

ser. 4
S 13

Ontwikkeling van methoden voor het vaststellen van mogelijke blootstelling aan mutagene en carcinogene stoffen in de industrie

2^e ex

Literatuurstudie

Uitgevoerd in opdracht van het Directoraat-Generaal van de Arbeid door het Medisch Biologisch Laboratorium TNO (MBL)

Directoraat-Generaal van de Arbeid



575.224:613.632:616-006.6:616-074/-076
biol. monitoring

GRAB JC

Ontwikkeling van methoden voor het vaststellen van mogelijke blootstelling aan mutagene en carcinogene stoffen in de industrie

Literatuurstudie

Uitgevoerd in opdracht van het Directoraat-Generaal van de Arbeid door het Medisch Biologisch Laboratorium TNO (MBL)

Auteurs:

J.D. Jansen
P.H.M. Lohman
F. Berends

Nederlands Instituut voor
Arbeidsomstandigheden NIA
bibliothek-documentatie-informatie
De Boelelaan 30, Amsterdam-Buitenveldert

ISN-nr.
plaats
datum

13634
Ser. 4 S B, 2e ex

oktober 1985

TEN GELEIDE

In het kader van een door het Directoraat-Generaal van de Arbeid gesubsidieerd onderzoeksprogramma "Ontwikkeling van methoden voor het vaststellen van mogelijke blootstelling aan mutagene en carcinogene stoffen in de industrie" is door het Medisch Biologisch Laboratorium TNO (MBL) een literatuurstudie opgesteld. Deze literatuurstudie biedt een overzicht van methoden, die nu reeds voorhanden of in ontwikkeling zijn, om mogelijke blootstelling aan DNA beschadigende stoffen bij werknemers op te kunnen sporen. De studie illustreert dat veel van deze methoden zich in het experimentele stadium bevinden en als zodanig nog niet geschikt zijn om binnen de bedrijfsgezondheidszorg te worden toegepast. Verder blijkt uit deze studie dat een schatting van het risico bij geconstateerde blootstelling vooralsnog niet mogelijk is.

Het lopende onderzoeksprogramma, waarin het MBL en het Farmacologisch Laboratorium van de Katholieke Universiteit Nijmegen participeren, zal, mede op basis van de resultaten van deze literatuurstudie, er toe kunnen bijdragen, dat er in deze lacunes wordt voorzien. Naar gehoopt wordt zullen deze onderzoeken er toe bijdragen dat praktisch toepasbare methoden voor de gezondheidsbewaking van werknemers in het kader van de bedrijfsgezondheidszorg beschikbaar komen.

Bij deze publikatie wordt opgemerkt dat - voor zover van toepassing - de weergegeven meningen voor verantwoordelijkheid van de auteurs komen.

| <u>INHOUDSOPGAVE</u> | pag. |
|---|------|
| 1. INLEIDING | 5 |
| 1.2 Theoretische achtergrond | 5 |
| 2. DEFINITIES | 14 |
| 3. VRAAGSTELLING VOOR BIOMONITORING | 17 |
| 4. BESTAANDE METHODIEKEN VOOR BIOLOGISCHE MONITORING | 18 |
| 4.1 Niet-stofgebonden biologische monitoring | 18 |
| 4.2 Interpretatie en eisen voor interpreteerbare gegevens van methoden | 25 |
| 4.3 Gevoeligheid van niet-stofgebonden methodieken | 29 |
| 4.4 Stofgebonden biologische monitoring | 30 |
| 5. NIEUWE BIOCHEMISCHE EN BIOLOGISCHE METHODIEKEN VOOR BIOLOGISCHE MONITORING | 32 |
| 5.1 Niet-stofgebonden | 32 |
| 5.2 Stofgebonden biologische monitoring | 34 |
| 6. CONCLUSIES | 36 |
| 7. LITERATUURLIJST | 38 |
| 8. APPENDIX | 47 |

1. INLEIDING

Ten behoeve van de gezondheidskundige begeleiding van werknemers is het wenselijk om in bedrijven te kunnen vaststellen of er expositie aan genotoxische carcinogenen bestaat en, zo ja, of dit een risico is voor het ontstaan van beroepskanker en hoe groot het risico is. Minstens even belangrijk is het te kunnen vaststellen of er voor de werknemers een risico bestaat op het ontstaan van erfelijke schade die wordt overgedragen op de nakomelingen.

Helaas zijn geen methoden beschikbaar om erfelijke risico's bij mensen routinematig te bepalen. Zelfs bij het best onderzochte genotoxische agens, ioniserende straling, heeft men een dergelijk risico niet kunnen aantonen: na intensief en langdurig onderzoek bij de nakomelingen van de slachtoffers van Nagasaki en Hiroshima heeft men (nog) geen erfelijke schade, veroorzaakt door de straling van de atoombom, kunnen vaststellen (Schull et al., 1981; Bora et al., 1982). De wetenschappelijke mogelijkheden voor het vaststellen van expositie aan genotoxische carcinogenen zijn gelukkig verder ontwikkeld en dit overzicht zal zich dan ook (moeten) beperken tot een bespreking van de methodes om expositie aan genotoxische carcinogenen aan te tonen.

1.2 Theoretische achtergrond

Epidemiologische en experimentele gegevens duiden er op dat kankervorming een multicausaal proces is waarbij velerlei factoren een rol spelen, waaronder ook erfelijke.

Bij het ontstaan van kanker zijn verscheidene fasen experimenteel - en gedeeltelijk klinisch - te onderscheiden. In de eerste fase - initiatie genoemd - verandert de normale cel op zodanige wijze dat de cel in principe in staat is tot een kankercel uit te groeien. Hoewel het initiatieproces in alle onderzochte gevallen irreversibel is gebleken, zal een geïnitieerde cel zich niet altijd gaan vermeerderen of zelfs maar blijven bestaan. Er wordt veelal aangenomen dat het essentiële proces in de initiatiefase een mutatie is die plaats vindt in een somatische cel (d.i. alle lichaamscellen behalve de geslachtscellen). Onder mutatie wordt verstaan een blijvende verandering in het genetische materiaal van de cel. (Als de mutatie in een geslachtscel plaats vindt, kan een erfelijke afwijking ontstaan.)

Individuele gefinitieerde cellen kunnen niet uitgroeien tot een tumor zonder promotie en progressie. Deze begrippen komen voort uit het experimentele kankeronderzoek met dieren. Daarbij kan men goed gedefinieerde proefomstandigheden gebruiken en onder die condities kunnen promotie en progressie duidelijk onderscheiden worden (in operationele zin) zonder dat de processen die er aan ten grondslag liggen daardoor gedefinieerd of begrepen worden.

In de medische praktijksituaties en ook in epidemiologisch onderzoek, zullen hoogstwaarschijnlijk soortgelijke processen een rol van betekenis spelen, maar daar zijn promotie en progressie, in de betekenis die hieraan in het experimentele kankeronderzoek wordt toegekend, niet als zodanig te onderscheiden. Toch worden ook daar deze begrippen gehanteerd, zij het uiteraard met een vagere betekenis. Dit kan moeilijk anders omdat aan de gespecificeerde condities van het dierexperiment bij de mens niet voldaan kan worden. Bovendien hebben de resultaten van het experimentele onderzoek veelal geen algemene geldigheid (worden bijv. slechts bij één species gevonden). In de regel is extrapolatie naar de mens niet mogelijk.

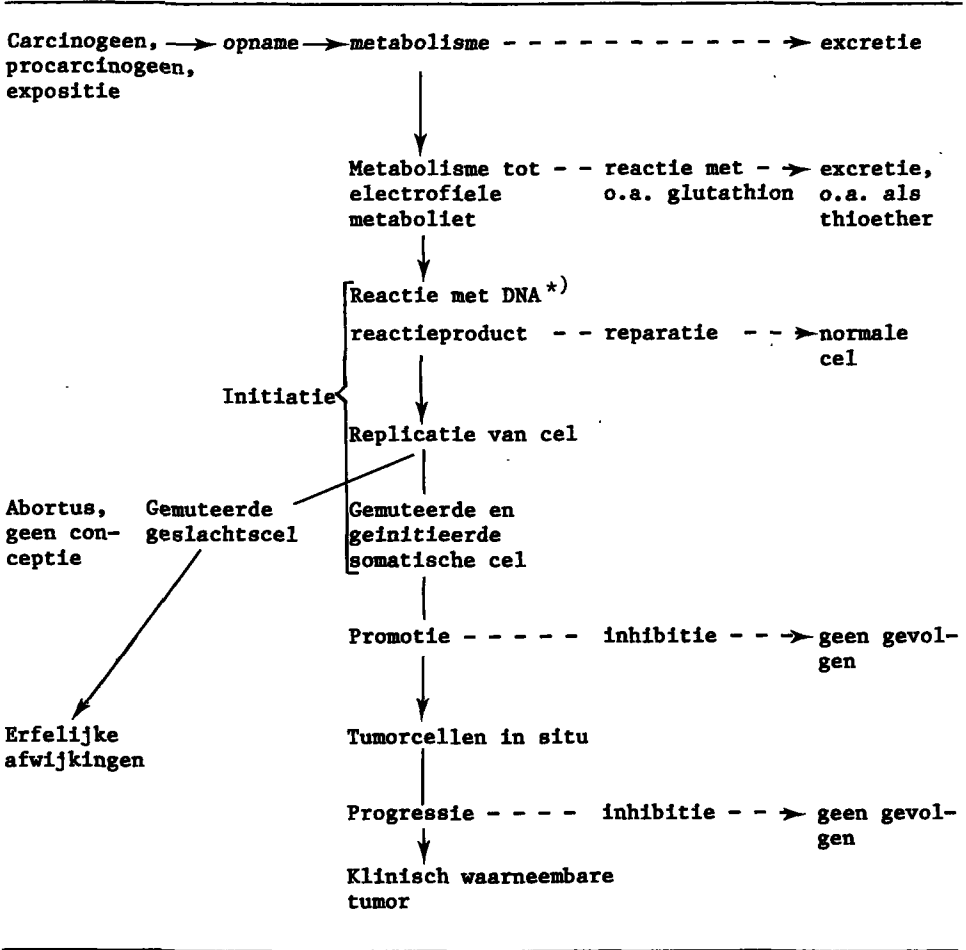
Uit epidemiologische gegevens is bekend dat er ook bij de mens factoren zijn die het verloop van de kankervorming beïnvloeden. Hierbij kan sprake zijn van een bevordering van het kankerproces dan wel van een belemmering. Stoffen met de eerste werking worden promotoren genoemd, de belemmerende stoffen noemt men inhibitoren, maar deze benamingen hebben in dit geval een weinig strikte betekenis. Soortgelijke effecten zijn ook bij dieren waargenomen (in meer algemene proeven, niet die waarbij promotie en progressie per se worden bestudeerd). Gebleken is dat deze promotoren en inhibitoren in verschillende perioden van de carcinogenese werkzaam zijn en op verschillende processen inwerken; processen, die door de woorden promotie en progressie waarschijnlijk onvolledig en vaag worden weergegeven. Bij de weinige stoffen die op beide eigenschappen werden onderzocht (nl. "butylated hydroxy toluene" (BHT) en fenobarbital) bleek dat promotie en inhibitie eigenschappen van dezelfde stof kunnen zijn, afhankelijk van het experimentele protocol. In promotie en progressie kunnen erfelijke factoren een rol spelen.

Recent werd ontdekt dat in het erfelijke materiaal van mens en dier bepaalde genen aanwezig zijn, de zg. onco-genen, die een voorname rol vervullen in het proces van kankervorming. Het verdere onderzoek hiervan zal zeker

belangrijke veranderingen teweegbrengen in onze inzichten in het kankerproces. Deze veranderingen behoeven geenszins te betekenen dat de tegenwoordige opvatting zoals die hierboven is weergegeven, geheel of gedeeltelijk foutief is. Het kan zeer wel alleen de uiteindelijke precisering en detaillering van de tegenwoordige opvatting betekenen. De nu explosief verlopende studie van onco-genen zal echter zeker vele tot nu toe vage begrippen omzetten in wetenschappelijk bewezen zekerheden: of deze zekerheden de tegenwoordige opvatting zullen bevestigen of fundamenteel veranderen is nu nog niet te voorspellen.

De tegenwoordige opvattingen over carcinogenese zijn uitgebreider beschreven door de "International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens" - ICPEMC Task Group 5 on the differentiation between genotoxic and non-genotoxic carcinogens (1984). Een aantal factoren en processen die in de carcinogenese van belang zijn, is in hun samenhang globaal weergegeven in schema 1.

Schema 1 In dit schema is een aantal factoren en processen die in de carcinogenese van belang zijn in hun samenhang globaal weergegeven.



Activeringsreacties zijn in doorgaande lijnen aangegeven, deactiveringsreacties in stippellijnen

*) DNA is het essentiële bestanddeel van de erfmassa (de chromosomen), waarin de erfelijke informatie van een cel ligt opgeslagen; het reactieproduct dat ontstaat zal veelal een adduct met DNA zijn en zal daarom in dit manuscript vaak met DNA-adduct worden aangeduid.

Hierbij moet het volgende worden opgemerkt:

a Dit schema omvat alleen zgn. genotoxische carcinogenen, d.w.z. carcinogenen waarbij de oorspronkelijke cel-lesie wordt verondersteld een mutatie (= permanente verandering in de erfmassa) te zijn; dit proces wordt initiatie genoemd.

b Sommige carcinogenen hebben een ander werkingsmechanisme, dat niet past in dit schema (asbest en benzeen zijn voorbeelden).

c Het is niet a priori uitgesloten dat er DNA-beschadigende stoffen bestaan die tot het ontstaan van kanker bijdragen, niet doordat ze initiatie teweegbrengen maar doordat ze in een andere fase in het proces ingrijpen.

d Het is niet bekend hoe belangrijk het initiatieproces is in vergelijking met promotie- en progressieprocessen: het is mogelijk dat de achtergrond van reeds aanwezige initiatie (door voeding etc.) zo hoog is dat promotie en progressie limiterend zijn voor het optreden van tumoren en niet initiatie. Het is waarschijnlijk dat de limiterende processen van stof tot stof variëren.

e Hierboven beschreven processen van reparatie, metabolisme en inhibitie hebben een beperkte capaciteit. Daarom is het mogelijk dat bijv. reparatie processen effectief zijn bij relatief geringe exposities maar weinig effect sorteren bij zeer sterke blootstellingen zoals die, zeker in het verleden, in de chemische industrie voorkwamen (bijv. in de vroegere polyvinylchloride (PVC) industrie en in de vroegere, nu verboden productie van aromatische aminen zoals β -naftylamine en 4-aminodifenyl in de VS en Engeland).

Ongeveer 25% van de tegenwoordige mortaliteit in Nederland wordt door kanker veroorzaakt, waarvan waarschijnlijk slechts een gering deel kan worden toegeschreven aan beroepsmatige blootstelling. Bij die hoge achtergrond is het meestal een moeilijk vraagstuk om het door bepaalde chemische expositie veroorzaakte risico kwalitatief aan te tonen en daarna kwantitatief te bepalen.

Voor sommige beroepsgebonden kanker-risico's is dit toch mogelijk gebleken, zoals twee voorbeelden kunnen illustreren. Het meest overtuigende bewijs voor de carcinogeniteit van β -naftylamine bij de mens is dat in een engels bedrijf alle 18 distillateurs van deze stof blaaskanker kregen waaraan allen overleden behalve één, die na de diagnose van blaaskanker bij een auto-ongeluk omkwam (Doll, 1977). In de PVC industrie was het mogelijk om de carcinogeniteit van het vinylchloridemonomeer (VCM) aan te tonen doordat hierdoor een uiterst zeldzame tumor, een angiosarcoom, bleek te worden ge-

induceerd (dezelfde tumor kan overigens ook door overmatige blootstelling aan arseen en thorotrast worden geïnduceerd) (Dalderup et al., 1976).

Veel moeilijker is het om kleine verhogingen in frekwentie voor een meer algemeen voorkomende tumor aan te tonen. Dit is dan ook voornamelijk gelukt in landen met een goedwerkende Kanker Registratie zoals Engeland en Denemarken. In Engeland zijn bijv. tot nu toe de beste epidemiologische gegevens over het mogelijke totale kankerrisico van VCM verkregen (Fox en Collier, 1977) en over de longkankerinductie bij werkers in de (toenmalige) gasindustrie (Doll et al., 1972). In Nederland ontbreekt een Kanker Registratie en het is dan ook moeilijk om hier langs epidemiologische weg beroepsgebonden kanker aan te tonen. Bij ons weten is alleen asbest in Nederland geheel overtuigend en kwantitatief aangetoond als een kankerrisico. Bovendien is het vóórkomen van beroepsgebonden blaaskanker zeer waarschijnlijk gemaakt door een ingenieus onderzoek van Fokkens (1982), terwijl de reeds bekende hogere incidentie van adenocarcinoom van de neusholte bij arbeiders in de meubelindustrie (Acheson et al., 1970), ook in Nederland werd bevestigd in een klein onderzoek van Delemarre en Theman (1971). Andere, (wetenschappelijk) minder overtuigende gegevens werden gepubliceerd over longkanker in de chromaat-pigmenten industrie (Frentzel-Beyne, 1983) en over mogelijke effecten van industriële expositie aan aflatoxine (Hayes et al., 1984). Deze resultaten betekenen niet dat in Nederland geen andere beroepsgebonden kankerrisico's voorkomen, maar uitsluitend dat dergelijke risico's in afwezigheid van Kanker Registratie moeilijk te bewijzen zijn (en dat daarom een inderdaad bestaand risico toch wetenschappelijk niet aantoonbaar kan zijn). Anderzijds mag evenmin worden geconcludeerd dat in andere landen aangetoonde risico's noodzakelijkerwijs ook onder Nederlandse omstandigheden voorkomen (bijv. PVC rapport Ned. Industrieën).

Hoewel vaak ongevoelig in vergelijking met bepaalde experimentele methoden, is de epidemiologie toch van het grootste belang, aangezien de meeste kankergevaren voor de mens langs epidemiologische weg ontdekt worden, of definitief worden aangetoond (zoals roken, bepaalde voedingsgewoonten, de erkende beroepscarcinogenen).

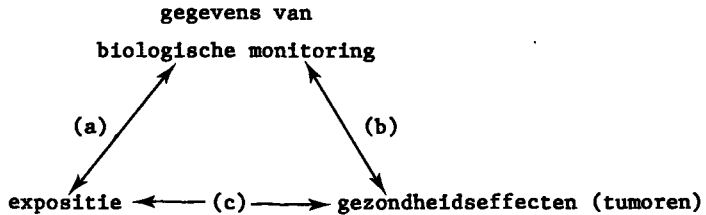
Waar de epidemiologische benadering (nog) niet mogelijk is, zal men langs andere weg moeten proberen aan gegevens te komen over de eventuele blootstelling aan carcinogenen en de daaraan mogelijk verbonden risico's. Een belangrijk punt is hierbij het bepalen welke stoffen als carcinogeen moeten worden aangemerkt. Van slechts zeer weinig verbindingen staat vast dat zij bij de mens kanker kunnen verwekken, en beroepsmatige blootstelling aan deze stoffen is reeds zeer ver teruggedrongen. Het zal dus voornamelijk

gaan om verbindingen waarvan op bepaalde gronden moet worden gevreesd dat zij humane carcinogenen zouden kunnen zijn. Deze vrees kan gebaseerd zijn op diverse soorten gegevens, zoals effecten die zijn gevonden in proefdieren of sterke (chemische) verwantschap met bekende carcinogenen, etc. Als is vastgesteld om welke stoffen het gaat, is het eerste en voorlopig belangrijkste hulpmiddel om de mate van blootstelling te bepalen, het meten van de aanwezigheid van de betreffende verbindingen in de atmosfeer op de werkplek, de zg. omgevings monitoring, al dan niet in de vorm van "personal sampling". Verder zal in situaties waar mogelijk blootstelling plaats vindt of wellicht heeft plaatsgevonden, belangrijke informatie over deze blootstelling, en over de effecten die daar direct het gevolg van zijn, kunnen worden verkregen wanneer betrouwbare methoden van biologische monitoring kunnen worden toegepast.

Biologische monitoring heeft duidelijke voordelen boven het meten van omgevingsconcentraties, omdat hiermee de effectieve "interne" blootstelling wordt bepaald, d.w.z. dat bij de persoon in kwestie zelf wordt vastgesteld hoeveel deze heeft binnengekregen. Bij biologische monitoring worden individuele verschillen in opnamesnelheid en in het vermogen tot het vasthouden van de stof verdisconteerd, wordt rekening gehouden met eventueel intensiever ademen bij zwaardere lichamelijke inspanning of met persoonlijke verschillen in het nemen van voorzorgsmaatregelen, en wordt opname langs andere weg dan de ademhaling mee bepaald. In het algemeen kan worden gesteld dat biologische monitoring, mits zorgvuldig voorbereid en doelgericht uitgevoerd, in principe in staat moet worden geacht om in de soort situaties die hier worden beoogd, tot een voorlopige identificatie te leiden van groepen werknemers die effectief aan (genotoxische) carcinogenen zijn blootgesteld.

Er zijn nu methoden in ontwikkeling die in principe een onderscheid kunnen maken tussen bedrijfsgebonden expositie aan specifieke chemicaliën en de "normale" expositie van de bevolking aan carcinogene invloeden van sigaretten, dagelijkse voeding, levensstijl etc. Na calibratie zijn sommige van deze in ontwikkeling zijnde methodieken mogelijk ook geschikt om in de toekomst het risico voor beroepskanker voor bepaalde verbindingen kwantitatief te bepalen.

De resultaten die met de verschillende technieken voor biologische monitoring worden verkregen, kunnen worden gebruikt zoals weergegeven in het volgende schema:



In de klassieke vorm van biologische monitoring wordt de expositie aan een bepaalde chemische stof gemeten door chemische analyse van deze verbinding - of een metabool daarvan - in bloed, urine, uitademingslucht etc. Bij een ruimere opvatting van het begrip biologische monitoring (vide infra) kan de blootstelling ook bepaald worden op grond van bepaalde effecten die daarvan het gevolg zijn (bijv. het ontstaan van chromosomale abnormaliteiten). Bij beide vormen van monitoring geldt dat na calibratie van de methode, d.w.z. wanneer relatie (a) kwantitatief bekend is, ook de mate van expositie bepaald kan worden. Indien relatie (c) bekend is kan vervolgens een indruk worden verkregen van het met de expositie gepaard gaande risico. Ook als relatie (a) niet bekend is maar de chemische stof is bekend als een carcinogeen of wordt ervan verdacht dat te zijn, kan biologische monitoring nog altijd nuttig zijn om vast te stellen of blootstelling heeft plaatsgevonden, en vervolgens om de efficiëntie van industriële hygiënische maatregelen te bepalen, mits bekend is dat de meetresultaten min of meer evenredig met de mate van expositie variëren. In geval de relatie tussen biologische monitoring gegevens en ziekte (tumoren)(b) kwantitatief bekend zou zijn, zouden de gegevens direct gebruikt kunnen worden om het risico voor het ontstaan van tumoren vast te stellen.

Het moet benadrukt worden dat voor alle technieken van biologische monitoring geldt dat ze pas interpreteerbaar zijn indien ze gecalibreerd zijn. Deze calibratie is niet zozeer afhankelijk van de techniek maar van gegevens die op andere wijze, onafhankelijk verkregen zijn. Zo zijn loodbepalingen in bloed uiterst informatief voor het bepalen van een gezondheidsrisico, niet per se maar omdat Kehoe vastgesteld had dat beneden bepaalde concentraties geen loodvergiftiging optrad.

Biologische monitoring methoden voor genotoxische stoffen kunnen in twee groepen worden verdeeld, nl. methoden die niet-stofgebonden zijn maar een algemeen effect meten dat door veel chemische stoffen veroorzaakt kan worden, en methoden die stofgebonden zijn, d.w.z. uitsluitend de blootstelling aan één gedefinieerde chemische stof meten. Beide methoden hebben hun eigen vóór- en nádelen: in een onbekende werksituatie kunnen niet-stofgebonden methoden in het algemeen toegepast worden om een eerste indruk te krijgen over mogelijke expositie aan genotoxische stoffen. Omdat een groot aantal factoren buiten de werksituatie ook meespelen, zoals roken, alcohol, leef-tijd, virusinfecties, voedingsgewoonten etc. is het echter moeilijk onderscheid te maken tussen beroeps-expositie en effecten die het gevolg zijn van de algemene leef-situatie.

Stofgebonden methodieken maken een onderscheid mogelijk tussen beroepsge-bonden expositie en de andere factoren. Deze methoden moeten echter voor iedere stof afzonderlijk ontwikkeld worden en meten uitsluitend de exposi-tie aan één bepaalde stof waarbij alle andere, ook beroepsmatige exposi-ties, buiten beschouwing blijven. Dit soort methodieken geeft echter de beste vooruitzichten om in de toekomst tot een echte risico-evaluatie te kunnen komen.

Dit rapport zal voornamelijk de methodieken bespreken die gebaseerd zijn op het meten van effecten van blootstelling. Het gaat hierbij om methoden die nu beschikbaar zijn om te verifiëren of er expositie bestaat aan genotoxi-sche stoffen, alsmede om nieuwere methodieken die nog in verschillende fa-sen van ontwikkeling verkeren. Enige daarvan wettigen de hoop dat ze niet alleen geschikt zullen blijken voor het vaststellen van (de mate van) blootstelling, maar in de toekomst wellicht ook een directe aanwijzing zul-len kunnen geven omtrent het met die blootstelling gemoeid zijnde risico op beroepskanker. Wil men op basis van deze nieuwere technieken tot een risi-co-evaluatie komen, dan zal calibratie nodig zijn. Deze zal moeten berusten op epidemiologische gegevens, die momenteel schaars zijn. Aangezien de be-roepspopulaties in Nederland vaak te klein zijn om een kankerrisico te kun-nen aantonen, zullen deze gegevens in het algemeen uit het buitenland moe-ten komen, of in samenwerking met andere landen moeten worden verkregen.

Bij het ontwikkelen, aanpassen en/of toepassen van de hier te beschrijven technieken zal met vrucht gebruik kunnen worden gemaakt van de resultaten van de meer traditionele aanpak, d.w.z. van het chemisch-analytische onder-zoek naar de aanwezigheid van de stof in het lichaam. Vooral de toxicokine-tische gegevens en de kennis over het metabolisme van de stof kunnen van essentieel belang zijn voor een goede benadering van de biologische monito-

ring op grond van effecten, of van de juiste interpretatie van de resultaten daarvan. In dit opzicht kunnen de verschillende technieken elkaar soms uitstekend aanvullen.

Een uitgebreider beschrijving van de huidige opvattingen over carcinogenese in relatie tot biomonitoring technieken is te vinden bij Weinstein en Perra (1982). Een meer recent overzicht is te vinden bij Garner (1985).

2. DEFINITIES

Biologische monitoring (ook wel biomonitoring genoemd)

Biologische monitoring werd door Zielhuis (1977) gedefinieerd als het meten van persoonlijke blootstelling door (chemische) analyse van een biologisch monster. Zielhuis maakte daarbij een scherp onderscheid tussen biologische monitoring en het meten van gezondheidseffecten zoals een verlaging van het leukocytegehalte van het bloed of het screenen voor blaaskanker.

Dit onderscheid zal niet gevolgd worden in het nu volgende overzicht, omdat op het gebied van biologische monitoring voor mutagenen en carcinogenen diverse biologische effecten van blootstelling voorkomen welke bruikbaar zijn voor monitoring, maar die niet zonder meer tot gezondheidseffecten gerekend mogen worden. Zo kan men zich afvragen of het terecht is een verhoging van het aantal chromosoom-aberraties als een "gezondheidseffect" te beschouwen: weliswaar geeft een sterke verhoging ongetwijfeld reden tot verder onderzoek, maar een direct verband tussen het feit dat het aantal aberraties sterk verhoogd is en de tegenwoordige of toekomstige gezondheidstoestand is niet bekend. Nog problematischer wordt het of van een gezondheidseffect gesproken kan worden indien er alleen sprake is van een gering, zij het statistisch significant verschil tussen controles en eventueel blootgestelde groepen personen.

Het ruimere gebruik dat hier van het begrip biologische monitoring wordt gemaakt, wordt ook door anderen gehanteerd, bijvoorbeeld door Lauwerijs (1983) en door Lohman, Lauwerijs en Sorsa (1983) in hun samenvatting van het recente symposium over monitoring in Helsinki.

Om praktische redenen rekenen wij daarom onder biologische monitoring alle methodieken die een biologisch monster analyseren op het voorkomen van vreemde stoffen of van effecten die daarvan het gevolg zijn. Wij zullen

effecten pas dan "gezondheidseffecten" noemen als er een bekend, oorzake-lijk verband is tussen het gemeten effect en de gezondheid of de mate van risico van de werknemer die het monster verschaftte.

Mutageen

Een mutageen is een agens dat een positieve reactie veroorzaakt in één of meer valide mutageniteits-test-systemen (zie ook: ICPEMC Committee 1, 1983; ICPEMC Committee 2, 1982).

Geslachtscel Mutageen

Een geslachtscel mutageen is een agens dat bij zoogdieren of mensen mutaties induceert in de geslachtscellen, met als mogelijk gevolg schade aan het nageslacht.

Carcinogeen

Een carcinogeen is een agens dat het aantal goedaardige of maligne tumoren in een populatie van mensen of dieren verhoogt. (ICPEMC Task Group 5, 1984).

Genotoxisch Carcinogeen

Een genotoxisch carcinogeen is een carcinogeen dat een positief resultaat geeft in mutageniteits-test-systemen (ICPEMC Task Group 5, 1984).

Niet-Genotoxisch (of Epigenetisch) Carcinogeen

Dit is een carcinogeen dat overwegend of geheel negatief reageert in test-systemen voor mutageniteit (ICPEMC Task Group 5, 1984) N.B. Ofschoon "overwegend negatief" wetenschappelijk niet eenduidig gedefinieerd kan worden, is de definitie "geheel negatief" te beperkt. Daarbij zouden er namelijk, als gevolg van soms tegenstrijdige resultaten, géén vertegenwoordigers van deze klasse meer overblijven bij verbindingen die vaak onderzocht zijn in verschillende laboratoria (de Serres and Ashby, 1981).

Clastogeen

Een clastogeen is een agens (een chemische stof, electromagnetische straling, virussen, etc.) dat chromosoom-aberraties veroorzaakt.

Risico

In deze bespreking zal het woord "risico" gebruikt worden in die situaties waar de frequentie gemeten kan worden. In deze zin is het risico van autorijden bijv. te baseren op het aantal verkeersdoden per 1.000.000 km. De begrippen "kans op een gevaar" of "mogelijkheid van een risico" zullen als zodanig weergegeven worden.

De bovengenoemde definities van carcinogenen en mutagenen zijn zgn. operationele definities, d.w.z. ze specificeren alleen het resultaat van testen. Deze definities hebben het voordeel dat ze alle resultaten insluiten van epidemiologische of experimentele studies. De definities omvatten de vastgestelde risico's, maar ook alle gegevens die alleen in meerdere of mindere mate verdenking opleveren dat risico's zouden kunnen bestaan. Dit betekent dat alles wat "in de wandel" carcinogeen of mutageen genoemd wordt, onder de definitie valt. Dit houdt echter ook in dat deze definities op zichzelf geen enkele conclusie toelaten over de vraag of er ook werkelijk een risico bestaat voor proefdieren of de mens.

Voor carcinogenen zijn ook andere definities verdedigbaar, bijv. de zeer strenge definitie van de Gezondheidsraad (1978) of de definities gehanteerd door het International Agency for Research on Cancer (IARC) in Lyon (IARC Internal Technical Report No. 83.001). Dit is mogelijk voor carcinogenen doordat chemische carcinogenese bij de mens voor enkele verbindingen of mengsels aangetoond is. Verder kunnen de resultaten van experimentele gegevens zeer ruwweg verdeeld worden in "verontrustend" (in grotere of mindere mate) en hooguit "indicatief voor een mogelijk risico voor de mens". Bovendien heeft men de beschikking over een redelijke hoeveelheid gegevens uit dierexperimenten en is het soms mogelijk om bij de mens verkregen epidemiologische gegevens daarmee te vergelijken.

Voor mutagenen is een scherpere definitie feitelijk niet mogelijk. Weliswaar is de mutagene activiteit op het nageslacht van enkele verbindingen in muizen bewezen, maar de hiervoor benodigde test (de zgn. Specific Locus Test) is tijdrovend, duur en kan slechts in enkele, speciaal daarvoor ingerichte, laboratoria uitgevoerd worden. Verder geeft deze test tot nu toe

resultaten die sterk afwijken van de resultaten van kortdurende mutageniteitstesten (Russell, 1981) hetgeen de interpretatie niet eenvoudiger maakt. We moeten aannemen dat chemische mutagenese bij de mens voorkomt, maar mutagene effecten op het nageslacht konden tot nu toe voor geen enkele chemische stof worden aangetoond. Zelfs voor ioniserende straling is mutagenese bij de mens niet aangetoond voor de 70.000 nakomelingen van de slachtoffers van Hiroshima en Nagasaki (Schull en Neel, 1980). Vergelijking met het dierexperiment is dus niet mogelijk. In deze situatie zal niet snel verandering komen, vooral niet omdat er geen betrouwbare registratie van erfelijke afwijkingen bestaat (ICPEMC Committee 5, 1983).

Voor mutagenese is er dus geen betere definitie mogelijk *). Maar ook voor carcinogenese werd gekozen voor een brede - en daardoor te ruime - definitie, omdat deze notitie primair gericht is op praktijksituaties, d.w.z. op mogelijke of echte bedrijfstoxicologische risico's, en niet zozeer op nauw omschreven categorieën van kanker. Verdere inperking van het aantal stoffen waarvoor monitoring gewenst is, of van situaties waarin monitoring dient te geschieden, kan gebeuren op grond van andere criteria, praktische of wetenschappelijke. Door deze keuze voor een ruime definitie wordt voorkomen dat nu of later bepaalde stoffen, situaties of technieken - wellicht ten onrechte - buiten beschouwing moeten worden gelaten.

3. VRAAGSTELLING VOOR BIOMONITORING

Biologische monitoring kan worden gebruikt om aan te tonen dat in een goed gedefinieerde werksituatie met bekende risico's in feite veilig gewerkt wordt. Er moeten dan hoge eisen worden gesteld aan de gevoeligheid en specificiteit van de toegepaste techniek. In de meeste gevallen, waar preciese gegevens over gebruikte chemicaliën, over expositie en over de relatie tot een gezondheidsrisico ontbreken, kan op de vraag of veilig gewerkt wordt door de tegenwoordige wetenschap geen absoluut antwoord gegeven worden. Deze onmogelijkheid wordt nog versterkt door de waarschijnlijkheid dat in de gehele bevolking de meeste gevallen van kanker worden bepaald door de levensstijl, b.v. door roken, drinken en voedingsgewoonten (Doll and Peto, 1981; Weisburger, 1979; Higginson and Muir, 1979).

*) Wetenschappelijk is dit wel mogelijk, bijvoorbeeld door een mutageen te definiëren als een agens dat een permanente verandering in DNA van de geslachtscellen teweegbrengt. Een dergelijke correcte definitie zou echter tot de conclusie kunnen voeren dat er geen menselijke mutagenen zijn, hetgeen niet onmogelijk is maar wel uiterst onwaarschijnlijk.

Deze laatste opmerking is in zijn algemeenheid juist voor de bevolking als geheel, maar hoeft niet te gelden voor ieder afzonderlijk bedrijf waar zondanige omstandigheden denkbaar zijn (en in het verleden incidenteel ook aangetoond zijn) dat voor de werkers in dat bedrijf het gevaar van beroepskanker het algemene kankerrisico verre overtreft.

Men kan echter een andere vraag stellen, nl. zijn er methoden waarmee kan worden aangetoond dat ergens een duidelijke beroepsgebonden expositie aan genotoxische stoffen voorkomt. Op deze vraag kan soms een antwoord gegeven worden door biologische monitoring technieken. Biologische monitoring wordt dan voorlopig gebruikt, niet om een definitieve grens tussen veilig en onveilig vast te stellen, maar om een overzicht te krijgen van de voornaamste plaatsen van interne blootstelling van werknemers aan genotoxische stoffen in de industrie. Het is deze laatste vraagstelling die in het nu volgende overzicht voornamelijk behandeld zal worden.

4. BESTAANDE METHODIEKEN VOOR BIOLOGISCHE MONITORING

4.1. Niet-stofgebonden biologische monitoring

4.1.1 Onderzoek van chromosoom-aberraties in lymfocyten

Zonder twijfel is de meeste ervaring opgedaan en zijn de meeste resultaten verkregen met de analyse van chromosoom-aberraties (Natarajan and Obe, 1980; Evans, 1983). Deze methode is reeds enige decennia geleden toegepast op mensen die aan ioniserende straling waren blootgesteld. Het bleek dat de overlevende slachtoffers van Hiroshima en Nagasaki zelfs jaren nadien nog zeer veel meer chromosoom-aberraties in hun bloedlymfocyten hadden dan controlepersonen. Voor ioniserende straling werd de techniek zover uitgewerkt dat het nu een methode is (in feite de enige) om bij mensen die accidenteel aan deze straling zijn blootgesteld, de mate van blootstelling te bepalen (Lloyd et al., 1975). Deze ontwikkeling was mogelijk omdat de effecten van ioniserende stralen in vitro gelijk zijn aan de in vivo effecten. Daardoor was het mogelijk om bijv. de effecten van een eenmalige dosis te vergelijken met een reeks lagere doseringen die uiteindelijk dezelfde totaaldosis

geeft. Bovendien zijn de chromosomale effecten van ioniserende straling grotendeels irreversibel. Hiervan maakten Evans et al. (1979) gebruik om aan te tonen dat bij werknemers bij een scheepswerf voor nucleaire duikboten in Engeland die waren blootgesteld aan straling beneden de toegestane limiet, tóch over de jaren een duidelijke, dosis-afhankelijke verhoging van het aantal chromosoom-aberraties voorkwam.

Dit zeldzame bewijs van de potentieel buitengewone gevoeligheid van de chromosoom-aberratiemethode (er werden immers effecten gemeten bij een blootstelling die geen waarneembaar kankerrisico met zich mee zou brengen (Land, 1981; Cohen, 1981)) was alleen mogelijk omdat 1) irreversibele en dus gedeeltelijk cumulatieve effecten door straling over een aantal jaren werden gemeten, 2) deze metingen geschieden in een van de 3 of 4 allerbeste laboratoria ter wereld op dit gebied (waardoor de metingen van jaar tot jaar direct vergelijkbaar waren) en 3) een welhaast astronomisch aantal bepalingen gedaan werd. Dit wetenschappelijke kunststukje betekent dus nog niet dat de methode op dat niveau bruikbaar is voor routineonderzoek (Evans, 1982).

Deze bevredigende toestand t.a.v. straling geldt echter niet voor de effecten van chemische stoffen.

Voor chromosoom-aberraties zijn er drie belangrijke verschillen tussen effecten van chemische stoffen en die van straling:

a bijna alle industrieel belangrijke carcinogenen moeten eerst gemetaboliseerd worden tot de carcinogeen-actieve metabooliet. Daarom kunnen resultaten in vitro in het algemeen niet met resultaten in vivo vergeleken worden, en zijn aanzienlijke interspecies en interindividuele verschillen te verwachten.

b in tegenstelling met ioniserende straling lijken alle tot nu toe onderzochte chemische stoffen die chromosoom-aberraties induceren, een duidelijk "no effect level" te hebben.

c in tegenstelling met de effecten van ioniserende straling zijn chromosoom-aberraties veroorzaakt door de tot nu toe onderzochte stoffen gewoonlijk "reversibel" (Evans, 1982; Jansen, 1983), d.w.z. dat in de tijd het aantal afwijkingen in de lymfocyten (soms vrij snel) afneemt. Het is onduidelijk waaraan dit moet worden toegeschreven.

Deze verschillen zijn belangrijk voor de opzet van experimenteel onderzoek en voor de interpretaties van resultaten, maar sluiten de toepasbaarheid van de methode in de praktijk niet uit.

Voor de praktijk zijn er twee andere, maar belangrijke bezwaren:

a een groot aantal factoren beïnvloedt het aantal aberraties (o.a. roken, alcoholisme, virusinfecties, diagnostische straling en leeftijd). Hierdoor wordt het vinden van de juiste controlegroep een groot probleem in die gevallen dat alleen kleine verschillen tussen de "blootgestelde" en de "controle"groep gevonden worden (d.w.z. verschillen kleiner dan ongeveer 4:1) (Anderson and Legator, 1983).

b de bepaling van het aantal chromosoom-aberraties is zéér arbeidsintensief (een volleerde analist(e) in een goed laboratorium kan niet meer dan ongeveer 200 analyses per jaar verrichten, waarvan dan nog ongeveer de helft controles moeten zijn) (Natarajan, 1984; Fantes et al., 1983).

Een aantal van deze problemen kan grotendeels gecompenseerd worden door longitudinaal onderzoek te verrichten, waardoor evenwel de omvang van het onderzoek weer toeneemt.

Er zijn tot nu toe bij groepen werknemers duidelijke resultaten bereikt bij blootstelling aan benzeen, ethyleenoxyde, styreen, VCM en epichloorhydrine (Evans, 1982; discussie in: Sorsa, 1982; Sorsa, 1983). Tekenend voor de moeilijkheden van interpretatie is evenwel dat van deze 5 stoffen styreen niet als carcinogeen beschouwd wordt terwijl de gegevens die erop wijzen dat epichloorhydrine bij de mens clastogeen zou zijn, betwifteld worden door een werkgroep waarin ook de oorspronkelijke onderzoeker daarvan zitting heeft (ICPEMC, 1982).

Van alle bestaande technieken heeft deze techniek desondanks de meeste interpreteerbare resultaten verschaft (Natarajan and Obe, 1980; Evans, 1982; Meretoja et al., 1978). Wat betreft interpretatiemoeilijkheden van kleine verschillen moet worden opgemerkt dat de methodiek nooit is toegepast onder condities waar een duidelijk, statistisch groot kankerrisico bestaat. Enkele keren kon onderzoek worden verricht bij groepen personen met een - statistisch gesproken - in geringe mate verhoogd risico (ongeveer 1% of kleiner). Hierbij werden ongeveer 5-20x zoveel aberraties als normaal gevonden of nog veel meer (d.w.z. bij werkers in de PVC-industrie kort na het bekend worden van de carcinogeniteit van VCM (Funes-Cravioto et al., 1975), bij overlevende slachtoffers van Hiroshima en Nagasaki (Sasaki and Miyata, 1968) en bij kankerpatiënten behandeld met cytostatica).

Wanneer twee gezonde, niet-beroeps-geëxposeerde populaties met elkaar vergeleken worden, worden verschillen tussen de hoogste en de laagste groep

van ongeveer twee tot viermaal gevonden (Anderson and Legator, 1983). Een deel van deze verschillen is aan technische en interpretatieverschillen tussen laboratoria toe te schrijven. Pas nu is een systematisch onderzoek gaande in de U.S.A. om de spreiding tussen laboratoria en tussen gezonde populaties te meten (Anderson and Legator, 1983). Toch is het in principe mogelijk dat kleinere verschillen eenduidig aan beroepsexpositie toegewezen kunnen worden (Evans et al., 1979). Dit kan echter alleen in zeer ervaren laboratoria die dan ook een groot deel van hun tijd aan systematische vergelijkingen met andere laboratoria en bekende bloedmonsters besteden (vandaar de relatief lage productie per analist(e) die onontkoombaar is voor het verkrijgen van objectieve resultaten). Bovendien moet voor het definitief vaststellen van kleine verschillen een véél groter aantal bloedmonsters worden onderzocht. Daarom is een dergelijke vaststelling van kleine verschillen in een routine-onderzoek vaak onmogelijk. Grotere verschillen (5x zoveel en meer) kunnen echter duidelijk in een routineonderzoek, ook van weinig werknemers, aangetoond worden. Zelfs bij dergelijke verschillen is het echter nog de vraag of een duidelijk verhoogd kankerrisico bestaat. Evenmin is het zo dat geen of een geringe verhoging de aanwezigheid van een kankerrisico uitsluit.

4.1.2 Sister Chromatid Exchange

Ook bij deze methode gaat men uit van lymfocyten in een bloedmonster. Men laat de chromosomen van deze lymfocyten in 1-2 celdelingen eerst 5-bromodesoxyuridine (BUdR) inbouwen en daarna worden ze gekleurd met een kleurstof. Het blijkt dan dat sommige delen van chromatiden uitgewisseld zijn met homologe stukken van het andere chromatide van hetzelfde chromosoom (Latt et al., 1979; Wolff, 1983; Lambert et al., 1982). Het voordeel van deze test is de gemakkelijker uitvoering in vergelijking met de analyse van chromosoom-aberraties. Een theoretisch en praktisch nadeel is dat BUdR zélf mutageen is en zo een artificieel element introduceert.

Sommige onderzoekers claimen dat de SCE test veel gevoeliger is dan de analyse van chromosoom-aberraties (Wolff, 1983; Evans, 1983), maar deze claims lijken niet algemeen geldend te zijn. Tot nu toe zijn de resultaten van de toepassing van deze methode voor bevolkingsonderzoek tegengevallen (Lambert et al., 1982), met uitzondering van de controle van verpleegkundigen die cytostatica voor kankertherapie prepareren (Sorsa, 1982). De voornaamste reden is waarschijnlijk dat SCE's veel minder persistent zijn dan chromosoom-aberraties en al vrij kort na de expositie weer normale waarden te zien geven. Ook is het nog niet bekend wat de betekenis van SCE's is en of

er wel van een genetisch effect sprake is. Met deze methode zijn belangrijke resultaten bereikt bij toepassing in research-programma's waar de methode specifieke vragen kan beantwoorden (Evans, 1979). Een mogelijk bezwaar tegen de methode is dat in vitro ook positieve resultaten gerapporteerd zijn met wellicht voor de mens niet-carcinogene stoffen zoals saccharine, cyclamaten, phorbolesters en vitamine C (Evans, 1979). Op dit ogenblik lijkt deze methode ongeschikt voor algemene biomonitoring (Carrano, 1982; Lambert et al., 1982), behalve als onderdeel van een veel uitgebreider researchprogramma waar resultaten onder goed gedefinieerde condities verkregen kunnen worden.

Een duidelijke verhoging van het aantal SCE's is bij de mens alleen aangetoond bij verpleegkundigen die cytostatica voor therapie klaarmaken (10-30% verhoging) (Sorsa, 1982), bij kankerpatiënten behandeld met dergelijke cytostatica (5 à 10 x zo hoog), bij werknemers blootgesteld aan ethyleen-oxyde (+ 30% verhoging) (Sarto et al., 1983) en bij arbeiders, blootgesteld aan oplosbare chroomverbindingen (+ 30% verhoging) (Sarto et al., 1982). In andere onderzoeken is de verhoging - indien waargenomen - zo gering dat het zeer de vraag is of deze door de arbeidsomstandigheden veroorzaakt is. Voor de interpretatie moet nog vermeld worden dat Evans (1982) een 30% verhoging niet als bewijs voor DNA schade beschouwde: dergelijke verschillen treden ook op indien in het bloed verschillende populaties lymfocyten voorkomen, die ieder verschillen in gevoeligheid voor BUDR (en dus in SCE-inductie).

4.1.3 Micronucleustest

Bij clastogene inwerking ontstaan chromosoom-fragmenten, die bij deling van de cel in kleine, secundaire cel-kernen, de zgn. micronuclei worden opgenomen. De micronucleus test werd door Schmid (1973) ontwikkeld als een screening-test voor carcinogenen in het beenmerg van muizen. De techniek is veel eenvoudiger dan het scoren van chromosoom-aberraties maar geeft geen informatie over de aard der aberraties.

In Canada heeft Stich deze reeds langer bestaande screening-test toegepast op menselijke epitheelcellen, afkomstig van uitstrijkjes van sputum, mond-slijmvlies, blaas en cervix (Stich et al., 1983). Deze methodiek lijkt veelbelovend bij gericht onderzoek van gedefinieerde situaties, maar is op dit ogenblik (nog) ongeschikt voor toepassing in een overigens onbekende industriële situatie, juist omdat men de bepaling in het door kanker bedreigde orgaan moet uitvoeren, dat in een algemeen onderzoek gewoonlijk niet bekend is. In principe zou deze test ook op bloed-lymfocyten toegepast

kunnen worden. Hierover zijn echter geen gegevens uit de praktijk bekend. A priori kan echter gesteld worden dat de gevoeligheid van deze methode veel lager zal zijn dan die van de analyse van chromosoom-aberraties, aangezien het bekend is dat slechts een klein deel van de chromosoom-aberraties tot de vorming van micronuclei leidt. Daar staat tegenover dat met de micronucleus-test grotere aantallen cellen kunnen worden gescreend.

4.1.4 Bepaling mutageniteit van urine

Deze methodiek analyseert m.b.v. de Ames-test (of een andere mutageniteits test) of er mutagene stoffen in de urine aanwezig zijn (Legator *et al.*, 1979). Evenals de Ames-test geeft deze methodiek in hoofdzaak een ja of nee antwoord. Het theoretische voordeel van deze techniek is dat zgn. puntmutaties gemeten worden, die volgens velen aan de initiatie van tumorcellen ten grondslag liggen. Toepassing in bekende situaties (bijv. na het innemen van een medicijn) heeft zeker mogelijkheden. De test is relatief gemakkelijk uit te voeren maar is niet specifiek. Ook sigaretten roken bijvoorbeeld resulteert in mutagene stoffen in de urine. De methodiek is gebruikt om in de urine van een werker na een accidentele blootstelling aan epichloorhydrine, mutagene activiteit aan te tonen (Legator *et al.*, 1979), maar na normale industriële blootstelling werd geen activiteit gevonden. Voor zover bevolkingsonderzoek met deze methode werd verricht, werden geen duidelijk positieve resultaten verkregen, met uitzondering van één goed uitgevoerd onderzoek van verpleegkundigen die cytostatica prepareren (Nguyen *et al.*, 1982). Het is onduidelijk hoe de verdeling is van mutagene urines bij de bevolking. Waarschijnlijk zal de samenstelling van de voeding een invloed hebben maar hier zijn geen gegevens over. Praktische moeilijkheden door de aanwezigheid in de urine van wisselende hoeveelheden histidine of van stoffen die toxisch zijn voor de test-bacteriën, zijn bekend (Anderson and Legator, 1983). Toepassing van deze methodiek kan uitsluitend aanbevolen worden als een additioneel gegeven in het kader van een nauwkeurig omschreven en goed onderzochte situatie.

4.1.5 Mutageniteit van faeces

Het bepalen van de mutageniteit van faeces is een veel toegepaste methode in het kader van het fundamentele onderzoek van mogelijke factoren die bepalend zouden kunnen zijn voor het ontstaan van colonkanker. Het is reeds duidelijk dat grote verschillen bestaan tussen personen en tussen landen met verschillende voedingspatronen. Het is ook duidelijk dat toevoeging van

bijv. vitamine C of E aan het voedsel een grote invloed heeft op de mutageniteit van faeces. Mutagene verbindingen, vermoedelijk geproduceerd door de darmflora, zijn recentelijk geïsoleerd, maar het is nog in het geheel niet bekend of deze iets te maken hebben met colonkanker (Venitt, 1982).

In het licht van de reeds bekende grote variaties in de mutageniteit van faeces zal het zeer moeilijk en waarschijnlijk onmogelijk zijn om de mutageniteit van faeces als maat voor een industriële expositie te gebruiken - dit is dan ook nog nergens geprobeerd. Bovendien is een relatie tussen expositie door de huid of via ademhaling en uitscheiding in faeces niet bekend (al zal deze voor sommige stoffen zeker kunnen voorkomen) en de gegevens kunnen dus niet aan de mate van blootstelling gerelateerd worden, zelfs niet in het geval dat de mutageniteit van de faeces duidelijk door de arbeidsomstandigheden veroorzaakt wordt. Verder onderzoek in deze richting lijkt dan ook niet veelbelovend.

4.1.6 Thioethers in urine

Electrofiële verbindingen - een klasse van chemicaliën die ook het merendeel van genotoxische carcinogenen omvat - kunnen geïnactiveerd worden door reactie met glutathion of andere SH-bevattende moleculen. De zo gevormde producten worden in de urine uitgescheiden als mercaptuurzuur of andere thioethers (zie schema). In een bepaalde situatie zal een sterkere expositie resulteren in een verhoogde uitscheiding van thioethers (Henderson et al., 1983).

Thioethers komen in urine voor, afhankelijk van o.a. de voeding en sigaretten roken. Dit veroorzaakt een vrij grote individuele spreiding in de normale waarden van thioether-uitscheiding, hoewel deze spreiding niet groter lijkt dan die tussen individuele waarden voor chromosoom-aberraties of Sister Chromatid Exchanges. Het is belangrijk dat sommige genotoxische carcinogenen niet als thioethers worden uitgescheiden terwijl expositie aan sommige niet-carcinogenen wel resulteert in een verhoogde uitscheiding (Henderson et al., 1983).

De methode kan toegepast worden in een bekende situatie (bijv. een patiënt, na inname van medicijnen, of een goed onderzochte industriële situatie waar de mate van expositie en chemicaliën bekend zijn) om de persoonlijke expositie te volgen. Na calibratie bij proefpersonen zouden zo kwantitatieve gegevens over de expositie verkregen kunnen worden. In een onbekende situatie is interpretatie zeer moeilijk omdat identieke expositie aan verschillende chemicaliën kan resulteren in totaal verschillende waarden voor thioether-uitscheiding. Bovendien geldt, dat hoe gevaarlijker een verbinding is

(d.w.z. hoe meer van een gegeven dosis met DNA reageert), hoe minder thioethers worden uitgescheiden. Daarom kan deze methode in het beste geval een signaalfunctie vervullen in een onbekende situatie (Henderson et al., 1983). De gevoeligheid van deze methode voor het aantonen van een carcinogene risico-situatie is niet bekend omdat geen gegevens beschikbaar zijn over uitkomsten bij een bepaalde, zeker aan risico onderhevige populatie.

4.2 Interpretatie en eisen voor interpreteerbare gegevens van methoden 4.1.1-6

Het theoretische voordeel van niet-stofgebonden technieken voor de detectie van carcinogene expositie, is dat de resultaten een algemene geldigheid hebben, onafhankelijk van het agens dat de effecten veroorzaakt. De ideale methode zou niet alleen dit karakter van universaliteit moeten bezitten, maar bovendien duidelijk gecorreleerd moeten zijn met het risico, d.w.z. dat de mate waarin het genotoxische effect wordt waargenomen tevens een maat is voor de grootte van het kanker-risico (zonder dat het per se nodig is dat er ook een oorzakelijk verband is aangetoond).

In de praktijk is de situatie veel minder rooskleurig: het ideaal wordt op geen stukken na benaderd. Bij geen van de voor de methoden 4.1.1-6 gebruikte effecten is er een direct verband bekend tussen het optreden van het verschijnsel en een verhoogd risico voor het ontstaan van kanker.

Voor de meeste methoden is op voorhand reeds duidelijk dat zij niet geschikt zijn als universele methode. Mutageniteit van urine of faeces, en de aanwezigheid van thioethers in urine hangen teveel af van distributie-verschijnselen en van omzettingen in het lichaam om voor alle genotoxische stoffen bruikbaar te kunnen zijn. Een duidelijke aanwijzing in deze richting is bijv. dat bij ratten die via het voer aan sterk carcinogene doseringen VCM werden blootgesteld, met de Ames-test geen mutageniteit van de urine kon worden aangetoond (TNO-onderzoek CIVO/MBL). De bovengenoemde problemen bij de thioethers wijzen in dezelfde richting.

De micronucleus-test in bloedlymfocyten is nog te weinig onderzocht om reeds tot een definitief oordeel te komen. Op grond van het mechanisme van het ontstaan van micronuclei is het wel duidelijk dat de gevoeligheid belangrijk minder zal zijn dan die van chromosoom-aberraties. Dit wordt o.a. geïllustreerd door onderzoek aan rokers (zie p. 30), waarbij wel een duidelijke verhoging van het aantal chromosoom-aberraties werd gevonden, maar geen toename van het aantal micronuclei.

Bij SCE's doet zich het probleem voor dat alleen die afwijkingen kunnen worden waargenomen die na de afname van het bloed ontstaan, in vitro, in aanwezigheid van BUdR. De waargenomen SCE's zijn dus geen maat voor chromo-

somale afwijkingen die in het lichaam ontstaan, maar uitsluitend voor de aanwezigheid van beschadigingen die in vitro tot het ontstaan van SCE's kunnen leiden. Het is bovendien bekend dat althans een groot gedeelte van de SCE's door het BUdR zelf veroorzaakt wordt. Uit verder onderzoek is gebleken dat de efficiëntie waarmee SCE's ontstaan, kan worden beïnvloed door de test-omstandigheden, en dat deze efficiëntie sterk kan verschillen van agens tot agens. Ioniserende straling, bijvoorbeeld, een erkend carcinogeen agens, induceert vrijwel geen SCE's.

Dit betekent niet dat deze methoden per se ongeschikt zouden zijn voor bio-monitoring, maar wel dat ze niet geschikt zijn om te worden gebruikt als universeel criterium, zeker niet zolang men weet dat vals-negatieve uitkomsten mogelijk zijn. In goed gedefinieerde situaties, waarin mogelijk blootstelling plaats vindt aan bekende agentia, kan één of meer van deze methoden wellicht uitstekend bruikbaar zijn om na te gaan of er blootstelling heeft plaatsgevonden en - eventueel - in welke mate. Voorwaarde hierbij is wel dat onderzocht is of de stof het verschijnsel teweeg kan brengen en dat de methode voor die stof is gecalibreerd. Alle niet-stofgebonden technieken hebben nl. in principe hetzelfde nadeel, t.w. dat ze van stof tot stof kwantitatief verschillend reageren. Dit brengt mee dat voor elke praktijk-situatie moet worden nagegaan om welke stoffen het gaat en dat voor die stoffen de relatie tussen dosis en effect moet worden vastgesteld, als men in staat wil zijn iets met de resultaten te beginnen. Hiermee gaat dus het voordeel van het niet-stofgebonden zijn goeddeels verloren, terwijl de nadelen blijven bestaan, zoals het reageren op niet-werkgebonden factoren zoals roken, voeding, leeftijd, etc.

Van de in deze paragraaf tot nu toe besproken technieken is niet te verwachten dat een directe relatie kan worden aangetoond tussen het effect en het carcinogene risico. Het eventuele gebruik zal dus beperkt blijven tot het meten van blootstelling in heel bepaalde situaties.

Een bijkomend probleem, dat evenwel ook voor de meeste andere technieken geldt, is de tijd-afhankelijkheid. Voor elk geval zal een indruk moeten worden verkregen van de wijze waarop het gemeten verschijnsel in grootte verandert na het moment van blootstelling.

Een methode die mogelijk wel universeel bruikbaar is, is het meten van chromosoom-aberraties. Vele genotoxische stoffen zijn in staat deze afwijkingen te veroorzaken. In dit rapport wordt daarom aan deze methode extra aandacht besteed, ook al omdat hiermee de meeste praktische ervaring bestaat.

Voor chromosoom-aberraties geldt dat wanneer in een gezonde populatie, die niet aan bedrijfsrisico's is blootgesteld, cytogenetisch onderzoek uitgevoerd wordt, gemiddelde waarden worden gevonden die per groep ongeveer een faktor 2-à 4 verschillen (Anderson and Legator, 1983; Carrano, 1982). Het is op statistische gronden te verwachten, dat, indien men 2 groepen met elkaar vergelijkt (de ene groep "blootgesteld", de andere "controle") en er in werkelijkheid géén beroepsmatige expositie bestaat, er een kans van 50% is dat de "blootgestelde" groep hoger uitkomt dan de "controles" en 50% kans dat hij lager ligt. Het is even onlogisch een "beschermend" effect van de bedrijfsexpositie aan te nemen indien de "blootgestelde" groep lager uitkomt als te concluderen dat schadelijke bedrijfsblootstelling aangetoond is, wanneer deze groep iets hoger uitkomt. Van meer belang voor toekomstige interpretatie zijn vragen zoals:

- a Hoe groot is het verschil? Naarmate het verschil met de controles kleiner wordt dan een faktor 4, wordt ook de waarschijnlijkheid groter dat dit verschil op niet-beroepsgebonden factoren berust^{*)}.
- b Is er een dosis-effect relatie? (vaak kunnen méér en minder blootgestelde werknemers met elkaar vergeleken worden).
- c Neemt het effect af na lange perioden zonder expositie?
- d Zijn "blootgestelden" en "controles" goed vergelijkbaar t.a.v. roken (aantal sigaretten), leeftijd, geslacht, het gebruik van medicijnen etc.?
- e Hoe is de verdeling van de aberraties? Zijn alleen "gaps and breaks" verhoogd of ook andere aberraties?
- f Hebben andere landen en laboratoria ongeveer dezelfde uitkomsten bij ongeveer dezelfde omstandigheden gevonden?

*) Verder, maar omvangrijk, onderzoek kan wel degelijk vaststellen of kleinere verschillen beroepsgebonden zijn, of wellicht dat grotere verschillen toch niet met het beroep samenhangen. De faktor 4 kan dus alleen als vuistregel aangehouden worden, bruikbaar als een eerste benadering voor de interpretatie van een beperkt aantal analyses van blootgestelde en niet-blootgestelde werknemers. In werkelijkheid is er een glijdende schaal waarbij beroepsgebonden factoren steeds waarschijnlijker worden naarmate de verschillen groter zijn, naarmate andere factoren uitgeschakeld kunnen worden en naarmate de aantallen blootgesteld en niet-blootgesteld groter zijn.

Interpretatie van positieve en negatieve uitkomsten hangt ook af van bedrijfsgegevens zoals:

a geven de in het bedrijf gebruikte chemicaliën redenen om te veronderstellen dat er chromosoom-aberraties (of SCE's of andere effecten) te verwachten zijn ?

b is er een zekere correlatie tussen gevonden waarden en de geschatte expositie (bijv. op grond van chemische metingen van concentraties in de lucht) ?

c resulteren technische maatregelen op het gebied van industriële hygiëne in "betere" waarden ?

d zijn er andere technische factoren die de gevonden waarden kunnen verklaren (bijv. duidelijke ongelukken) ?

Om deze redenen kunnen alleen zeer goed georganiseerde laboratoria met veel eigen ervaring en in nauwe samenwerking met bedrijfsartsen en technici tot interpreteerbare resultaten komen, tenzij zéér hoge waarden gevonden worden. Eén der grootste moeilijkheden voor alle besproken methodes is de samenstelling van de controlegroep. De resultaten per individu variëren nog meer dan per groep. Er kunnen dus alleen groepsresultaten vergeleken worden tenzij intensief longitudinaal onderzoek wordt verricht - maar altijd met controlegroepen.

Tenslotte moet nog worden opgemerkt dat ook voor chromosoom-aberraties de gevoeligheid van stof tot stof verschilt. Dit betekent dat de mate van expositie die uit een bepaald aantal aberraties zou kunnen worden afgeleid, afhangt van de verschillende chemicaliën waaraan expositie bestaat. In deze zin is interpretatie dus wel degelijk stofgebonden. Ook van belang voor interpretatie is de kennis van de mate van persistentie van de door het betreffende agens veroorzaakte aberraties. Dit betekent dat ook voor chromosoom-aberraties er per stof het nodige vooronderzoek verricht moet zijn, alvorens men mag rekenen op goed interpreteerbare resultaten bij toepassing in een praktijksituatie.

Van alle tot dusverre genoemde technieken heeft de analyse van chromosoom-aberraties wellicht de beste kansen om later met een risico voor kanker verbonden te worden: het is denkbaar dat de mate van clastogeniteit van een stof in - nog onbekende - relatie staat tot de mate van carcinogeniteit.

Ter verdere illustratie van datgene wat hier over enkele cytogenetische methoden is aangevoerd, is aan dit rapport een appendix toegevoegd. Hierin zijn opgenomen 2 tabellen uit recente overzichtsartikelen, resp. over SCE's en micronuclei (Tabel 1) en over chromosoom-aberraties (Tabel 2), en een discussie over de hierin vermelde resultaten, van o.a. Evans en Sorsa.

4.3 Gevoeligheid van niet-stofgebonden methodieken

Het is een goed teken dat geen der bovengenoemde methoden kon worden toegepast op groepen met een statistisch gesproken groot risico voor beroepskanker van enige tientallen procenten. Vroeger, vóór de beschikbaarheid van biomonitoring methoden, zijn dergelijke situaties voorgekomen maar tegenwoordig zijn dergelijke groepen (gelukkig) niet (gemakkelijk) te vinden. Deze situatie maakt het echter moeilijk of onmogelijk een dosis-effect relatie voor biologische monitoring op te stellen waar men de gevoeligheid van de methodiek mee zou kunnen bepalen in relatie tot het risico van beroepskanker.

Toch kan men, althans voor de analyse van chromosoom-aberraties, tenminste iets hierover zeggen, zij het zéér voorzichtig en zéér voorlopig: duidelijke en preciese gegevens zijn nu eenmaal niet beschikbaar.

Twee populaties met een bekend kankerrisico zijn op chromosoom-aberraties onderzocht:

1 De overlevende slachtoffers van Hiroshima en Nagasaki werden voor het eerst onderzocht ongeveer 10 jaar na de explosie van de atoombommen. Het aantal aberraties was ongeveer 10-20 maal hoger dan in de controlegroep (en is in 1945 dus zeker (veel) hoger geweest (Buckton et al., 1978)). Desondanks werd bij deze slachtoffers géén individuele relatie gevonden tussen het aantal chromosoom-aberraties en de kans op kanker (Nowell, 1969). Voor de groep overlevende slachtoffers als geheel was de kans op door straling veroorzaakte kanker ongeveer 1%, d.w.z. ongeveer 5% van het "normale" kankerrisico in Japan (Upton, 1984; Kato and Schull, 1982).

2 In Zweden werden chromosoom-aberraties geanalyseerd kort nà het bekend worden van de carcinogeniteit van VCM (Funes-Cravioto et al., 1975), in een fabriek waarin naderhand gevallen van angiosarcoma werden gevonden. Chromosoom-aberraties waren ongeveer 10 maal hoger en het beroepskankerrisico beneden de 1%.

Geen van deze "berekeningen" is volledig want van beide groepen zijn nog overlevenden die een groter kankerrisico zouden kunnen hebben. Bovendien is in alle gevallen de blootgestelde groep aan zeer uiteenlopende doseringen blootgesteld. Niettemin zijn dit alle gegevens op basis waarvan men voorzichtig een gevoel kan krijgen voor de grootte-orde van de gevoeligheid van de methodiek: het lijkt erop, dat exposities die groot genoeg zijn om een kankerrisico tussen ongeveer 0,1 en 1% te veroorzaken, gepaard gaan met een ongeveer 10-20-voudige verhoging van het aantal chromosoom-aberraties. Deze zeer voorzichtige formulering - die in de toekomst, als er meer gegevens

beschikbaar komen, waarschijnlijk herzien moet worden - kan niet uitgebreid worden: 1) bij individuele werknemers is er geen bekende relatie tussen het aantal chromosoom-aberraties en het kankerrisico, 2) er is ook geen oorzakelijk verband bekend tussen de in lymfocyten gemeten chromosoom-aberraties en kanker en 3) wanneer een vertienvoudiging van het aantal chromosoom-aberraties een beroepsmatig kankerrisico van 1% zou betekenen wil dat nog in het geheel niet zeggen dat een vervijfvoudiging een risico van 0,5% zou betekenen, want er is niets bekend over de vorm van de dosis-response-relatie.

Desondanks duiden deze zeer voorlopige gegevens erop, dat de methode - althans voor bepaalde carcinogenen - een grote gevoeligheid bezit. Als deze gevoeligheid een meer algemene geldigheid zou hebben, zouden wellicht exposities die leiden tot een door het beroep veroorzaakt kankerrisico in de orde van eenhonderdste van het achtergrond-risico, nog duidelijk kunnen worden aangetoond.

Om de bovenstaande berekening in een perspectief te plaatsen, is het onderzoek van Obe et al. (1982) van belang: de onderzoekers vonden in een breed opgezet onderzoek dat 170 sigarettenrokers gemiddeld tweemaal zoveel chromosoom-aberraties in hun bloedlymfocyten hadden als 124 niet-rokers. In een later onderzoek (Obe, 1984) demonstreerden dezelfde onderzoekers dat het aantal chromosoom-aberraties gerelateerd is aan de hoeveelheid teer die in de per dag gerookte sigaretten aanwezig is. Het kanker-risico van rokers is groot. Daarentegen lijkt de verhoging van het aantal chromosoom-aberraties relatief gering te zijn. Dit kan verklaard worden door de - goed onderbouwde - hypothese dat het voornaamste kanker-risico bij roken berust op promotie-effecten van niet-genotoxische stoffen in de de sigarettenrook.

4.4 Stofgebonden biologische monitoring

De enige, nu reeds toegepaste, stofgebonden methodiek die niet - zoals bij de "klassieke" biomonitoring - uitgaat van het meten van een stof of een metaboliet daarvan, is ontwikkeld door Ehrenberg en zijn groep (Ehrenberg et al., 1983). Ehrenberg overwoog dat de ideale benadering, nl. het chemisch meten van DNA-beschadiging, zoals het aangehecht zijn van alkylgroepen aan DNA in het weefsel dat uiteindelijk kan uitgroeien tot een tumor bij de mens, onmogelijk is om duidelijke technische en vooral ethische redenen. Het enige DNA-bevattende materiaal dat voor biomonitoring doeleinden redelijkerwijs beschikbaar is, is bloed. Zou men evenwel DNA-alkylatie in bloedcellen chemisch willen meten dan is een zodanige hoeveelheid bloedcellen nodig dat de bepaling bij de mens onpraktisch en bij ratten of bij

andere kleine proefdieren, die men voor het ontwikkelen van de methode zou willen gebruiken, vrijwel onmogelijk zou zijn. Alle electrofiële producten die met DNA kunnen reageren, reageren echter ook met eiwitten, waarvan, bv. in de vorm van hemoglobine, veel meer beschikbaar is in een bloedmonster *). Ehrenberg ontwikkelde een techniek waarbij chemisch goed gekarakteriseerde adducten die ontstaan bij reactie van een bepaalde chemische verbinding (of een metaboliet daarvan) met hemoglobine, geanalyseerd worden.

De methodiek heeft het grote voordeel dat het mogelijk is de expositie aan één enkele, gedefinieerde, verbinding te bepalen en zodoende een onderscheid te maken tussen beroepsexpositie en de vele andere omgevingsfactoren zoals roken, voedsel, etc. Een nadeel is dat voor iedere chemische stof een nieuwe bepalingmethode ontwikkeld moet worden (dit algemene nadeel geldt overigens voor iedere stofgebonden methodiek). Aan de gevoeligheid van de chemische techniek moeten zeer hoge eisen worden gesteld en daarom is het kostbaar en moeilijk de bepaling in grote aantallen uit te voeren. Het wellicht grootste nadeel is dat voor elke stof eerst experimenteel (in ratten en muizen) de relatie tussen DNA-alkylatie in weefsels en hemoglobine-alkylatie bepaald moet worden (Wright, 1983). Ehrenberg koos als eerste verbinding ethyleenoxyde (EO) en had het geluk te vinden dat EO zich gelijkmatig over alle weefsels verdeelt (Ehrenberg et al., 1983), behalve in de testes (Wright, 1983). Daarom kon voor EO een algemene relatie tussen DNA-alkylatie en hemoglobine-alkylatie experimenteel worden bepaald.

Een onderzoek bij werknemers in Duitsland die aan hoge concentraties EO waren blootgesteld, leverde gegevens op, die met de gemeten expositie gecorreleerd konden worden. Later onderzoek bij werknemers die aan lage concentraties EO waren blootgesteld, bracht aan het licht dat ook niet-beroepsmatig blootgestelde controle-personen een zekere mate van hemoglobine-alkylatie vertoonden, waarschijnlijk afkomstig van normale stofwisselingsprocessen. Het bleek daarom onmogelijk om beroepsmatige blootstelling aan lage concentraties EO vast te stellen (Van Sittert et al., 1984). Deze situatie is later door Ehrenberg bevestigd (Ehrenberg, 1983) en ook door Filser en Bolt (1983) bij ratten aangetoond.

Ehrenberg (1983) en anderen (Farmer, 1983) hebben dit onderzoek experimenteel ook naar enige andere stoffen (o.a. propyleenoxyde) uitgebreid. Deze methodiek is veelbelovend, maar het is de vraag of deze methodiek ook in de

*) De, later te bespreken, immunochemische methode is zoveel gevoeliger dat sommige van de bovengenoemde moeilijkheden van de chemische analyse niet meer van kracht zijn.

toekomst nog interessant zal blijven, in concurrentie (in tijd en kosten) met de hierna te bespreken nieuwe methodieken die in ontwikkeling zijn. Op dit ogenblik is deze stofgebonden methode echter de enige die als ontwikkeld kan worden beschouwd.

5. NIEUWE BIOCHEMISCHE EN BIOLOGISCHE METHODIEKEN VOOR BIOLOGISCHE MONITORING

5.1 Niet-stofgebonden

Er zijn twee veelbelovende methodieken in ontwikkeling, die in staat zijn om direct de mutatiefrekwentie in (menselijke) somatische cellen te meten. Deze methoden maken het in principe mogelijk ook kleine verhogingen in de mutatiefrekwentie vast te stellen. Hoewel een directe relatie tussen meer mutaties en (uiteindelijke) tumorvorming nog niet gelegd kan worden, geeft de toekomstige toepassing van de methodieken de mogelijkheid om te onderzoeken of een dergelijke, directe relatie inderdaad bestaat. Wanneer men een kankerrisico zou willen berekenen, veroorzaakt door blootstelling aan genotoxische stoffen, dan zou het vaststellen van een (verhoogde) mutatiefrequentie in de mens in het algemeen gemakkelijker in een berekening in te bouwen zijn dan bijv. een verhoging van het aantal chromosoom-aberraties of SCE's.

5.1.1 HPRT-methode

Albertini en medewerkers ontwikkelden een methodiek gebaseerd op detectie van een mutatie in een structureel gen, dat gelocaliseerd is op het X-chromosoom (Albertini, 1982; Strauss, 1982). Dit gen codeert voor het enzym hypoxanthine-guanine fosforibosyl transferase (HPRT). In een zeldzame erfelijke ziekte (Lesch-Nyhan syndroom) komt deze mutatie in alle lichaamscellen voor. Dezelfde mutatie komt ook voor in enkele cellen van gezonde mensen (met een frequentie van ongeveer 1 op de 100.000 cellen of iets hoger). Bij afwezigheid van het enzym HPRT zijn de cellen resistent tegen de toxische werking van de purine-analogen 8-azaguanine of 6-thioguanine. Hierdoor is het mogelijk de mutant cellen door toevoeging van deze stoffen te selecteren temidden van een grote overmaat aan normale cellen. De methode is ongeveer 10 jaar oud, maar bij toepassing van de methode in vivo werden moeilijkheden ondervonden. Er bleken namelijk meer cellen de testomstandig-

heden te overleven dan er werkelijke mutanten aanwezig waren. Deze overlevende, niet-gemuteerde cellen kwamen ongeveer 10-100 x zoveel voor als de echte mutanten, hetgeen resulteerde in een schijnbare mutatiefrequentie van ongeveer 1 op de 10.000 of hoger. Recent schijnen deze moeilijkheden echter overwonnen en het lijkt daarom mogelijk deze methode in de nabije toekomst, na afdoende calibratie, in de praktijk toe te passen. Deze calibratie zal ook moeten inhouden het bepalen van de spreiding in mutatiefrequentie bij de bevolking en het onderzoek van andere invloeden (zoals roken, alcohol, dieet, leeftijd etc.).

5.1.2. Hemoglobine-varianten methode

De structuur van hemoglobine, het eiwit in de rode bloedcellen, is vrijwel volledig bekend. Er zijn erfelijke afwijkingen bekend, die berusten op de vervanging van één enkel aminozuur in de eiwitketen. Bij deze erfelijke afwijkingen komt deze verandering in het eiwit in iedere rode bloedcel voor. Nader onderzoek heeft aangetoond dat dergelijke veranderingen in aminozuursamenstelling ook in hemoglobine van normale gezonde personen voorkomen, maar dan in zeer lage frequentie (ongeveer 1 per 10^7 cellen).

De groep van Stamatoyannopoulos (Papayannopoulou et al., 1977) heeft antilichamen geproduceerd tegen enige van deze mutant-eiwitten. Deze antilichamen kunnen beladen worden met sterk fluorescerende moleculen waardoor het mogelijk is cellen die deze mutant moleculen bezitten, in een fluorescentie microscoop zichtbaar te maken. Mendelsohn en zijn groep (1980) en ook onderzoekers van de Universiteit van Leiden in de afdeling Stralengenetica en Chemische Mutagenese, in samenwerking met de afdeling voor Humane Genetica en de afdeling Histochemie en Cytochemie hebben apparatuur ontwikkeld waarmee het mogelijk is per seconde de fluorescerende eigenschappen van 10^6 cellen te meten (Jensen et al., 1983; Sobels, 1985). Toepassing van de methode is sterk afhankelijk van de kwaliteit van de antilichamen tegen variant moleculen en een verdere ontwikkeling van de flow-cytometrie en/of andere microscopische technieken voor het zeer snel en accuraat tellen van fluorescerende mutant-cellen (frequentie ongeveer 1 op 10^7) tegen een zeer hoge achtergrond van niet fluorescerende cellen.

In principe zou deze methode, na ontwikkeling, ideaal zijn voor bevolkingsonderzoek op grote schaal.

5.2 Stofgebonden biologische monitoring

De enige methode die in principe direct de lesie in het juiste target kan bestuderen, is de bepaling van chemisch gedefinieerde DNA-adducten. Deze bepaling maakt het mogelijk de mate van expositie aan één bepaalde chemische stof (of groep verwante stoffen) te meten en bovendien vast te stellen dat de stof in een reactieve vorm het DNA heeft bereikt (Wright, 1983; Baan et al., 1983; Lohman et al., 1983).

Genotoxische carcinogenen produceren adducten met DNA. Sommige van deze adducten worden verondersteld aan de aan tumorvorming ten grondslag liggende mutatie gerelateerd te zijn, terwijl andere DNA-adducten niet mutageen en dus waarschijnlijk ook niet carcinogeen zijn. Deze verschillende DNA-adducten kunnen in principe ieder afzonderlijk gemeten worden. Het (enige) materiaal waar in de praktijk bij de mens aan gemeten kan worden, is het DNA van kernhoudende bloedcellen. Ehrenberg had reeds opgemerkt dat deze cellen een weinig geschikte bron zijn wanneer standaard (fysisch-) chemische bepalingprocedures worden gevolgd. Er zijn veel gevoeliger methoden vereist.

5.2.1 Immunochemische detectie van DNA-adducten

Theoretisch heeft deze methode goede mogelijkheden om tot een echte risicometing te komen. Hij kan in dierexperimenten goed ontwikkeld worden, waarbij ook de relatie met carcinogenese bestudeerd kan worden. Een eerste mogelijkheid om dit laatste ook bij de mens te proberen, is bij kankerpatiënten die met cytostatica worden behandeld (Lohman et al., 1983). Dit is een groep personen, die onder precies bekende omstandigheden (wat betreft rookgewoonte, leeftijd en andere factoren) met bekende hoge doses van deze genotoxische stoffen behandeld worden. Door het volgen van deze groep na genezing worden (helaas) gegevens verkregen over het voorkomen van zgn. secundaire tumoren, veroorzaakt door het cytostaticum. Het optreden van deze secundaire tumoren kan dan vergeleken worden met de hoeveelheid en de aard van de DNA-adducten.

Momenteel is de ontwikkeling van een immuno-assay langdurig en kostbaar, omdat in principe voor elk adduct eerst een geschikt antiserum moet worden verkregen, maar nieuwe ontwikkelingsmethoden kunnen dit proces waarschijnlijk (sterk) versnellen. Is het juiste antilichaam eenmaal beschikbaar, dan behoort bevolkingsonderzoek op grote schaal echter tot de mogelijkheden omdat de techniek vrij eenvoudig is en geschikt voor routinematige toepassing.

Deze methodiek heeft het nadeel van iedere stofgebonden techniek, nl. dat voor iedere chemische stof een afzonderlijke methodiek uitgewerkt moet worden. In bepaalde gevallen zal dit bezwaar niet gelden, bijvoorbeeld voor verbindingen die hetzelfde DNA-adduct induceren of wanneer antilichamen gericht zijn tegen een structuur die in verschillende verwante agentia voorkomt.

5.2.2 De analyse van DNA-adducten volgens Randerath

Met deze methode (Randerath et al., 1981) worden meestal niet-gedefinieerde DNA-adducten aangetoond in cellen behandeld met genotoxische agentia. De methode berust op het radioactief merken van nucleotiden verkregen door enzymatische afbraak van DNA, via een enzymatische reactie met hoog-specifiek gemerkt ^{32}P -ATP. Gemodificeerde nucleotiden (representatief voor de oorspronkelijke DNA-adducten) kunnen op relatief eenvoudige wijze kwalitatief aangetoond worden d.m.v. een tweedimensionale scheidingsmethode en autoradiografie. Op deze chromatogrammen worden de gemodificeerde nucleotiden als radioactieve vlekken waargenomen, die door hun afwijkende loop-snelheid op andere plaatsen liggen dan de niet-gemodificeerde nucleotiden ("Fingerprint" van de DNA modificaties teweeggebracht door een genotoxische stof of groep van stoffen). De gemodificeerde nucleotiden kunnen stofafhankelijk worden aangetoond na identificatie van de vlekken met afwijkende loopsnelheid door calibratie met bekende DNA-adducten. In de praktijk blijkt echter een dergelijke calibratie nogal lastig uitvoerbaar, omdat veelal de DNA-adducten niet bekend zijn of de gemodificeerde nucleotiden moeilijk chemisch gesynthetiseerd kunnen worden. Kwalitatief is de gevoeligheid van de methode ongeveer even groot als die van de hierboven beschreven immunochemische methode voor het aantonen van DNA-adducten (afwijkende vlekken kunnen worden gevonden wanneer één adduct per 10^8 - 10^9 niet-gemodificeerde nucleotiden aanwezig is), maar kwantificering is lastiger. Bovendien blijkt dat, hoewel slechts 1 μg afgebroken DNA nodig is voor de scheiding, het DNA eerst gezuiverd moet worden, hetgeen pas mogelijk is uitgaande van ongeveer 100 μg DNA. Dit betekent dat minimaal ongeveer 10^7 cellen nodig zijn.

De methode is nog vrijwel niet in vivo toegepast, maar, gezien de gevoeligheid, is verder onderzoek zeker gerechtvaardigd.

6. CONCLUSIES

- 6.1 Een directe bepaling van het risico voor beroepskanker uit epidemiologische gegevens is in Nederland vooreerst niet mogelijk.
- 6.2 Er is gebrek aan methoden voor biologische monitoring waarmee expositie aan de blootgestelde mens zelf gemeten kan worden.
- 6.3 Geen enkele methode voor biologische monitoring is (reeds) bruikbaar als routine. Alle beschikbare methodes moeten nog als experimenteel beschouwd worden.
- 6.4 In principe is biologische monitoring van werknemers, blootgesteld aan genotoxische carcinogenen mogelijk.
- 6.5 Goed uitgevoerde biologische monitoring moet het mogelijk maken een indicatie te verkrijgen of er expositie is opgetreden en, zo ja, of dit in een biologisch relevante mate is gebeurd. Het is echter nog niet mogelijk een risico te schatten dat met expositie verbonden is.
- 6.6 In ieder afzonderlijk geval moet beslist worden, in het licht van de werksituatie en de gebruikte chemicaliën, of er methodieken voor biologische monitoring beschikbaar zijn en, zo ja, welke methodiek het meest geschikt is voor deze situatie.
- 6.7 Goed uitgevoerde biologische monitoring vereist degelijke voorbereiding door ervaren onderzoekers in uitstekende samenwerking met de bedrijfsleiding, technici, bedrijfsartsen en de werknemers van het te onderzoeken bedrijf. Deze samenwerking is noodzakelijk om (i) de juiste methode te kiezen of te ontwikkelen, (ii) een optimale controlegroep te kiezen en (iii) de resultaten te interpreteren (vaak zijn bedrijfsgegevens zeer belangrijk voor de interpretatie van de testgegevens).
- 6.8 Voor het beoordelen van de resultaten van een onderzoek is de grootte van het verschil tussen geëxposeerde werknemers en controles soms van groter belang dan het antwoord op de evenzeer noodzakelijke vraag of het verschil statistisch significant is.
- 6.9 Al is een risico-schatting met de huidige technieken nog niet mogelijk, de beschreven nieuwe technieken zouden in de toekomst hierin enige verbetering kunnen brengen.
- 6.10 Indien al mogelijk, zal risico-schatting met één van de beschreven methoden in de afzienbare toekomst alleen mogelijk zijn voor genotoxische stoffen. Stoffen waarvan het carcinogene risico niet op een genotoxische werking berust (b.v. promotors) kunnen met de besproken technieken niet worden aangetoond. Voor deze laatste stoffen zijn

wel - andere - methoden in onderzoek, maar geen daarvan is reeds aan validatie toe.

- 6.11 Risico-schatting, indien mogelijk, zal voornamelijk toepasbaar zijn bij groepen werknemers en waarschijnlijk slechts incidenteel bij individuen.
- 6.12 Evenmin als een duidelijke verhoging momenteel een risico-schatting mogelijk maakt, kan uit een negatieve uitkomst zonder meer geconcludeerd worden dat geen risico bestaat.

7. LITERATUURLIJST

Albertini, R.J. (1982) Studies with T-Lymphocytes: An approach to human mutagenicity monitoring in: B.A. Bridges, B.E. Butterworth, I.B. Weinstein (Eds.) Banbury Report 13. Indicators of genotoxic exposure. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 393-412.

Anderson, D. and M. Legator (1983) Practical Issues in the evaluation of monitoring techniques need for validation, quality assurance and establishment of baseline levels in: Intern. Seminar on Methods of Monitoring Human Exposure to Carcinogens and Mutagens, 12-15 Dec., Espoo, Finland.

Baan, R.A., P.H.M. Lohman, O. Brocades Zaalberg, M.A. Schoen, A.M.J. Fichtinger-Schepman, H.H. Schutte, G.P. van der Schans (1983) Future tools in Biomonitoring, in: "Cancer in the Workplace" Conference, held at Vancouver B.C., May 16-18, Canada.

Bora, G.R. Douglas and E.R. Nestmann (Eds.) (1982) "Chemical Mutagenesis, Human Population Monitoring and Genetic Risk Assessment," Progress in Mutation Research, Vol. 3, Elsevier Biomedical Press, Preface by Eds.

Buckton, K.E., G.E. Hamilton, L. Paton and A.O. Langlands (1978) Chromosome Aberrations in irradiated Ankylosing Spondylitis Patients, in: H.J. Evans and D.C. Lloyd (Eds.). Mutagen-Induced Chromosome damage in Man. Edinburgh University Press, pp. 142-150.

Carrano, A.V. (1982) Sister Chromatid Exchange as an indicator of human exposure, in: B.A. Bridges, B.E. Butterworth, I.B. Weinstein (Eds.). Banbury Report No. 13. Indicators of genotoxic exposure. Cold Spring Harbor Laboratory, pp 307-318.

Cohen, B.L. (1982) The cancer risk from low level radiation, in: G.C. Berg and H.D. Maillie (Eds.). Measurement of Risk. Plenum Press, New York pp. 497-519.

Combes, R.D., C.N. Edwards and J.M. Walters (1982) An assessment of fecal mutagen analysis for predicting genotoxic exposure of rats to some orally administered carcinogens, in: B.A. Bridges, B.E. Butterworth, I.B. Weinstein (Eds., P.T.O.). Banbury Report No. 13. Indicators of genotoxic exposure. Cold Spring Harbor Laboratory pp. 49-65.

Dalderup, L.M. et al. (1976) Angiosarcoma of the liver and vinylchloride. T. soc. Geneesk. 54, pp. 333-335.

Delemarre, J.F.M. en H.H. Themans (1971) Het adenocarcinoom van de neusholten. Ned. T. Geneesk. 115, pp. 688-689.

De Serres, F.J. and J. Ashby (Eds.) (1981) Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens. Report of the International Collaborative Programme. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Doll, R (1977) Strategy for detection of cancer hazards to man, Nature 265, pp. 589-596.

Doll, R. and R. Peto (1981) Avoidable Risks of Cancer in the U.S. J. Natl. Cancer Inst. 66 , pp. 1195-1308.

Ehrenberg, L., E. Moustacchi and S. Osterman-Golkar (1983) Dosimetry of genotoxic agents and dose-response relationships of their effects. Mutation Res. 123, pp. 121-182.

Ehrenberg, L. (1983) Covalent Binding of genotoxic agents to proteins and nucleic acids, in: International Seminar on Methods of Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents, 12-15 Dec. 1983, Espoo, Finland.

Evans, H.J. (1982) Cytogenetic studies on industrial populations exposed to mutagens, in: B.A. Bridges, B.E. Butterworth, I.B. Weinstein (Eds.). Banbury Report No. 13. Indicators of genotoxic exposure. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 325-340.

Evans, H.J. (1983) Cytogenetic Methods for detecting effects of chemical mutagens, in: G.M. Williams, V.C. Dunkel, V.A. Ray Eds. Cellular Systems for Toxicity Testing. Ann. New York Ac. Sciences 407, pp. 131-141.

Evans, H.J., K.E. Buckton, G.E. Hamilton and A. Carothers (1979) Radiation-induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers, *Nature* 277, pp. 531-534.

Evans, H.J. (1979) The induction of aberrations in human chromosomes following exposure to mutagens/carcinogens, *in*: P. Emmelot and E. Kriek (Eds.) *Environmental Carcinogenesis*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 329-344.

Fantes, J.A., D.K. Green, J.K. Elder, P. Malloy and H.J. Evans (1983) Detecting Radiation Damage to human chromosomes by flow cytometry. *Mutation Res.* 119, pp. 161-168.

Farmer, P.B., E. Bailey, J.B. Campbell (1983) The use of alkylated proteins in the monitoring of exposure to alkylating agents in Intern. Seminar on Methods of Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents, 12-15 Dec. 1983, Espoo, Finland.

Filser, J.G. and H.M. Bolt (1983) Exhalation of ethylene oxide by rats on exposure to ethylene. *Mutation Res.* 120, pp. 57-60.

Fokkens, W. (1982) Gericht onderzoek naar risicofactoren ten aanzien van blaascarcinoom. *Ned. T. Geneesk.* 60, pp. 628-830.

Fox, A.J. and P.F. Collier (1977) Mortality experience of workers exposed to vinylchloride monomer in the manufacture of polyvinylchloride in Great Britain. *Brit. J. Ind. Med.* 34, pp. 1-10.

Frentzel-Beyme, R. (1983) Lung cancer Mortality of workers employed in Chromate Pigment Factories. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 105, pp. 183-188.

Funes-Cravioto, F., B. Lambert, J. Lindsten, L. Ehrenberg, A.T. Natarajan and S. Osterman-Golkar (1975) Chromosome aberrations in workers exposed to vinylchloride. *Lancet* 1, p. 459.

Garner, R.C. (1985) Assessment of carcinogen exposure in man. *Carcinogenesis* 6, pp. 1071-1078.

Gezondheidsraad (1978) Advies inzake de beoordeling van carcinogeniteit van chemische stoffen.

Hayes, R.B., J.P. van Nieuwenhuizen, J.W. Raatgever and F.J.W. ten Kate (1984) Aflatoxin exposure in the industrial setting: An epidemiological study of mortality. *Fd. Chem. Toxicol.* 22, pp. 39-43.

Henderson, P.T., R. van Doorn, C.M. Leydekkers en R.P. Bos (1983) Excretion of thioethers in urine after exposure to electrophilic chemicals, in: International Seminar on methods of monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents, 12-15 Dec. 1983, Espoo, Finland.

Higginson, J. and Muir, C.S. (1979) Environmental Carcinogenesis: Misconceptions and limitations to cancer control. *J. Natl. Cancer Inst.* 63, pp. 1291-1298.

Hook, E.B. (1982) Epidemiologic and design aspects of studies of somatic chromosome breakage and sister-chromatid exchange. *Mutation Res.* 99, 372-382.

IARC Internal Technical Report No. 83/001 (1983) Approaches to classifying chemical carcinogens according to mechanisms of action.

ICPEMC Committee 1 Final Report (1983) Screening Strategy for chemicals that are potential germ-cell mutagens in mammals. *Mutation Res.* 114, pp. 117-177.

ICPEMC Committee 2 Final Report (1983) Mutagenesis Testing as an approach to carcinogenesis. *Mutation Res.* 99, pp. 73-91.

ICPEMC Committee 5 Final Report (1983) Mutation Epidemiology: Review and Recommendations. *Mutation Res.* 123, pp. 1-11.

ICPEMC Report Task Group 5 on the differentiation between genotoxic and non genotoxic carcinogens (1984) *Mutation Res.* 133, pp. 1-49.

ICPEMC 1981: Sram, R.J., L. Tomatis, J. Clemmesen and B.A. Bridges. An Evaluation of the genetic toxicity of epichlorhydrin. *Mutation Res.* 87, pp. 299-319.

ICPEMC Publ. No. 10 (1983) Review of the evidence for the presence or absence of thresholds in the induction of genetic effects by genotoxic chemicals. *Mutation Res.* 123, pp. 281-341.

Jansen, J.D. (1983) Dose-Response Relation of Chromosome Aberrations, in: Castellani Ed. The use of human cells for the assessment of risk from physical and chemical agents. Plenum Press, New York, pp. 63-76.

Jensen, R.H., W. Bigbee and E.W. Branscomb. Somatic Mutations detected by immunofluorescence and Flow Cytometry, in: Proceedings of the Intern. Symposium on Biological Dosimetry, in press.

Kato, H. and W.J. Schull. Studies of the mortality of A Bomb survivors. 7. Mortality 1950-1978. Part I. Cancer Mortality. *Radiation Res.* 90: 395-432.

Lambert, B., A. Lindblad, K. Holmberg and D. Fransesconi (1982) The use of sister chromatid exchange to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents, in: S. Wolff (Ed.). Sister Chromatid Exchange, John Wiley and Sons, New York, pp. 149-182.

Land, C.E. (1982) Biological Models in Epidemiology: Radiation Carcinogenesis, in: G.C. Berg and H.D. Maillie (Eds.) Measurement of Risk. Plenum Press, New York pp. 71-105.

Latt, S.A., J.W. Allen, W.E. Rogers and L.A. Juergens (1979) In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange formation, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel Eds. Handbook of Mutagenicity Testing Procedures, Elsevier, pp. 275-291.

Lauwerijs, R. (1983) Basic concepts of human exposure monitoring, in: Intern. Seminar on Methods of Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents, 12-15 Dec., Espoo, Finland.

Legator, M.S., T.G. Pullin and T.H. Connor (1979) The isolation and detection of mutagenic substances in body fluid and tissues of animals and body fluid of human subjects, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel, Eds. Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier, Amsterdam, pp. 149-159.

Lloyd, D.C., R.J. Purrot, G.W. Dolphin, D. Bolton, A.A. Edwards and M.J. Corp (1975) The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 28, pp. 75-90.

Lohman, P.H.M., J.D. Jansen and R.A. Baan (1983) Comparison of various methodologies with respect to specificity and sensitivity in biomonitoring occupational exposure to mutagens and carcinogens, *in: Intern. Seminar on Methods of Monitoring Human Exposure to Carcinogens and Mutagens*, 12-15 Dec., Espoo, Finland.

Lohman, P.H.M., R. Lauwerijs and M. Sorsa (1983) Methods of monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents, Summary report of the Inter. Seminar on Methods of Monitoring Human Exposure to Carcinogens and Mutagens, 12-15 Dec., Espoo, Finland.

Mäki-Paakkanen, J., M. Sorsa and H. Vainio (1981), Chromosome aberrations and sister-chromatide exchanges in lead-exposed workers, *Hereditas* 94, 269-275.

Mendelsohn, M.L., W.L. Bigbee, E.W. Branscomb and G. Stamatoyannopoulos (1980) The detection and sorting of rare sickle-hemoglobin containing cells in normal human blood. *Flow Cytometry IV*, pp. 311-313.

Meretoja, T. *et al.* (1978) Chromosome aberrations in lymphocytes of workers exposed to styrene. *Scand. J. Work Environ and Health* 4, pp. 259-264.

Natarajan, A.T. (1984) Personal communication.

Natarajan, A.T. and G. Obe (1980) Screening of Human Populations for Mutations induced by Environmental Pollutants: Use of Human Lymphocyte system. *Ecotoxicol. and Environm. Safety* 4, pp. 468-481.

Nguyen, Tot V., J.C. Theiss and T.S. Matney (1982) Exposure of pharmacy personnel to mutagenic antineoplastic drugs. *Cancer Res.* 42, pp. 4792-4796.

Nowell, P.C. (1969) Biological significance of induced human chromosome aberrations. *Fed. Proc.* 28, pp. 1797-1803.

Obe, G., H.J. Vogt, S. Madle, A. Fahning and W.D. Heller (1982) Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes in vivo, *Mutation Res.* 92, 309-319.

Obe, G. (1984) personal communication (publication in preparation)

Papayannopoulou, Th., G. Lim, T.C. McGuire, V. Ahern, P.E. Nute, G. Stamatoyannopoulos (1977) Use of specific fluorescent antibodies for the identification of Hemoglobin C in erythrocytes. *Am. J. Hemat.* 2, pp. 105-115.

Randerath, K. et al. (1981) ³²P-labelling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6126-6129.

Russell, W.L. (1981) Problems and Solutions in the estimation of genetic risks from radiation and chemicals, in: *Proc. 13th Rochester Intern. Conference on Environm. Toxicity*, Plenum, New York, pp.d 361-380.

Sasaki, M.S. and H. Miyata (1968) Biological dosimetry in atomic bomb survivors. *Nature* 220, p. 1189.

Sarto, F. et al. (1982) Increased incidence of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in workers exposed to chronic acid in electroplating industries. *Carcinogenesis* 3, pp. 1011-1016.

Sarto, F. et al. (1983) Workers exposed to ethylene oxide have increased incidence of sisterchromatid exchange, in: *International Seminar on Methods of Monitoring Human Exposure to carcinogenic and mutagenic agents*, 12-15 Dec., Espoo, Finland.

Schmid (1975) The Micronucleus Test. *Mutation Res.* 31, pp. 9-15.

Schull, W.J., M. Otake and J.V. Neel (1981) A reappraisal of the genetic effects of the atomic bombs: Summary of a thirty-four year study. *Science* 213, pp. 1220-1227.

Sittert, N.J. van, G. de Jong, M.G. Clare, R. Davies, B.J. Deau, L.J. Wren, A.S. Wright (1984) Cytogenetic, immunological and haematological effects in workers in an ethylene oxide manufacturing plant. *Br. J. Ind. Med.* in press.

Sobels, F.H. (1985) Changing concepts in Mutation Research, Proceedings 9th Int. Congress on Environmental Mutagenesis, Stockholm, Alan Liss, New York, in press.

Sorsa, M., H. Norppa and H. Vainio (1982) Induction of Sister Chromatid Exchanges among nurses handling cytostatic drugs, in: B.A. Bridges, B.E. Butterworth, I.B. Weinstein (Eds.). Banbury Report No. 13. Indicators genotoxic exposure. Cold Spring Harbor Laboratory pp. 341-354.

Sorsa, M. (1983) Monitoring of Sister Chromatid Exchanges and Micronuclei as biological endpoints. Paper presented at Intern. Seminar on Methods of Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents, 12-15 Dec. Espoo, Finland.

Stich, H.F. and M.P. Rosin, Micronuclei in exfoliated human cells as an internal dosimeter for exposures to carcinogens, in: H.F. Stich Ed. Carcinogens and Mutagens in the Environment. Naturally Occurring Compounds: Endogenous formation and Modulation, CRC Press, Boca Raton Fla (in press).

Strauss, G.H. (1982) Direct Mutagenicity Testing: The development of a clonal assay to detect and quantitate mutant lymphocytes arising in vivo, in: B.A. Bridges, B.E. Butterworth, I.B. Weinstein (Eds.) Banbury Report 13. Indicators of genetic exposure. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 423-441.

Upton, A.C. (1984) Hiroshima and Nagasaki: Forty years later. Am. J. Industr. Med. 6: 75-85.

Vainio, H., M. Sorsa and K. Falck (1983) Bacterial urinary assay in monitoring exposure to mutagens and carcinogens, in: International Seminar on Methods of Monitoring Human Exposure to carcinogenic and mutagenic agents, 12-15 Dec., Espoo, Finland.

Venitt, S. (1982) Mutagens in human faeces. Are they relevant to cancer of the large bowel? Mutation Res. 98, pp. 265-286.

Weinstein, I.B. and F.P. Perera (1982) Molecular Cancer Epidemiology, in: B.A. Bridges, B.E. Butterworth, I.B. Weinstein (Eds.). Banbury Report No. 13. Indicators of genotoxic exposure. Cold Spring Harbor Laboratory pp. 3-17.

Weisburger, J.H. (1979) Mechanism of action of diet as a carcinogen, *Cancer* 43, pp. 1987-1995.

Wolff, S. (1983) Sister Chromatid Exchange as a test for mutagenic carcinogens, in: G.M. Williams, V.C. Dunkel, V.A. Ray Eds. Cellular Systems for Toxicity Testing. *Annals of New York Acad. of Sciences* Vol 407, pp. 142-153.

Wright, A.S. (1983) Molecular Dosimetry Techniques in human risk assessment: an industrial philosophy. Paper presented at 3rd Intern. Congress on Toxicology, San Diego, California, 2nd Sept.

Zielhuis, R.L. (1977) Biologische Monitoring in de Bedrijfsgeneeskunde: Algemene Aspecten, in Biologische Monitoring in de Bedrijfsgeneeskunde. Symposium van Coronel Laboratorium, 28-29 September, pp 3-23.

8. APPENDIX.

Samenvatting van praktijkresultaten verkregen met cytogenetisch onderzoek, en discussie daarover.

Tabel 1

(uit: Sorsa, 1983)

Published results on occupational exposures
and findings of SCE's and micronuclei (MN)

| <u>Major exposing chemical</u> | <u>SCE</u> | <u>MN</u> | <u>Reference</u> |
|--------------------------------|------------|-----------|--|
| Anesthetic gases | - | .. | Husum et al., 1980 |
| Asbestos | + | .. | Rom et al., 1983 |
| Benzene | + | .. | Watanabe et al., 1980 |
| Bichromate production | - | .. | Imreh and Radulescu, 1982 |
| Carbon disulfide | + | .. | Nordenson et al., 1980 |
| Chromic acid | + | .. | Sarto et al., 1982 |
| Cytostatic drugs | + | .. | Norppa et al., 1980 Sorsa et al., 1982 ^b |
| Epoxy resins | - | .. | Mitelman et al., 1980, |
| Ethylene oxide | + | + | Högstedt et al., 1983 ^b Yager et al., 1983 |
| Lead smelting | (+) | .. | Mäki-Paakkanen et al., 1981 |
| Organic solvents | + | .. | Funes-Cravioto et al., 1979 |
| Pentachlorophenol | - | .. | Bauchinger et al., 1982 |
| Petroleum products | .. | + | Högstedt et al., 1981 |
| Phenoxy acid herbicides | - | .. | Linnainmaa et al., 1983 |
| Rubber chemicals | + | .. | Sorsa et al., 1982 |
| Styrene | + | + | Andersson et al., 1980 Högstedt et al., 1979 |
| 2,4,5-T (accident) | - | .. | Blank et al., 1983 |
| Tetrachloroethylene | - | .. | Ikeda et al., 1980 |
| Toluene | + | .. | Bauchinger et al., 1982 Mäki-Paakkanen et al., 1980 |
| Vinyl chloride | + | .. | Anderson et al., 1980, 1981 |
| Welding (MMA) fumes | - | .. | Husgafvel-Pursiainen et al., 1982 |
| Xylene | (+) | .. | Haglund et al., 1980 |

+ positive results, (+) suggestive positive results, - negative results,
.. no data

De referenties zijn voor het merendeel niet in dit rapport opgenomen, maar kunnen worden teruggevonden in Sorsa (1983).

Tabel 2

(Evans, 1982)

Some occupationally exposed populations showing clearly increased aberration frequencies, relative to controls, in peripheral blood lymphocytes

| <u>Agent</u> | <u>Population size</u> | <u>Selected references</u> |
|---------------------|------------------------|---|
| X or γ-rays | > 1000 | Evans <u>et al.</u> , 1979 Lloyd <u>et al.</u> , 1980 |
| Arsenic | 33 | Nordenson <u>et al.</u> , 1978 |
| Benzene | > 190 | Tough <u>et al.</u> , 1970 Forni <u>et al.</u> , 1971 |
| Chloromethylether | 12 | Zudova and Landa, 1977 |
| Chloroprene | > 50 | Zhurkov <u>et al.</u> , 1977 |
| Epichlorhydrin | > 100 | Kucerova <u>et al.</u> , 1977 Picciano <u>et al.</u> , 1977 |
| Organophosphates | > 180 | Van Bao <u>et al.</u> , 1974 Kiralý <u>et al.</u> , 1977 |
| Pesticide/Herbicide | > 40 | Yoder <u>et al.</u> , 1973 |
| Styrene | > 50 | Meretoja <u>et al.</u> , 1977 Andersson <u>et al.</u> , 1980 |
| Vinyl chloride | > 500 | Hansteen <u>et al.</u> , 1978 Andersson <u>et al.</u> , 1981 |
| Ziram | 9 | Pilinskaya, 1970 |

De referenties zijn voor het merendeel niet in dit rapport opgenomen, maar kunnen worden teruggevonden in Evans (1982).

Wat betreft SCE's kunnen ook nog de commentaren van Evans worden weergegeven, zoals opgetekend in Evans (1982) pagina 339:

"A very important point in all these studies on occupationally exposed people is that if you divide the groups into cigarette smokers and non-smokers, usually the more significant effect is smoking, not occupational exposure. That is true, I think, in most of the studies. But I am very worried about smoking in terms of the interpretation of this up to 30% increase of SCE frequency in smokers against non-smokers. I am concerned because we can detect up to a 30% increase in SCE frequency in people who don't smoke, but who show a different lymphocyte profile from normal. We see this level of increase in people who have disease states that change the proportions of T-cells and B-cells in the peripheral blood, e.g., patients with muscular dystrophy or Huntington's chorea. I think there is no question that there are subpopulations of T-lymphocytes that are not homogeneous in their response to exposure to BrdU. We obviously need to

know a great deal more about the structure of the lymphocyte populations if we have to interpret very small changes in SCE frequency."

In het "Banbury report 13", waarin de genoemde presentatie van Evans (1982) is opgenomen, wordt op pagina 353 (Sorsa, 1982) de volgende discussie over Tabel 2 weergegeven:

Sorsa: "If we are very critical about the occupational groups in which there is incontrovertible evidence about either increased structural chromosome aberrations or SCEs, the number is really small. John Evans showed us a list (= Tabel 2), but I think if one is severely critical, there are only five agents where there is clear confirmatory evidence from independently repeated studies. They would be studies on benzene, ethylene oxide, styrene, vinyl chloride, and epichlorohydrin." *

Evans: "I would not disagree, for much of the published data is equivocal and some downright contradictory. However, the question often arises as to whether positive results can be really ascribed to the substance that is considered to be the occupational mutagen."

Tabel 1 en 2 en de weergegeven discussie tesamen illustreren het probleem dat interpretatie van één enkele publikatie in het algemeen niet mogelijk is. Dit komt omdat:

- a. de waargenomen verschillen klein zijn
- b. de controle groep nooit "ideaal" kan zijn (wegens niet-meetbare verschillen in rookgewoonten en andere "life-style" factoren)
- c. grote verschillen in individuele gegevens tussen laboratoria bestaan wat het niet mogelijk maakt om eenduidige conclusies te trekken.

Een andere illustratie van de onmogelijkheid om op basis van één publicatie conclusies te trekken over de genotoxiciteit van stoffen, wordt gegeven door Mäki-Paakanen et al. (1981). In een overzicht over loodexposities geven zij 11 positieve uitkomsten naast 10 negatieve uitkomsten (inclusief een eigen observatie) over chromosoom-aberraties en SCE's. Deze gegevens betekenen niet noodzakelijkerwijs dat lood geen genotoxisch effect heeft, maar illustreren hoezeer deze methodieken nog in een experimenteel stadium verkeren.

* Ons eigen commentaar op deze door Sorsa verkorte lijst is gegeven op bladz. 20 van dit rapport.