltava kantojen yhdistelmä on tämän vuoksi:

— *S. typhimurium* TA 1535, ja

— *S. typhimurium* TA 1537 tai TA97 tai TA97a, ja

— *S. typhimurium* TA98, ja

— *S. typhimurium* TA100, ja

— *E. coli* WP2 uvrA tai *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) tai *S. typhimurium* TA102.

Ristisidoksia muodostavien mutageenien toteamiseksi mukaan tulisi ehkä käyttää TA102-kantaa tai käyttää lisäksi DNA:n korjautumiseen kykenevää *E. coli* -kantaa (esim. *E. coli* WP2 tai *E. coli* WP2 (pKM101)).

Varastoviljelmien valmistuksessa, markkerien vahvistamisessa ja säilytyksessä on käytettävä vakiintuneita menetelmiä. Kasvuun vaadittavien aminohappojen tarve on osoitettava kunkin jäädytetyn varastoviljelmäpreparaatin osalta erikseen (*S. typhimurium* -kannoilla histidiini ja *E. coli* -kannoilla tryptofaani). Muut fenotyyppiset ominaisuudet on tarkistettava vastaavasti. Niitä ovat: R-tekijäplasmidien esiintyminen tai puuttuminen, mikäli sillä on merkitystä (ampisilliiniresistenssi kannoissa TA98, TA100 ja TA97a tai TA97, WP2 uvrA ja WP2 uvrA (pKM101) ja ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssi kannassa TA102); tyypillisten mutaatioiden esiintyminen (kristalliviolettiherkkyyden aiheuttama rfa-mutaatio *S. typhimurium* -bakteerissa ja ultraviolettivaloherkkyyden aiheuttama uvrA-mutaatio *E. coli* -bakteerissa tai uvrB-mutaatio *S. typhimurium* -bakteerissa) (2) (3). Kantojen tuottamien spontaanien revertanttien pesäkkeiden määrän tulisi myös olla laboratoriokohtaisten vertailuarvojen esiintymistiheysalueella ja mieluiten kirjallisuudessa raportoidulla alueella.

1.5.1.2 *Kasvatusväliaine*

Käytetään sopivaa minimaalista agaria (sisältää esim. Vogel-Bonner minimal medium E:tä ja glukoosia) ja 'overlay'-agaria, joka sisältää histidiiniä ja biotiinia tai tryptofaania, jotta muutama solunjakautuminen voi tapahtua (1) (2) (9).

1.5.1.3 *Metabolinen aktivaatio*

Bakteerit on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (1) (2) tai fenobarbitonin ja β-naftoflavonin (18) (20) (21) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Käytetty postmitokondriaalisen jakeen pitoisuus S9-seoksessa on yleensä 5—30 % v/v. Metabolisen aktivaatiojärjestelmän valinta tai sen pois jättäminen saattaa riippua siitä, millaiseen kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. Joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampia kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta. Pelkistävä metabolinen aktivaatiojärjestelmä saattaa soveltua paremmin atsovärien ja diatsoyhdisteiden tutkimiseen (6) (13).

1.5.1.4 *Tutkittava aine/valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen bakteerien altistamista. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmään ja/tai laimentaa ennen käsittelyä. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikutta solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen (22). Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden yhteensopivuuden osoittavat tutkimustulokset on esitettävä. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä tulisi harkita ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä.

1.5.2 **Koeolosuhteet**

1.5.2.1 *Testikannat* (ks. 1.5.1.1)

1.5.2.2 *Altistuspitoisuus*

Tutkittavan aineen suurinta testattavaa pitoisuutta määritettäessä on otettava huomioon aineen sytotoksisuus ja liukoisuus altistuksessa käytettävään lopulliseen seokseen.

Myrkkyvaikutus ja liukenemattomuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavalla kokeella. Sytotoksisuus voidaan havaita revertanttien pesäkkeiden lukumäärän pienenemisestä, taustakasvuston kirkastumisesta tai vähenemisestä tai solujen eloonjäämisasteesta käsitellyissä viljelmissä. Aineen sytotoksisuus saattaa muuttua metabolisten aktivaatiojärjestelmien läsnäollessa. Liukenemattomuus on arvioitava lopullisen seoksen paljaalla silmällä havaittavan sakkautumisen perusteella todellisissa koeolosuhteissa.

Liukoisten, ei-sytotoksisten aineiden suositeltu testattava maksimipitoisuus on 5 mg/malja tai 5 µl/malja. Testattaessa ei-sytotoksisia aineita, jotka eivät ole liukoisia pitoisuuksissa 5 mg/malja tai 5 µl/malja, yhden tai useamman testattavan pitoisuuden on oltava liukenemattomia lopullisessa altistusseoksessa. Jos tutkittava aine on sytotoksinen jo pienempinä pitoisuuksina kuin 5 mg/malja tai 5 µl/malja, se olisi testattava sytotoksiseen pitoisuuteen asti. Sakka ei saisi vaikuttaa laskentaan.

Alustavassa kokeessa on käytettävä ainakin viittä erisuuruista tutkittavan aineen analysoitavissa olevaa pitoisuutta siten, että testauspisteiden välillä on noin puolen log:n ($\sqrt{10}$) väli. Pitoisuus-vastesuhdetta tutkittaessa voi olla syytä käyttää pienempiä välejä. Arvioitaessa aineita, jotka sisältävät huomattavia määriä mahdollisia mutageenisia epäpuhtauksia, voidaan harkita testaamista myös suuremmilla pitoisuuksilla kuin 5 mg/malja tai 5 µl/malja.

1.5.2.3 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

Jokaisessa testissä on käytettävä myös kannan suhteen spesifisiä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontrolleja sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Positiivisen kontrolliaineen pitoisuudet on valittava siten, että ne tuovat esiin kunkin testin tehokkuuden.

Testeissä, joissa käytetään metabolista aktivaatiojärjestelmää, positiivinen (positiiviset) kontrolliaine(et) on valittava käytettävien bakteerikantojen tyypin perusteella.

Seuraavassa on esimerkkejä sopivista positiivisista kontrolliaineista testeissä, joissa käytetään metabolista aktivaatiota:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
9,10-dimetyyliantraseeni	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetyylibents[a]antraseeni	57-97-6	200-359-5
bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraseeni	613-13-8	210-330-9
syklofosfamidi syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Seuraava aine sopii positiiviseksi kontrolliaineeksi pelkistävää metabolista aktivaatiota käytettäessä:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Congo Red	573-58-0	209-358-4

2-aminoantraseenia ei pidä käyttää ainoana S9-seoksen tehon indikaattorina. Jos 2-aminoantraseenia käytetään, jokainen S9-erä on karakterisoitava myös mutageenilla, joka vaatii mikrosomaalisiin entsyymeihin perustuvaa metabolista aktivaatiota, esim. bentso[a]pyreenilla, dimetyylibentsantraseenilla.

Seuraavat aineet ovat esimerkkejä kannan suhteen spesifisistä positiivisista kontrolleista, joita voidaan käyttää ilman eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää tehtävissä testeissä:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro	Kanta
natriumatsidi	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 ja TA 100
2-nitrofluoreeni	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridiini	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
kumeenihydroperoksidi	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomysiini C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA ja TA 102
N-etyyli-N-nitro-N-nitrosoguanidiini	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA(pKM101)
4-nitrokinoliini-1-oksidi	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA(pKM101)
furyylifuramidi (AF2)	3688-53-7		plasmidin sisältävät kannat

Myös muita soveltuvia positiivisia kontrolleja voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvien positiivisten kontrollien käyttöä on harkittava, mikäli niitä on käytettävissä.

Lisäksi on käytettävä pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta negatiivisina kontrolleina, jotka eivät sisällä tutkittavaa ainetta mutta joita muutoin käsitellään samalla tavoin. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleista saadut aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.5.3 **Testin suorittaminen**

Maljainkorporoitumismenetelmässä (1) (2) (3) (4), jossa ei käytetä metabolista aktivaatiota, 0,05 ml tai 0,1 ml tutkittavia liuoksia, 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää (noin 10^8 elinkykyistä solua) ja 0,5 ml steriiliä puskuria sekoitetaan 2 ml:aan 'overlay'-agaria. Metabolista aktivaatiojärjestelmää käytettäessä 0,5 ml metabolista aktivaatioseosta, jossa on riittävä määrä postmitokondriaalista jaetta (pitoisuus 5—30 % v/v metabolisessa aktivaatioseoksessa), sekoitetaan 'overlay'-agariin (2,0 ml) yhdessä bakteerien ja tutkittavan aineen/tutkittavan liuoksen kanssa. Jokaisen koeputken sisältö sekoitetaan ja kaadetaan minimaalisen agarmaljan pinnalle. 'Overlay'-agarin annetaan jähmettyä ennen inkubaatiota.

Preinkubaatiomenetelmässä (2) (3) (5) (6) tutkittavaa ainetta/tutkittavaa liuosta esi-inkuboidaan testikannan (noin 10^8 elinkykyistä solua) ja steriilin puskurin tai metabolisen aktivaatiojärjestelmän (0,5 ml) kanssa yleensä vähintään 20 minuuttia 30—37 °C:ssa, ennen kuin se sekoitetaan 'overlay'-agariin ja kaadetaan minimaalisen agarmaljan pinnalle. Yleensä 0,05 tai 0,1 ml tutkittavaa ainetta/tutkittavaa liuosta, 0,1 ml bakteereja ja 0,5 ml S9-seosta tai steriiliä puskuria sekoitetaan 2,0 ml:aan 'overlay'-agaria. Koeputket tulisi ilmata preinkubaation aikana sekoittajaa käyttäen.

Riittävän arvion tekemiseksi hajonnasta on käytettävä kolmea rinnakkaista maljaa kullakin annostasolla. Kaksoismaljauksen käyttö on mahdollista, mikäli se voidaan perustella tieteellisesti. Satunnainen maljan menetys ei välttämättä mitätöi analyysiä.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita tulisi testata asianmukaisin menetelmin, esimerkiksi suljetuissa astioissa (12) (14) (15) (16).

1.5.4 **Inkubaatio**

Kaikkia tiettyyn testiin kuuluvia maljoja on inkuboitava 37 °C:ssa 48—72 tunnin ajan. Inkubaatioajan jälkeen lasketaan revertanttien pesäkkeiden lukumäärä maljaa kohti.

2 TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tulokset on ilmoitettava revertanttien pesäkkeiden lukumääränä maljaa kohti. Revertanttien pesäkkeiden määrä sekä negatiivisissa (liuotinainekontrolli ja käsittelemätön kontrolli, jos käytetty) että positiivisissa kontrollimaljoissa on myös ilmoitettava. Maljakohtaiset lukumäärät, revertanttien pesäkkeiden maljakohtaisten määrien keskiarvo ja keskihajonta on ilmoitettava tutkittavan aineen ja positiivisten ja negatiivisten (käsittelemättömät ja/tai liuotinaine) kontrollien osalta.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnelluissa koeolosuhteissa. Negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista jossakin tapauksessa pidetä tarpeellisena, tämä päätös on perusteltava. Tutkimusparametrien muuttamista koeolosuhteiden monipuolistamiseksi on harkittava seurantatutkimuksia tehtäessä. Mahdollisia muutettavia tutkimusparametrejä ovat pitoisuusvälit, altistusmenetelmä (maljainkorporoitumiskoe tai nesteen preinkubointi) ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten pitoisuudesta riippuva revertanttien pesäkkeiden maljakohtaisen lukumäärän suureneminen koko testatulla annosalueella ja/tai toistettavissa oleva lisääntyminen yhdellä tai useammalla pitoisuustasolla vähintään yhdessä kannassa joko metabolista aktivaatiojärjestelmää käytettäessä tai ilman sitä (23). Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (24). Tilastollinen merkitsevyys ei saa kuitenkaan olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa pistemutaatioita emässubstituutioiden tai lukukehyksensiirtojen kautta joko *Salmonella typhimurium*- ja/tai *Escherichia coli* -bakteerien genomissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei testattava aine ole koeolosuhteissa mutageeninen testatulla lajilla.

3 RAPORTOINTI

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Kannat:

— käytetyt kannat,

— solujen määrä viljelmää kohti,

— kannan ominaisuudet.

Koeolosuhteet:

— tutkittavan aineen määrä maljaa kohti (mg/malja tai µl/malja) sekä annoksen valinnan ja kutakin pitoisuutta kohti valittujen maljojen lukumäärän perustelut,

— käytetty kasvatusväliaine,

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus sekä hyväksymiskriteerit,

— altistusmenettely.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— sakkautumisen merkit,

— maljakohtaiset määrät,

— revertanttien pesäkkeiden määrä maljaa kohti ja keskihajonta,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisista negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— aikaisemmat negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tutkimustulokset, myös vaihteluväli, keskiarvot ja keskihajonnat.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4 KIRJALLISUUTTA

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, s. 347–364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, s. 173–215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, s. 217–233.

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, s. 69–240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, s. 91–96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, s. 273–285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, s. 13–61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, s. 167–177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.*, 38, s. 33–42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141–161.

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, s. 453–465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, s. 335–344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, s. 33–47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, s. 2–141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, s. 249–258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames /Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, s. 421–441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, s. 3780–3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, s. 4961–4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, s. 285–291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, s. 85–88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 175–177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, s. 343–350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, s. 83–91.

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, s. 28–65."

Liite 4E

"B.17 MUTAGEENISUUS — GEENIMUTAATIOTESTI NISÄKÄSSOLUILLA *IN VITRO*

1 MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkässoluviljelmissä tehtävää *in vitro* -geenimutaatiotestiä voidaan käyttää kemiallisten aineiden aiheuttamien geenimutaatioiden toteamiseen. Sopivia solulinjoja ovat hiiren lymfoomasolulinja L5178Y, kiinanhamsterin solulinjat CHO, CHO-AS52 ja V79 ja ihmisen lymfoblastoidisolulinja TK6 (1). Näissä solulinjoissa yleisimmin käytetyt geneettiset tulostapahtumat mittaavat tymidiinikinaasi- (TK) ja hypoksantiini-guaniinifosforibosyylitransferaasilokusten (HPRT) mutaatioita ja ksantiiniguaniinifosforibosyylitransferaasin (XPRT) transgeeniä. TK-, HPRT- ja XPRT-mutaatiotesteillä voidaan havaita erilaisia geneettisiä tapahtumia. Koska TK ja XPRT sijaitsevat autosomissa, niiden avulla voidaan ehkä havaita sellaisia geneettisiä tapahtumia (esim. suuria deleetioita), joita ei voida havaita X-kromosomien HPRT-lokuksessa (2) (3) (4) (5) (6).

Nisäkässoluilla tehtävissä *in vitro* -geenimutaatiotesteissä voidaan käyttää pysyvien solulinjojen tai solukantojen viljelmiä. Solujen valintakriteereinä käytetään niiden kykyä kasvaa viljelmässä ja niiden spontaanimutaatiotaajuuden stabiliteettia.

In vitro tehtävät testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiota. Tällainen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei pysty täysin jäljittelemään *in vivo* -olosuhteita nisäkkäissä. On pyrittävä välttämään erityisesti sellaisia olosuhteita, joissa saatavat positiiviset tulokset eivät heijasta aineen luontaista mutageenisuutta ja saattavat johtua pH:n muutoksista, osmolaliteetista tai voimakkaasta sytotoksisuudesta (7).

Tätä testiä käytetään nisäkkäiden mahdollisten mutageenien ja karsinogeenien seulontaan. Monet yhdisteet, joilla saadaan positiivinen tulos tässä testissä, ovat nisäkkäiden karsinogeeneja. Tämän testin ja karsinogeenisuuden välillä ei kuitenkaan ole täydellistä korrelaatiota. Korrelaatio riippuu aineryhmän kemiallisista ominaisuuksista, ja yhä useammat tutkimustulokset viittaavat siihen, että on olemassa karsinogeeneja, joita ei voida havaita tällä testillä, koska ne näyttävät vaikuttavan muiden, ei-genotoksisten mekanismien tai bakteerisoluista puuttuvien mekanismien välityksellä (6).

Ks. myös Yleinen johdanto Osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Forward-mutaatio: geenin mutaatio parentaalisesta tyypistä mutanttimuotoon, minkä seurauksena geenin koodittama valkuaisaine menettää entsymaattisen aktiivisuutensa tai sen entsyymiaktiivisuus muuttuu.

Emäsparien korvautumista aiheuttavat mutageenit: aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin substituution DNA:ssa.

Lukukehyksensiirtomutageenit: aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA-molekyylissä.

Fenotyypin ilmentymisaika: ajanjakso, jonka aikana muuttumattomat geenituotteet poistuvat hiljattain mutatoituneista soluista.

Mutaatiotaajuus: todettu mutanttien solujen lukumäärä jaettuna elinkykyisten solujen määrällä.

Suhteellinen kokonaiskasvu: solumäärän suureneminen tietyssä ajassa verrattuna kontrollina käytettävään solupopulaatioon; lasketaan tulona, joka saadaan kertomalla keskenään suspensiokasvu suhteessa negatiiviseen kontrolliin ja kloonaustehokkuus suhteessa negatiiviseen kontrolliin.

Suhteellinen suspensiokasvu: solujen lukumäärän suureneminen ilmentymisajan kuluessa verrattuna negatiiviseen kontrolliin.

Elinkykyisyys: tutkittavalle aineelle altistettujen solujen kloonaustehokkuus maljausajankohtana selektiivisissä olosuhteissa ilmentymisajan jälkeen.

Eloonjääneisyys: tutkittavalle aineelle altistettujen solujen kloonaustehokkuus maljattaessa altistusjakson lopussa; eloonjääneisyys ilmoitetaan yleensä suhteessa kontrollina käytetyn solupopulaation eloonjääneisyyteen.

1.3 TESTIN PERIAATE

Solut, joista $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ -mutaation seurauksena puuttuu tymidiinikinaasi (TK), ovat resistenttejä pyrimidiinianalogitrifluorotymidiinin (TFT) sytotoksisille vaikutuksille. Tymidiinikinaasin läsnä ollessa solut ovat herkkiä TFT:lle, joka estää solun aineenvaihduntaa ja pysäyttää solunjakautumisen. Mutantit solut kykenevät siis lisääntymään TFT:n läsnä ollessa, kun taas normaalit, tymidiinikinaasia sisältävät, solut eivät kykene. Vastaavasti solut, joista puuttuu HPRT- tai XPRT-entsyymi, ovat resistenttejä 6-tioguaniinille (TG) tai 8-atsaguaniinille (AG). Tutkittavan aineen ominaisuuksiin on kiinnitettävä erityistä huomiota, jos selektiivisen aineen emäsanalogia tai sille kemiallisesti sukua olevaa ainetta testataan millä tahansa nisäkässoluissa tehtävällä geenimutaatiotestillä. Esimerkiksi tutkittavan aineen mahdollinen epäilty selektiivinen myrkkyvaikutus mutantteihin ja ei-mutantteihin soluihin on selvitettävä. Selektiivisen järjestelmän/aineen toimintakyky on sen vuoksi vahvistettava testattaessa kemiallisia aineita, jotka ovat rakenteeltaan selektiivisen aineen kaltaisia (8).

Suspensiossa tai yksikerrosviljelmässä olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi testattavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä ja jatkoviljellään sytotoksisuuden toteamiseksi ja fenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi ennen mutanttien selektiota (9) (10) (11) (12) (13). Sytotoksisuus määritetään yleensä mittaamalla viljelmien suhteellinen kloonaustehokkuus (eloonjääneisyys) tai suhteellinen kokonaiskasvu altistusjakson jälkeen. Altistettuja viljelmiä pidetään kasvatusväliaineessa riittävän pitkä aika, joka on jokaiselle valitulle lokukselle ja solutyypille ominainen, jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista. Mutaatiotaajuus lasketaan siten, että tunnettu lukumäärä soluja kylvetään toisaalta mutanttien toteamiseksi selektiivistä ainetta sisältävälle alustalle toisaalta kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden) määrittämiseksi alustalle, joka ei sisällä selektiivistä ainetta. Sopivan inkubaatioajan kuluttua lasketaan pesäkkeet. Mutaatiotaajuus lasketaan selektiivisellä alustalla todettujen mutanttipesäkkeiden lukumäärän ja ei-selektiivisellä alustalla todettujen pesäkkeiden lukumäärän perusteella.

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Solut*

Tässä testissä voidaan käyttää useita eri solutyyppejä, kuten L5178Y-, CHO-, CHO-AS52-, V79- tai TK6-solulinjojen subklooneja. Tässä testissä on käytettävä solutyyppejä, joiden on osoitettu olevan herkkiä kemiallisille mutageeneille ja joilla on hyvä kloonaustehokkuus ja stabiili spontaanimutaatiotaajuus. Solujen mahdollinen mykoplasmakontaminaatio on tutkittava. Kontaminoituneita soluja ei saa käyttää.

Testi on suunniteltava siten, että sillä on tietty herkkyys ja teho. Solujen lukumäärän, viljelmien ja käytettyjen tutkittavan aineen pitoisuuksien tulee olla näiden määriteltyjen parametrien mukaisia (14). Altistuksen jälkeen elossa olevien ja kussakin testivaiheessa käytettävien elinkykyisten solujen vähimmäismäärän tulee perustua spontaanimutaatiotaajuuteen. Yleisohje on, että solujen lukumäärän on oltava vähintään kymmenen kertaa spontaanimutaatiotaajuuden käänteisluvun suuruinen, vähimmäismääräksi suositellaan kuitenkin 10^6 solua. Käytetystä solujärjestelmästä on oltava riittävästi aikaisempaa tutkimustietoa, joka osoittaa, että testillä saadaan pysyvästi päteviä tuloksia.

1.4.1.2 *Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet*

Testissä on käytettävä soveltuvia kasvatusväliaineita ja inkubaatio-olosuhteita (kasvatusastiat, lämpötila, CO_2-pitoisuus ja kosteus). Kasvatusväliaineet on valittava käytettävän selektiojärjestelmän ja solutyypin mukaan. On erityisen tärkeää valita viljelyolosuhteet, jotka takaavat optimaalisen solukasvun ilmentymisaikana ja sekä mutanttien että ei-mutanttien solujen optimaalisen pesäkkeenmuodostuskyvyn.

1.4.1.3 *Viljelmien valmistelu*

Solut kasvatetaan varastoviljelmistä, kylvetään kasvatusväliaineeseen ja inkuboidaan 37 °C:ssa. Viljelmät on ehkä puhdistettava aikaisemmista mutanteista soluista, ennen kuin niitä käytetään tässä testissä.

1.4.1.4 *Metabolinen aktivaatio*

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (15) (16) (17) (18) tai fenobarbitonin ja β-naftoflavonin (19) (20) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyrsijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria.

Postmitokondriaalisen jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue lopullisessa kasvatusväliaineessa on 1—10 % v/v. Metabolisen aktivaatiojärjestelmän valinta tai sen pois jättäminen saattaa riippua siitä, mihin kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. Joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampaa kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta.

Monilla uusilla menetelmillä, kuten yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetuilla solulinjoilla, jotka ilmentävät spesifisiä aktivaatioentsyymejä, saattaa olla endogeenista aktivaatiovaikutusta. Käytettyjen solulinjojen valinnan on oltava tieteellisesti perusteltua (esim. sytokromi P450 -isoentsyymin merkitys tutkittavan aineen metabolialle).

1.4.1.5 *Tutkittava aine/valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen solujen käsittelyä. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikuttaa solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä. Vesi voidaan poistaa lisäämällä molekyylisiivilä.

1.4.2.2 *Altistuspitoisuudet*

Huomioon otettavia kriteerejä suurinta pitoisuutta määritettäessä ovat sytotoksisuus, liukoisuus testijärjestelmään ja pH:n tai osmolaliteetin muutokset.

Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solujen eheyden ja solukasvun indikaattoreita, kuten suhteellista kloonaustehokkuutta (eloonjääneisyyttä) tai suhteellista kokonaiskasvua. Sytotoksisuus ja liukoisuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavassa kokeessa.

Vähintään neljää analysoitavissa olevaa pitoisuutta on käytettävä. Mikäli sytotoksisuutta esiintyy, näiden pitoisuuksien on katettava alue, jossa suurimmalla pitoisuudella on maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta, mikä tarkoittaa yleensä sitä, että pitoisuudet voivat poiketa toisistaan enintään kertoimella 2—$\sqrt{10}$. Mikäli suurin pitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, siihen liittyvän suhteellisen eloonjääneisyyden (suhteellisen kloonaustehokkuuden) tai suhteellisen kokonaiskasvun tulisi olla noin 10—20 % (mutta ei alle 10 %). Suhteellisen ei-sytotoksisia aineita testattaessa suurimman testattavan pitoisuuden tulisi olla 5 mg/ml, 5 µl/ml tai 0,01 M sen mukaan, mikä näistä on pienin.

Huonosti liukenevia aineita on testattava viljelyolosuhteissa liukoisuusrajaan asti tai sen yli. Liukenemattomuuteen viittaavat muutokset on määritettävä lopullisessa kasvatusväliaineessa, jolle solut altistetaan. Liukoisuus kannattaa arvioida sekä käsittelyn alussa että lopussa, sillä se voi muuttua koejärjestelmässä altistuksen aikana esimerkiksi solujen, S9:n, seerumin ym. vaikutuksesta. Liukenemattomuus voidaan havaita paljaalla silmällä. Sakan ei pitäisi vaikuttaa laskentaan.

1.4.2.3 *Kontrollit*

Jokaisessa kokeessa on käytettävä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontrolleja, sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä. Metabolista aktivaatiota käytettäessä positiivisena kontrollina on käytettävä sellaista kemiallista ainetta, joka vaatii aktivaatiota mutageenisen vasteen aikaansaamiseksi.

Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Metabolinen aktivaatio	Lokus	Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Ei eksogeenista metabolista aktivaatiota	HPRT	etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
		etyylinitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (pienet ja suuret pesäkkeet)	metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3	200-625-0
	XPRT	etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
		etyylinitrosourea	759-73-9	212-072-2
Eksogeeninen metabolinen aktivaatio	HPRT	3-metyylikolantreeni	56-49-5	200-276-4
		N-nitrosodimetyyliamiini	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimetyylibentsantraseeni	57-97-6	200-359-5
	TK (pienet ja suuret pesäkkeet)	syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
		syklofosfamidimonohydraatti	6055-19-2	
		bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5
		3-metyylikolantreeni	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrosodimetyyliamiini (suurilla S-9-pitoisuuksilla)	62-75-9	200-549-8
		bentso[a]pyreeni	50-32-8	200-028-5

Muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää, esim. jos käytettävissä on laboratoriokohtainen tietokanta 5-bromo-2′-deoksiuridiinista (CAS-nro 59-14-3, Einecs-nro 200-415-9), myös tätä vertailuainetta voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvien positiivisten kontrolliaineiden käyttöä tulisi harkita, mikäli niitä on käytettävissä.

Mukana on oltava myös negatiivisia kontrolleja, jotka koostuvat liuottimesta tai pelkästä kantaja-aineesta kasvatusväliaineessa ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja ryhmiä. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat tiedot kontrollista osoittavat, ettai valitulla liuottimella ole haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.4.3 **Testin suorittaminen**

1.4.3.1 *Altistaminen tutkittavalle aineelle*

Lisääntyvät solut on altistettava testattavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnä ollessa että ilman sitä. Altistusajan on oltava sopiva (tehokas aika on yleensä 3—6 tuntia). Altistusta voidaan jatkaa yhden tai useamman solusyklin ajan.

Kullekin testattavalle pitoisuudelle voidaan altistaa kaksi rinnakkaista viljelmää tai vain yksi viljelmä. Yksittäisiä viljelmiä käytettäessä pitoisuuksien määrää on suurennettava, jotta saadaan riittävä määrä viljelmiä analyysiä varten (esim. vähintään 8 analysoitavissa olevaa pitoisuutta). Rinnakkaisia negatiivisia (liuotin) kontrolliviljelmiä on käytettävä.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita on testattava asianmukaisin menetelmin, esimerkiksi suljetuissa kasvatusastioissa (21) (22).

1.4.3.2 *Eloonjääneisyyden, elinkykyisyyden ja mutaatiotaajuuden mittaaminen*

Altistusajan päätyttyä solut pestään ja viljellään eloonjääneisyyden määrittämiseksi ja mutanttifenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi. Sytotoksisuuden mittaus aloitetaan yleensä altistusajan jälkeen määrittämällä viljelmien suhteellinen kloonaustehokkuus (eloonjääneisyys) tai suhteellinen kokonaiskasvu.

Jokainen lokus vaatii määrätyn minimiajan, jotta hiljattain aiheutettujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista (HPRT ja XPRT vaativat vähintään 6—8 vuorokautta ja TK vähintään 2 vuorokautta). Soluja kasvatetaan selektiivistä ainetta (aineita) sisältävillä alustoilla mutanttien lukumäärän määrittämiseksi ja ilman selektiivisiä aineita kloonaustehokkuuden määrittämiseksi. Elinkykyisyyden mittaaminen (käytetään mutaatiotaajuuden laskemiseen) aloitetaan altistusajan päätyttyä maljaamalla soluja ei-selektiivisessä kasvatusväliaineessa.

Jos tutkittavalla aineella saadaan positiivinen tulos L5178Y $TK^{+/-}$ -testissä, pesäkkeiden koko on määritettävä ainakin yhdessä koeviljelmässä (suurin positiivinen pitoisuus) ja negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa. Jos tutkittavalla aineella saadaan negatiivinen tulos L5178Y $TK^{+/-}$ -testissä, pesäkkeiden koko on määritettävä negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa. Pesäkkeiden koon määritys voidaan tehdä myös tutkimuksissa, joissa käytetään TK6$TK^{+/-}$ -testiä.

2 TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tulosten tulee sisältää tiedot sytotoksisuuden ja elinkykyisyyden määrityksistä, pesäkkeiden lukumäärästä ja mutaatiotaajuudesta altistetuissa viljelmissä ja kontrolliviljelmissä. Mikäli vaste on positiivinen L5178Y $TK^{+/-}$ -testissä, pesäkkeet lasketaan pienten ja suurten pesäkkeiden kriteeriä käyttäen vähintään yhdestä testattavan aineen pitoisuudesta (suurin positiivinen pitoisuus) ja negatiivisista ja positiivisista kontrolleista. Sekä suurten että pienten mutaatiopesäkkeiden molekulaarinen ja sytogeneettinen luonne on selvitetty yksityiskohtaisesti (23) (24). $TK^{+/-}$ -testissä pesäkkeet lasketaan käyttäen kriteereinä normaalin kasvun (suuri) ja hitaan kasvun (pieni) pesäkkeitä (25). Mutanteilla soluilla, joissa geneettinen vaurio on kaikkein suurin, on pitkittynyt kahdentumisaika, joten ne muodostavat pieniä pesäkkeitä. Tällaiset vauriot ulottuvat tyypillisesti kokonaisen geenin puuttumisesta karyotyypissä näkyviin kromosomipoikkeavuuksiin. Pienten mutaatiopesäkkeiden muodostuminen on yhdistetty suuria kromosomipoikkeavuuksia aiheuttaviin kemiallisiin aineisiin (26). Lievemmin vaurioituneet mutantit solut kasvavat yhtä nopeasti kuin parentaalisetkin solut ja muodostavat suuria pesäkkeitä.

Eloonjääneisyys (suhteelliset kloonaustehokkuudet) tai suhteellinen kokonaiskasvu on ilmoitettava. Mutaatiotaajuus on ilmoitettava mutanttien solujen lukumäärän suhteena eloonjääneiden solujen lukumäärään.

Viljelmäkohtaiset tulokset on ilmoitettava. Lisäksi yhtenveto kaikista tiedoista on ilmoitettava taulukkomuodossa.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa. Negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista jossakin tapauksessa pidetä tarpeellisena, tämä päätös on perusteltava. Tutkimusparametrien muuttamista on harkittava epäselvien tai negatiivisten tulosten seurantakokeissa arvioitavien koeolosuhteiden monipuolistamiseksi. Mahdollisia muutettavia tutkimusparametrejä ovat pitoisuusvälit ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten pitoisuuteen liittyvä tai toistettavissa oleva mutaatiotaajuuden suureneminen. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa. Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä koejärjestelmässä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Nisäkässoluilla tehtävässä *in vitro* -geenimutaatiotestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa geenimutaatioita käytetyissä viljellyissä nisäkässoluissa. Toistettavissa oleva positiivinen pitoisuus-vastesuhde on kaikkein merkityksellisin. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa geenimutaatioita testatuissa viljellyissä nisäkässoluissa.

3 RAPORTOINTI

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Solut:

— tyyppi ja solujen lähde,

— soluviljelmien lukumäärä,

— siirrostusten lukumäärä tarvittaessa,

— soluviljelmien ylläpitomenetelmät tarvittaessa,

— mykoplasman puuttuminen.

Koeolosuhteet:

— pitoisuuksien ja viljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esim. sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset, mikäli tiedot ovat käytettävissä,

— kasvatusväliaineen koostumus, CO_2-pitoisuus,

— tutkittavan aineen pitoisuus,

— lisätyn kantaja-aineen ja tutkittavan aineen määrä,

— inkubaatiolämpötila,

— inkubaatioaika,

— altistuksen kesto,

— solutiheys altistuksen aikana,

— metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, myös hyväksymiskriteerit,

— positiiviset ja negatiiviset kontrollit,

— ilmentymisajan pituus (myös kylvettyjen solujen lukumäärä ja jatkoviljelmät ja kasvatusväliaineen vaihtoajat tarvittaessa),

— selektiiviset aineet,

— kriteerit, joiden perusteella testit määritellään positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi,

— elinkykyisten ja mutanttien solujen laskentamenetelmät,

— pesäkkeiden määritelmät, kun pesäkkeen koko ja tyyppi on otettu huomioon (myös 'pienten' ja 'suurten' pesäkkeiden kriteerit tarvittaessa).

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— sakkautumisen merkit,

— tutkittavalle aineelle altistetun viljelmän pH ja osmolaliteetti, jos määritetty,

— pesäkkeen koko, jos määritetty, ainakin negatiivisista ja positiivisista kontrolleista,

— laboratorion valmiudet todeta pienet mutanttipesäkkeet L5178Y $TK^{+/-}$ -järjestelmässä, mikäli merkitystä,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisista negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset,

— aikaisemmat negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tutkimustulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— mutaatiofrekvenssi.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4 **KIRJALLISUUTTA**

(1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (Eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 61, s. 1306—1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.*, 94, s. 467—485.

(4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, s. 394—403.

(5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, 223, s. 121—128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures, *Mutation Res.*, 312, s. 235—239.

(7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, s. 147—204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, s. 225—251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, s. 17—36.

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Standkowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, s. 135—141.

(11) Liber, H. L, Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, s. 9—17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Anaylses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, s. 133—147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al. (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, s. 239—268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., Ed., Cambridge University Press, s. 66—101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, s. 365—373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, s. 347—364.

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.*, 59, s. 61—108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, s. 173—215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Catehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 175—177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation System, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, s. 85—88.

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

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

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

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

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

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

Liite 4F

"B.23 NISÄKKÄIDEN SPERMATOGONIOIDEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI

1 MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Tämän nisäkkäiden spermatogonioilla tehtävän *in vivo* -kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa aineet, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia nisäkkäiden spermatogonioissa (1) (2) (3) (4) (5). Rakenteelliset poikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, mutta myös kromosomityyppisiä poikkeavuuksia esiintyy. Tätä menetelmää ei ole suunniteltu numeeristen poikkeavuuksien mittaamiseen, eikä sitä käytetä rutiinimaisesti tähän tarkoitukseen. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin.

Tämä testi mittaa kromosomipoikkeavuuksia spermatogoniaalisissa itusoluissa, joten sen odotetaan voivan ennustaa itusolujen periytyviä mutaatioita.

Testissä käytetään yleensä jyrsijöitä. Tämä *in vivo* -sytogeneettinen testi paljastaa kromosomipoikkeavuudet spermatogonioiden mitooseissa. Tällä menetelmällä ei tutkita muita kohdesoluja.

Spermatogonioiden kromatidityyppisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi on tutkittava ensimmäistä mitoottista solunjakautumista altistuksen jälkeen, ennen kuin nämä leesiot häviävät myöhemmissä solunjakautumisissa. Altistetuista spermatogoniaalisista kantasoluista voidaan saada lisätietoja tekemällä meioottisia kromosomianalyysejä kromosomityyppisten poikkeavuuksien toteamiseksi diakineesi-metafaasi I:ssä altistettujen solujen muuttuessa spermatosyyteiksi.

Tällä *in vivo* -testillä pyritään selvittämään, vaikuttavatko somaattisten solujen mutageenit myös itusoluihin. Spermatogonioilla tehtävä testi soveltuu myös mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät in vivo metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin.

Kiveksissä on yhtaikaa monia spermatogonioiden sukupolvia, joiden herkkyys kemiallisten aineiden vaikutuksille vaihtelee. Havaitut poikkeavuudet edustavat siten käsiteltyjen spermatogoniopopulaatioiden kokonaisvastetta, jossa hallitsevassa asemassa ovat muita suurempina määrinä esiintyvät erilaistuneet spermatogoniot. Eri sukupolviin kuuluvien spermatogonioiden yhteys yleiseen verenkiertoon riippuu niiden sijainnista kiveksissä. Kaikki spermatogoniot eivät ole yhteydessä verenkiertoon Sertolin solujen muodostaman fysikaalisen ja fysiologisen esteen ja veri-kivesesteen vuoksi.

Jos on saatu viitteitä siitä, että tutkittava aine tai sen reaktiivinen metaboliitti ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenyhtymisenä samassa kohdassa.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidien siirtymä.

Numeerinen poikkeavuus: testissä käytetyille eläimille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (n) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä (3n, 4n jne.).

Rakenteellinen poikkeama: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esim. kolkisiini tai Colcemid®). Tämän jälkeen itusoluista valmistetaan kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevista soluista analysoidaan kromosomipoikkeavuudet.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelu**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Yleisesti käytettyjä eläinlajeja ovat kiinanhamsteri- ja hiiriurokset. Myös muiden soveltuvien nisäkäslajien uroksia voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään +/− 20 % keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa mainitut, mutta kosteustavoitteen on oltava 50—60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret täysikasvuiset urokset jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista.

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa spermatogonioissa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia *in vivo* altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna.

Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Positiivinen kontrolliaine voidaan antaa eri reittiä pitkin kuin testattava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Aine	CAS-nro	EINECS-nro
syklofosfamidi syklofosfamidimonohydraatti	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
sykloheksyyliamiini	108-91-8	203-629-0
mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
monomeerinen akryyliamidi	79-06-1	201-173-7
trietyleenimelamiini	51-18-3	200-083-5

Pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta saaneista negatiivisista kontrolleista, joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenottokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistaajuudessa ovat hyväksyttävällä tasolla. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleilla aikaisemmin tehdyt tutkimukset tai julkaistut tulokset osoittavat, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa urosta.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavia aineita tulisi antaa mieluiten kerran tai kaksi kertaa (kerta-annoksena tai kahtena altistuksena). Ne voidaan antaa myös jaettuina annoksina eli kahtena altistuksena saman päivän aikana vain muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista. Muunlaiset annosteluohjelmat on perusteltava tieteellisesti.

Suurinta annosta saavassa ryhmässä käytetään kahta näytteenottokertaa altistuksen jälkeen. Koska tutkittava aine voi vaikuttaa solusyklin kinetiikkaan, näytteet kerätään yhtenä aikaisempana ja yhtenä myöhempänä ajankohtana noin 24—48 tunnin kuluttua altistuksesta. Muissa kuin suurimmassa annosryhmässä näytteet kerätään kerran 24 tunnin tai 1,5 solusyklin kuluttua altistuksesta, paitsi jos jonkin muun näytteenottoajankohdan tiedetään soveltuvan paremmin vaikutusten toteamiseen (6).

Näytteitä voidaan ottaa lisäksi myös muina ajankohtina. Varhaisemmat näytteenottoajat saattavat olla perusteltuja esimerkiksi testattaessa kemiallisia aineita, jotka voivat aiheuttaa kromosomien hidastumista (lagging) tai joilla saattaa olla S-vaiheesta riippumattomia vaikutuksia (1).

Toistuvien altistusten soveltuvuus on osoitettava tapauskohtaisesti. Toistuvan altistuksen jälkeen eläimet on lopetettava 24 tunnin (1,5 solusyklin) kuluttua viimeisestä altistuksesta. Tarvittaessa voidaan käyttää ylimääräisiä näytteenottokertoja.

Ennen lopettamista eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos ainetta, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esim. Colcemid®ia tai kolkisiinia). Elämistä otetaan näytteet sopivan ajan kuluttua tämän jälkeen. Hiirillä tämä väli on noin 3—5 tuntia; kiinanhamstereilla se on noin 4—5 tuntia.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (7). Mikäli myrkkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostasoa. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaan annosteluohjelmaan perustuvien suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan.

Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), saattavat edellyttää muita annoksenmäärityskriteerejä, ja ne pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkkyvaikutukseen viittaavia muutoksia spermatogonioissa (esim. spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin on pienentynyt; tämä pieneneminen ei saa olla yli 50 %).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg eläimen painokiloa kohti vuorokaudessa (mg/kg/vrk) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivän aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Kromosomipreparaattien valmistus**

Heti eläinten lopettamisen jälkeen toisesta kiveksestä tai molemmista kiveksistä otetaan solususpensioita, jotka pannaan hypotoniseen liuokseen ja fiksoidaan. Tämän jälkeen solut levitetään objektilaseille ja värjätään.

1.5.7 **Analyysi**

Jokaista eläintä kohti tulisi analysoida vähintään 100 hyvin levinnyttä metafaasia (vähintään 500 metafaasia/ryhmä). Tätä määrää voidaan pienentää, jos havaitaan runsaasti poikkeavuuksia. Kaikki objektilasit, myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska fiksaatiotoimenpiteet johtavat usein joidenkin metafaasien rikkoutumiseen ja kromosomien menetykseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua 2n ± 2.

2 **TULOKSET**

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Eläinkohtaiset tiedot on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Jokaisesta yksittäisestä eläimestä on arvioitava rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien lukumäärä solua kohti. Eri tyyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava, ja niiden lukumäärä ja esiintymistaajuus koe- ja kontrolliryhmien osalta on ilmoitettava. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan, mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuteen.

Jos havaitaan sekä mitoosia että meioosia, spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin on määritettävä sytotoksisuuden mittana kaikista tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä ja negatiivisista kontrolleista yhteensä 100 jakautuvan solun näytteestä eläintä kohti mahdollisen sytotoksisen vaikutuksen osoittamiseksi. Jos tarkastellaan ainoastaan mitoosia, mitoosi-indeksi on määritettävä vähintään 1 000 solusta jokaista eläintä kohti.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten annoksesta riippuva kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen suhteellisen lukumäärän suureneminen tai kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisen annoksen osalta yhdellä näytteenottokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (8). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä testattavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Spermatogonioiden *in vivo* -kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin itusoluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin itusoluissa.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä kohdekudokseen on pohdittava.

3 **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä ja ikä,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Koeolosuhteet:

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— annostasojen valintaperusteet,

— antotavan valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— eläinten lopettamisajankohtien perustelut,

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenkeräysohjelmasta,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— metafaasin pysäyttämisessä käytetty aine, sen pitoisuus ja käsittelyn kesto,

— objektilasien valmistusmenetelmät,

— kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit,

— analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti,

— kriteerit, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— mitoosi-indeksi,

— spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäisiin ja toisiin meioottisiin metafaaseihin,

— kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen,

— kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti,

— kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ryhmää kohti,

— annos-vastesuhde, mikäli mahdollista,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tulokset,

— aikaisemmat negatiivisesta kontrollista saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— rinnakkaisten positiivisten kontrollien tulokset,

— ploidian muutokset, jos niitä esiintyy.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4 **KIRJALLISUUTTA**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, s. 477—484.

(2) Adler, I. D., (1984), Cytogenetic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 275—306.

(3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E., (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, s. 289—294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.) *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Subcomittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115—141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, s. 207—209.

(6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, s. 313—318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 313—319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184—232."

Liite 4G

"B.39 UDS-TESTI NISÄKKÄIDEN MAKSASOLUILLA *IN VIVO*

1 MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäiden maksasoluilla *in vivo* tehtävän UDS-testin (unscheduled DNA Snthesis (UDS) test) tarkoituksena on tunnistaa tutkittavat aineet, jotka aiheuttavat DNA:n korjautumista altistettujen eläinten maksasoluissa (1) (2) (3) (4).

Tällä *in vivo* -testillä voidaan tutkia kemiallisten aineiden genotoksisia vaikutuksia maksassa. Mitattava tulostapahtuma ilmaisee DNA-vaurion ja sen myöhemmän korjautumisen maksasoluissa. Elimistöön imeytyvät kemialliset aineet metaboloituvat yleensä pääasiassa maksassa. Se soveltuu siten hyvin DNA-vaurioiden mittaamiseen *in vivo*.

Jos on saatu viitteitä siitä, että tutkittava aine ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Lopputapahtuma, S-vaiheen ulkopuolinen DNA-synteesi (unscheduled DNA-synthesis), mitataan määrittämällä radioaktiivisesti merkittyjen nukleosidien inkorporoitumista DNA:han solunjakautumissyklin S-vaiheen ulkopuolella. Yleisimmin käytetty menetelmä on tritiumilla merkityn tymidiinin (^{3}H-TdR) inkorporoitumisen määrittäminen autoradiografisesti. *In vivo* UDS-testeissä käytetään pääasiassa rotan maksaa. Myös muita kudoksia kuin maksaa voidaan käyttää, mutta niitä ei kuvata tämän menetelmän yhteydessä.

UDS-vasteen toteaminen riippuu irtileikkautuneiden ja korvautuneiden DNA-segmenttien lukumäärästä vauriokohdassa. UDS-testi on sen vuoksi erityisen arvokas kemiallisten aineiden aiheuttamien 'pitkien DNA-pätkien korjautumisten' ('longpatch repair') (20—30 mästä) toteamisessa. Testin herkkyys on sen sijaan huomattavasti heikompi 'lyhyiden pätkien korjautumisen' ('shortpatch repair') (1—3 emästä) toteamisessa. Mutageenisia muutoksia saattaa lisäksi syntyä DNA-vaurioiden korjautumattomuuden, korjautumisvirheiden tai kahdentumisvirheiden seurauksena. UDS-vasteen laajuus ei anna viitteitä korjausprosessien luotettavuudesta. On myös mahdollista, että mutageeni reagoi DNA:n kanssa mutta DNA-vaurio ei korjaudu leikkautumis-korjautumisprosessin kautta. Koska tämä lopputapahtuma mitataan koko genomista, sen potentiaalinen herkkyys kompensoi sitä, ettei UDS-testi tuota spesifistä tietoa tutkittavan aineen mutageenisesta aktiivisuudesta.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Korjautuvat solut: jyvästen nettomäärä tumissa eli NNG-arvo on suurempi kuin etukäteen asetettu arvo, joka on määriteltävä testin suorittavassa laboratoriossa.

NNG-arvo (net nuclear grains): solujen UDS-aktiivisuuden kvantitatiivinen mitta autoradiografialla tehdyissä UDS-testeissä laskettuna siten, että sytoplasmisten jyvästen keskimääräinen lukumäärä tumaa vastaavilla sytoplasma-alueilla (CG) vähennetään tumissa havaittavien jyvästen (NG) lukumäärästä (NG): NNG = NG − CG. NNG-määrät lasketaan yksittäisistä soluista, minkä jälkeen luvut yhdistetään saman viljelmän solujen osalta, rinnakkaisviljelmien solujen osalta jne.

UDS (Unscheduled DNA Synthesis): DNA:n korjautumissynteesi sen jälkeen, kun kemiallisten aineiden tai fysikaalisten tekijöiden aiheuttaman vaurion alueen sisältävä DNA-jakso on leikkautunut irti ja poistunut kromosomista.

1.3 TESTIN PERIAATE

UDS-testi nisäkkään maksasoluilla *in vivo* osoittaa DNA korjautumissynteesin sen jälkeen, kun kemiallisten aineiden tai fysikaalisten tekijöiden aiheuttaman vaurion alueen sisältävä DNA-jakso on leikkautunut irti ja poistunut kromosomista. Testi perustuu yleensä ^{3}H-TdR:n inkorporoitumiseen solujen DNA:han maksassa, jossa on yleensä vain vähän solusyklin S-vaiheessa olevia soluja. ^{3}H-TdR:n inkorporoituminen määritetään yleensä autoradiografisesti, sillä tämä tekniikka ei ole herkkä S-vaiheessa oleville soluille kuten esimerkiksi nestetuikelaskenta.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Testin valmistelut**

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Yleisesti käytetty eläinlaji on rotta, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa mainitut, mutta kosteustavoitteen on oltava 50—60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viisi päivää ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne ehtivät sopeutua laboratorio-olosuhteisiin.

1.4.1.4 *Tutkittava aine / valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli se on mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen itsenäisesti suoritettavaan testin osaan on otettava mukaan rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrolliaineiden on oltava aineita, joiden tiedetään aiheuttavan UDS-reaktion, kun niitä annetaan pitoisuuksina, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Metabolista aktivaatiota vaativia positiivisia kontrolliaineita on käytettävä annoksina, jotka aiheuttavat kohtalaisen vasteen (4). Annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät heti paljasta lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Näytteidenottoajat	Aine	CAS-nro	EINECS-nro
Varhaiset näytteidenottoajat (2—4 tuntia)	N-nitrosodimetyyliamiini	62-75-9	200-249-8
Myöhäiset näytteidenottoajat (12—16 tuntia)	N-2-fluorenyyliasetamidi (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Myös muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää. Positiiviset kontrolliaineet voidaan antaa myös muuta reittiä pitkin kuin testattava aine.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Koe-eläinten määrän on oltava riittävä testivasteen luonnollinen biologinen vaihtelu huomioon ottaen. Analysoitavissa olevia eläimiä on oltava vähintään kolme ryhmää kohti. Mikäli merkittävä tietokanta on kerätty jo aikaisemmin, rinnakkaisiin negatiivisiin ja positiivisiin kontrolliryhmiin tarvitaan vain yksi tai kaksi eläintä.

Vain toista sukupuolta, mieluiten uroksia, voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla ja samalla altistustavalla tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavia aineita annetaan yleensä yhtenä altistuksena.

1.5.3 **Annostasot**

Normaalisti käytetään vähintään kahta annostasoa. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samalla annosteluohjelmalla suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Pienemmän annoksen pitäisi yleensä olla 50—25 % suuresta annoksesta.

Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), saattavat edellyttää muita annoksenmäärityskriteerejä, ja ne pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa annosteluohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää.

Suurin annos voidaan määritellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia maksassa (esim. pyknoottisia tumia).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2 000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivänä aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus ei ehkä ole välttämätön. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Vatsaontelonsisäistä annostelua ei kuitenkaan suositella, koska maksa saattaisi tällöin altistua tutkittavalle aineelle suoraan eikä verenkierron kautta. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Maksasolujen preparointi**

Maksasolut preparoidaan tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä yleensä 12—16 tunnin kuluttua annostelusta. Ylimääräinen varhaisempi näytteenottoajankohta (yleensä 2—4 tunnin kuluttua altistuksesta) on yleensä tarpeen, ellei selvää positiivista vastetta havaita 12—16 tunnin kuluttua. Myös muut näytteidenottoajankohdat ovat kuitenkin mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella toksikokineettisten tutkimustulosten perusteella.

Lyhytaikaisviljelmät nisäkkäiden maksasoluista perustetaan yleensä siten, että maksaa perfusoidaan kollagenaasilla *in situ* ja tuoreiden irronneiden maksasolujen annetaan kiinnittyä sopivaan pintaan. Negatiivisista kontrollieläimistä kerättyjen maksasolujen elinkykyisyyden (5) pitäisi olla vähintään 50 prosenttia.

1.5.7 **UDS:n määrittäminen**

Hiljattain eristettyjä nisäkkäiden maksasoluja inkuboidaan yleensä ^{3}H-TdR:ää sisältävässä kasvatusväliaineessa sopivan pituinen aika, esim. 3—8 tuntia. Inkubaatioajan päätyttyä kasvatusväliaine erotetaan soluista, minkä jälkeen soluja voidaan inkuboida kasvatusväliaineessa, joka sisältää ylimääräistä merkitsemätöntä tymidiiniä inkorporoitumattoman radioaktiivisuuden vähentämiseksi. Tämän jälkeen solut huuhdellaan, fiksoidaan ja kuivataan. Pitempiä inkubaatioaikoja käytettäessä käsittely merkitsemättömällä tymidiinillä ei ehkä ole tarpeen. Objektilasit kastetaan autoradiografiemulsioon, valotetaan pimeässä (esim. säilytetään jääkaapissa 7—14 päivää), kehitetään, värjätään ja lasketaan valottuneet hopeajyväset. Jokaisesta eläimestä valmistetaan 2—3 objektilasia.

1.5.8 **Analyysi**

Objektilasipreparaattien tulisi sisältää riittävästi soluja, joiden morfologia on normaali, jotta luotettava UDS-analyysi voidaan tehdä. Preparaateista tehdään mikroskooppitutkimus selvän sytotoksisuuden merkkien havaitsemiseksi (esim. pyknoosi, radioaktiivisuuden väheneminen).

Objektilasit on koodattava ennen jyvästen laskemista. Normaalisti jokaisesta eläimestä lasketaan 100 solua vähintään kahdesta objektilasista; jos lasketaan alle 100 solua/eläin, tämä on perusteltava. Jyvästen määrää ei lasketa S-vaiheessa olevista tumista, mutta S-vaiheessa olevien solujen suhteellinen osuus voidaan rekisteröidä.

Morfologisesti normaalien solujen tumaan ja sytoplasmaan inkorporoituneen ^{3}H-TdR:n määrä, joka näkyy hopeajyvästen kertymänä, on määritettävä soveltuvilla menetelmillä.

Hopeajyvästen määrä määritetään tumien kohdalta (tumassa esiintyvät jyväset, NG) ja tumaa vastaavilta alueilta sytoplasman kohdalta (sytoplasmiset jyväset, CG). CG-määrät mitataan joko valitsemalla sytoplasmasta kaikkein eniten radioaktiivisesti merkittyä ainetta sisältävä alue tai valitsemalla keskimäärin kaksi tai kolme satunnaisesti valittua tuman vierestä laskettua sytoplasmisten jyvästen määrää. Myös muita laskentamenetelmiä (esim. kokosolulaskentaa) voidaan käyttää, jos ne voidaan perustella (6).

2 TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Jokaisen objektilasin ja jokaisen eläimen tiedot on esitettävä erikseen. Lisäksi kaikkien tietojen yhteenveto on esitettävä taulukkomuodossa. Tumassa esiintyvien jyvästen nettomäärät (NNG) on laskettava jokaisesta solusta, jokaisesta eläimestä ja jokaisesta annoksesta ja ajankohdasta erikseen vähentämällä CG-lukemat NG-lukemista. Jos 'korjautuvat solut' lasketaan, käsitteen 'korjautuvat solut' kriteerit on perusteltava ja niiden on perustuttava negatiivisista kontrolleista aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saatuihin tietoihin. Numeeriset tulokset voidaan arvioida tilastollisin menetelmin. Jos tilastollisia testejä käytetään, ne on valittava ja perusteltava ennen tutkimusta.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Esimerkkejä positiivisten/negatiivisten vasteiden kriteereistä:

positiivinen	i)	NNG-arvot ovat aikaisemmin asetettujen, laboratoriokohtaisiin vertailuarvoihin perustuvien kynnysarvojen yläpuolella;
tai	ii)	NNG-arvot ovat merkitsevästi suurempia kuin rinnakkaisessa kontrollissa;
negatiivinen	i)	NNG-arvot ovat laboratoriokohtaisiin vertailuarvoihin perustuvan kynnysarvon tasalla tai sen alapuolella;
tai	ii)	NNG-arvot eivät ole merkitsevästi suuremmat kuin rinnakkaisessa kontrollissa.

Tulosten biologista merkitystä on pohdittava: huomioitavia parametrejä ovat eläinten väliset erot, annos-vastesuhde ja sytotoksisuus. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa. Tilastollinen merkitsevyys ei saa kuitenkaan olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Nisäkkäiden maksasoluissa *in vivo* tehdyssä UDS-testissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa nisäkkäiden maksasoluissa *in vivo* DNA-vaurioita, jotka S-vaiheen ulkopuolinen DNA-synteesi (unscheduled DNA synthesis) voi korjata *in vitro*. Negatiivinen tulos osoittaa, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa sellaisia DNA-vaurioita, jotka voidaan todeta tällä testillä.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen on pohdittava.

3 RAPORTOINTI

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine:

— kantaja-aineen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuottimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa.

Koe-eläimet:

— käytetty eläinlaji/kanta,

— eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

— hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.,

— eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä.

Koeolosuhteet:

— positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit,

— mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset,

— annostasojen valintaperusteet,

— tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat,

— tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat,

— antotavan valintaperusteet,

— menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen tarvittaessa,

— ravintoon/juomaveteen sekoitetun testattavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk) tarvittaessa,

— yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta,

— yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenotto-ohjelmasta,

— myrkkyvaikutuksen mittausmenetelmät,

— maksasolujen preparointi- ja viljelymenetelmä,

— käytetty autoradiografinen tekniikka,

— preparoitujen objektilasien lukumäärä ja laskettujen solujen lukumäärät,

— arviointikriteerit,

— kriteerit, joiden perusteella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

— tumassa esiintyvien jyvästen määrien, sytoplasmisten jyvästen määrien ja tumassa esiintyvien jyvästen nettomäärien keskiarvot yksittäistä objektilasia, eläintä ja ryhmää kohti,

— mahdollinen annos-vastesuhde,

— mahdolliset tilastolliset analyysit,

— myrkkyvaikutuksen merkit,

— rinnakkaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollien tulokset,

— aikaisemmat negatiivisilla (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisilla kontrolleilla saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat,

— 'korjautuvien solujen' lukumäärä, jos määritetty,

— S-vaiheessa olevien solujen lukumäärä, jos määritetty,

— solujen elinkykyisyys.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4 **KIRJALLISUUTTA**

(1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, s. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, s. 123-133.

(3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland, D. J. and Fox, M., (eds) *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 52-77.

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *in Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, s. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo*/*In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, s. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo*/*In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, s. 553-562."

LIITE 5

SV:

3.2.3. *Farligt*

R65 Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.

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

a) För ämnen och beredningar som innehåller alifatiska, alicykliska och aromatiska kolväten i en total koncentration av 10 % eller mer och

— har en flödestid mindre än 30 sekunder, uppmätt med en 3 mm utloppsbägare enligt ISO 2431, eller

— har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m^2/s vid 40 °C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas , enligt ISO 3104 och ISO 3105, eller

— har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m^2/s vid 40 °C, bestämd från rotationsviskosimetri enligt ISO 3219.

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

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

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske DE toisintoa))

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske IT toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

FI:

3.2.6.1 *Ihon tulehtuminen*

Seuraava vaaraa osoittava lauseke määräytyy alla esiteltävien perusteitten mukaan:

R38 Ärsyttää ihoa

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

Ihon tulehdus on merkittävää, jos:

a) punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo laskettuna kaikista koe-eläimistä on vähintään 2;

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

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

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

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

— Aineet ja valmisteet, jotka aiheuttavat ihmisillä merkittävää ihotulehdusta, kun kosketus on ollut välitön, jatkuva tai toistuva.

— Orgaaniset peroksidit, paitsi jos on olemassa näyttöä siitä, että tällaista vaikutusta ei ole.

Tuntoharha ('paresthesia'):

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

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske DE toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske IT toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske SV toisintoa)

6.2 kohdassa (Aineiden ja valmisteiden käyttöä koskevat turvallisuusohjeet):

DE:

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

— Anwendungsbereich:

  — sehr giftige, giftige oder ätzende Stoffe und Zubereitungen;

— Verwendung:

  — *obligatorisch* für sehr giftige Stoffe und Zubereitungen;

  — empfohlen für sonstige obengenannte Stoffe und Zubereitungen, inbesondere, wenn Wasser nicht die geeignete Spülflüssigkeit ist;

  — empfohlen für ätzende Stoffe und Zubereitungen, die an die allgemeine Öffentlichkeit abgegeben werden.

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske IT toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske FI toisintoa)

(Ei koske SV toisintoa)

FI:

S 29 Ei saa tyhjentää viemäriin

— Soveltamisala:

  — erittäin helposti syttyvät tai helposti syttyvät veteen sekoittumattomat nesteet,

  — erittäin myrkylliset tai myrkylliset aineet ja valmisteet,

  — ympäristölle vaaralliset aineet.

— Käytön perusteet:

  — *pakollinen* yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville ympäristölle vaarallisille ja tunnuksella N luokitelluille aineille, jollei kyseessä ole aineen tarkoitettu käyttö,

  — suositeltava yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville muille edellä mainituille aineille tai valmisteille, jollei kyseessä ole kemikaalin tarkoitettu käyttö.

(Ei koske ES toisintoa)

(Ei koske DA toisintoa)

(Ei koske DE toisintoa)

(Ei koske EL toisintoa)

(Ei koske EN toisintoa)

(Ei koske FR toisintoa)

(Ei koske IT toisintoa)

(Ei koske NL toisintoa)

(Ei koske PT toisintoa)

(Ei koske SV toisintoa)

LIITE 6

"LIITE IX

OSA A

Lapsiturvallisia sulkimia koskevat määräykset

Sen lisäksi mitä säädetään tämän direktiivin 22 artiklan 1 kohdan e alakohdassa, kaiken kokoiset päällykset, jotka sisältävät aineita, jotka aiheuttavat keuhkovaurion vaaraa (aspiraatiovaaraa) (Xn; R65) ja jotka on luokiteltu ja merkitty tämän direktiivin liitteessä VI olevan 3.2.3 kohdan mukaisesti, on varustettava lapsiturvallisilla sulkimilla, lukuun ottamatta aineita, jotka on saatettu markkinoille aerosoleina tai päällyksissä, joihin on asennettu sinetöity spraysuutin.

1. *Uudelleen suljettavat päällykset*

   Uudelleen suljettavissa päällyksissä käytettävien lapsiturvallisten sulkimien on oltava Kansainvälisen standardointijärjestön (ISO) standardin ISO 8317 'Lapsiturvalliset pakkaukset. Uudelleen suljettavia pakkauksia koskevat vaatimukset ja testausmenetelmät' (1. heinäkuuta 1989 julkaistu painos) mukaisia.

2. *Päällykset, joita ei voi sulkea uudelleen*

   Sellaisissa päällyksissä, joita ei voi sulkea uudelleen, käytettävien lapsiturvallisten sulkimien on oltava Euroopan standardointikomitean (CEN) standardin EN 862 'Pakkaukset. Lapsiturvalliset pakkaukset. Muiden tuotteiden kuin lääkkeiden pakkaamiseen käytettäviä pakkauksia, joita ei voi sulkea uudelleen, koskevat vaatimukset ja testausmenetelmät' (maaliskuussa 1997 julkaistu painos) mukaisia.

3. *Huomautuksia*

   1. Vain laboratorioilla, jotka ovat osoittaneet noudattavansa EN 45 000 -sarjan eurooppalaisia standardeja, on oikeus varmentaa, että tuotteet ovat edellä mainittujen standardien mukaisia.

   2. Erityistapaukset

      Jos näyttää ilmeiseltä, että päällys on riittävän turvallinen lapsille, koska lapset eivät pääse sen sisältöön käsiksi ilman työkaluja, testiä ei tarvitse suorittaa.

      Kaikissa muissa tapauksissa ja kun on riittävät perusteet epäillä tietyn sulkimen lapsiturvallisuutta, kansalliset viranomaiset voivat pyytää tuotteen markkinoille saattamisesta vastaavaa henkilöä toimittamaan edellä kohdassa 3.1 kuvatun testauslaboratorion antaman todistuksen siitä, että

      — käytetyn sulkimen tyyppi on sellainen, ettei sitä tarvitse testata edellä mainittujen ISO- ja CEN-standardien mukaisesti,

        tai

      — suljin on testattu, ja sen on todettu olevan edellä mainittujen standardien mukainen.

OSA B

Näkövammaisille tarkoitettuja vaaratunnuksia koskevat määräykset

Näkövammaisille tarkoitettujen vaaratunnusten teknisten eritelmien on oltava kosketeltavia varoitusmerkintöjä koskevan standardin EN ISO 11683 'Pakkaukset — Vaatimukset näkövammaisille tarkoitetuille vaaratunnuksille' (vuoden 1997 painos) mukaisia."