

Ser. 4
S7

Richtlijnen voor toxicologisch onderzoek van chemische stoffen waaraan mensen op de werkplek worden blootgesteld



Nederlands Instituut voor Arbeidsomstandigheden



NIA0033820

Directoraat-Generaal van de Arbeid



S7

Richtlijnen voor toxicologisch onderzoek van chemische stoffen waaraan mensen op de werkplek worden blootgesteld

Nederlands Instituut voor
Arbeidsomstandigheden NIA
bibliotheek-documentatie-informatie
De Boelelaan 30, Amsterdam-Buitenvaldert

ISN-nr.
plaats
datum

13630
Ser 4. 57

Dit rapport werd, in opdracht van het
Directoraat-Generaal van de Arbeid,
opgesteld door TNO.

RICHTLIJNEN VOOR TOXICOLOGISCH ONDERZOEK VAN CHEMISCHE STOFFEN WAARAAN
MENSEN OP DE WERKPLEK WORDEN BLOOTGESTELD

INLEIDING

Jaarlijks verschijnen er voor diverse doeleinden nieuwe chemische stoffen op de markt. Bij de produktie, maar ook bij de bewerking of verwerking kunnen werkers aan deze stoffen worden blootgesteld. Het is dan ook van belang te weten in hoeverre van een stof een voor de gezondheid schadelijke werking is te verwachten zodat, indien nodig of gewenst, beschermende maatregelen kunnen worden genomen zoals het werken met handschoenen, speciale kleding, gasmasker of zelfs uitsluitend in gesloten systemen. Stoffen kunnen dermate grote risico's voor de gezondheid geven dat het nodig kan zijn de produktie en toepassing ervan te verbieden, dan wel het werken ermee alleen toe te laten wanneer stringente beschermende maatregelen worden toegepast en strikte gezondheidsbewaking van de werkers wordt doorgevoerd.

Het doel van de onderhavige richtlijnen is aan te geven welk toxicologisch onderzoek nodig is om een juist oordeel te kunnen vormen over de potentiële risico's voor de gezondheid van mensen die op de werkplek aan chemische stoffen worden blootgesteld. Dit preventief toxicologisch onderzoek zal enerzijds door de overheid gebruikt worden om beleid te voeren met betrekking tot het geven van toestemming voor het produceren of toepassen van de stof en het aangeven van de voorwaarden waaronder met de stof mag worden gewerkt; anderzijds krijgt de werkgever inzicht in de toxiciteit van de stof en kan in een vroeg stadium besluiten de stof niet verder aan te wenden omdat de potentiële risico's voor de mensen op de werkplek te groot worden geacht en/of omdat de produktie, bewerking of verwerking commercieel niet haalbaar is gezien de hoge kosten verbonden aan de toepassing van afdoende arbeidshygiënische maatregelen.

De richtlijnen zijn zodanig opgesteld dat het toxicologisch onderzoek, in analogie met de EG-richtlijn 79/831/EEG (zie pagina 3), in fasen kan verlopen. Bij deze fasering is als uitgangspunt gebruikt de wenselijkheid een beter inzicht te krijgen in de aard en mate van toxiciteit van een stof naargelang meer mensen aan de stof worden blootgesteld of de expositie intensiever is. Getracht is om te komen tot een, toxicologisch gezien, zo evenwichtig en rationeel mogelijke samenstelling van de verschillende fasen, verder aan te duiden als verschillende niveaus van onderzoek.

Nu bestaat er geen uniforme methode voor toxicologisch onderzoek van alle stoffen. Het onderzoek dat voor een bepaalde stof noodzakelijk is, zal sterk afhankelijk zijn van de chemische en fysische eigenschappen van de stof en eventueel ook van de toepassing van de stof.

TOXICOLOGISCH ONDERZOEK

Het toxicologisch onderzoek heeft tot doel gegevens te verschaffen die nodig zijn om te kunnen beoordelen of, en zo ja, in hoeverre de produktie en de be- en verwerking van chemische stoffen risico's met zich meebrengen voor de gezondheid van mensen op de werkplek. Hierbij zijn uiteraard gegevens over mensen die blootgesteld zijn geweest aan deze stoffen van grote waarde. Vaak echter zullen deze gegevens onvoldoende informatie verschaffen om een kwantitatieve evaluatie mogelijk te maken.

Betreft het nieuw te produceren stoffen dan ontbreken toxiciteitsgegevens bij mensen en zal het oordeel uitsluitend gebaseerd moeten worden op experimenteel toxiciteitsonderzoek met proefdieren. Deze proefdieren dienen gegevens op te leveren over de aard van de schadelijke werking van een stof en over de concentraties waarbij de toxische effecten optreden. Tevens dienen de proeven informatie te geven over de hoogste concentratie waarbij geen nadelige effecten meer werden geconstateerd (no-toxic-effect level). De gegevens zullen zodanig moeten zijn dat op grond hiervan een verwachting van de werking bij de mens kan worden geformuleerd. Men dient er oog voor te hebben dat zelfs de meest adequate dierproef nooit met absolute zekerheid de werking van een stof bij de mens kan voorspellen. De resultaten van de dierproef dienen niettemin vertaald te worden in acceptabele omstandigheden voor de mens op de werkplek, hetgeen gepaard gaat met onzekerheden, die echter worden gecompenseerd door het toepassen van veiligheidsfactoren.

De belangrijkste blootstellingsroute in de industrie is de inhalatoire. Daarnaast treedt contact op met huid en ogen. Bij blootstelling aan aerosolen inclusief stofdeeltjes kan ook orale opname van betekenis zijn. Rekening dient te worden gehouden met bepaalde categorieën van werkers, zoals vrouwen in de vruchtbare leeftijd.

Het is van groot belang zo snel mogelijk inzicht te verkrijgen in de mogelijke mutagene en carcinogene eigenschappen van een stof. In een vroeg stadium van het onderzoek dient hieraan aandacht te worden geschonken o.a. door het uitvoeren van kortdurende screeningstesten voor carcinogeniteit. Dit soort testen is nog sterk in ontwikkeling. Regelmatig worden bestaande testen verbeterd, terwijl nieuwe worden ontwikkeld.

Het is noodzakelijk deze ontwikkelingen te blijven volgen.

Daar in de definitie van de Nederlandse MAC-waarde met name ook gesproken wordt over bescherming van het nageslacht dient in een vroeg stadium aandacht te worden geschonken aan onderzoek waarmee effecten op de vruchtbaarheid en het nageslacht kunnen worden opgespoord (reproductie-onderzoek).

Het is wenselijk reeds in een vroeg stadium toxicokinetisch, met behulp van stapelingsonderzoek, na te gaan of cumulatieve effecten te verwachten zijn. Als bij regelmatige blootstelling aan een stof, of aan een metabooltje ervan, deze zich langzaam in het lichaam ophoopt ("stapelt"), kan dit tot gevolg hebben dat een toxisch-effect niveau pas na langere tijd wordt bereikt. Wordt gevonden dat stapeling plaats vindt, dan zal meestal niet volstaan kunnen worden met een subacute proef maar zal ook langer durend toxiciteits-onderzoek noodzakelijk zijn.

In latere stadia van het toxicologische onderzoek kan het van belang zijn het metabolisme van een stof nauwkeuriger te bestuderen om inzicht te krijgen in de moleculaire relatie tussen een schadelijk effect en de stof die dit veroorzaakt, vooral als verschillende proefdiersoorten verschillend op de stof reageren.

In navolging van Richtlijn 79/831/EEG van de Raad van Europese Gemeenschappen houdende de zesde wijziging van Richtlijn 67/48/EEG betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen wordt uitgegaan van een gefaseerde uitvoering van het toxiciteitsonderzoek in drie niveaus, die worden aangeduid met A, B en C. In de EG-richtlijn wordt

uitsluitend de produktiehoeveelheid genoemd als criterium bij de fasering van het toxiciteitsonderzoek. Een dergelijke benaderingswijze is voor een optimale gezondheidsbescherming van de werkers evenwel minder geschikt. Veel doelmatiger is het om bij de selectie van criteria ten behoeve van de fasering van het toxiciteitsonderzoek als leidraad te hanteren de omvang van het te verwachten gezondheidsrisico als gevolg van het werken met de betreffende stof.

Het onderzoek dat onder niveau A valt, het zgn. basispakket, is bedoeld om een indruk te krijgen over:

- (a) het risico verbonden aan momentane of kortdurende blootstellingen (acuut toxiciteitsonderzoek);
- (b) de aard van de nadelige effecten en de mate van cumulatieve toxiciteit (28-dagen toxiciteitsonderzoek, stapelingsonderzoek);
- (c) mogelijke schadelijke invloeden op de vruchtbaarheid of het nageslacht (reproductie- en mutageniteitsonderzoek), en
- (d) mogelijke kankerverwekkende activiteit (pre-screening toetsen op carcinogeniteit).

Het onderzoek op niveau B is bedoeld om nadere gegevens te verzamelen over:

- (a) de aard van mogelijke nadelige effecten bij meer langdurige blootstelling (13-weeken toxiciteitsonderzoek);
- (b) mogelijke mutagene en kankerverwekkende eigenschappen van een stof;
- (c) het metabolisch lot van een stof, en
- (d) de risico's voor zwangeren (teratogeniteitsonderzoek).

Het onderzoek op niveau C tenslotte omvat:

- (a) langdurige proeven gericht op het opsporen van chronische effecten inclusief kankerverwekkende activiteit (gecombineerde chronische toxiciteits/carcinogeniteitsproef);
- (b) diepgaander en omvangrijker onderzoek naar mogelijke effecten bij zwangeren (teratogeniteitsonderzoek bij tweede diersoort);
- (c) uitgebreider onderzoek naar de effecten van relatief kortdurende expositie (acuut en 28-dagen toxiciteitsonderzoek met een tweede diersoort), en
- (d) meer uitgebreid onderzoek over de stofwisseling van de stof.

In bepaalde gevallen kan speciaal onderzoek gewenst zijn, zulks ter beoordeling van de Arbeidsinspectie. Hierbij wordt ondermeer gedacht aan immunologisch onderzoek, neurotoxicologisch onderzoek en gedragstoxicologie met inbegrip van gedragsteratogeniteitsstudies.

Het verdient aanbeveling om het zogenaamde basispakket (niveau A) van toepassing te doen zijn op elke (nieuwe) stof waarmee gewerkt gaat worden en bij de beslissing omtrent de uitvoering van de niveaus B en C uit te gaan van de volgende criteria:

- mate en duur van de te verwachten expositie. Bepalend hierbij zijn de fysisch-chemische eigenschappen van de stof en de wijze van productie en toepassing (bijv. open versus gesloten systemen);
- de te verwachten omvang van de werkerspopulatie die mogelijk aan de betreffende stof wordt blootgesteld.

Men zij er op gewezen dat het tweede criterium, strikt genomen, geen gezondheidkundige basis kent. Het al dan niet accepteren van dit criterium is een beleidsbeslissing. Bij welke omvang van de werkerspopulatie niveau B en bij welke omvang niveau C moet worden uitgevoerd is eveneens een beleidskeuze.

Om praktisch hanteerbaar te zijn behoeft het eerste criterium een nadere uitwerking. Naast inventarisatie van de factoren die een indicatie kunnen verschaffen over met name de mate van de te verwachten expositie, zal tevens moeten worden bepaald wanneer niveau B of C dient te worden uitgevoerd. Ook dit laatste houdt (mede) een beleidsbeslissing in.

Uitvoering van experimenten op niveau B en/of C dient eveneens plaats te vinden indien de resultaten van de voorafgaande toxiciteitsonderzoeken dit wenselijk maken. Wanneer het toxiciteitsonderzoek op niveau A aanleiding geeft tot verder onderzoek, zal het niet altijd nodig zijn het volledige pakket van onderzoeken van niveau B uit te voeren, eventueel later gevolgd door het volledige pakket van niveau C. Vaak zullen één of meerdere onderzoeklijnen kunnen worden vastgesteld die via niveau B kunnen doorlopen in niveau C. Onder een onderzoeklijn wordt verstaan een bepaald type toxiciteitsonderzoek zoals bijvoorbeeld mutageniteits/carcinogeniteits- of reproductie/teratogeniteitsonderzoek, of speciaal onderzoek naar effecten op gedrag en zenuwstelsel. De richting van een dergelijke onderzoeklijn zal

vooral afhangen van de aard van de effecten die werden verkregen uit het voorafgaand onderzoek.

Wat de samenstelling van de niveaus betreft dient nog te worden opgemerkt dat deze zoveel mogelijk overeenkomt met die van de drie niveaus zoals die worden aangeduid in de hiervoor reeds genoemde Richtlijn 79/831/EEG van de Raad van Europese Gemeenschappen. Waar van deze richtlijnen wordt afgeweken zullen de redenen hiervan worden genoemd in een toelichting die per niveau wordt gegeven (cursieve tekst).

Gedetailleerde richtlijnen over de wijze van uitvoeren van de toxiciteitsproeven zullen nog worden verstrekt. Het voorstel is om deze voor de meeste proeven vrijwel integraal over te nemen van de richtlijnen van de "Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) enwel omdat

- (a) de OECD-richtlijnen zijn opgesteld door internationale groepen van deskundigen na frequente en diepgaande discussies;
- (b) de overtuiging bestaat dat hierdoor de aanvaardbaarheid van de resultaten van toxiciteitsexperimenten door diverse nationale en internationale instanties wordt vergroot, en
- (c) de resultaten van toxiciteitsexperimenten die in verschillende instituten zijn uitgevoerd, beter vergelijkbaar worden.

Waar van de OECD-richtlijnen zal worden afgeweken, worden de redenen hiervoor bij het betreffende protocol aangegeven.

Met name de richtlijnen voor het uitvoeren van het toxicokinetische onderzoek zullen in opzet afwijken van de overeenkomstige OECD-richtlijnen. In de laatstgenoemde wordt uitgegaan van een systematisch onderzoek naar resorptie, verdeling, uitscheiding en metabolisme. In het onderhavige onderzoeksvoorstel ligt de nadruk op het stapelingsonderzoek, omdat dit in verband met het mogelijk optreden van cumulatief toxische effecten als het meest relevant wordt gezien. Het andere hiervoor genoemde onderzoek komt daarom pas later en dan nog gefaseerd aan de orde.

Het kan gewenst zijn een toxiciteitsproef op een gemodificeerde wijze uit te voeren; ook kan het voorkomen dat om technische of om andere redenen een bepaald type toxiciteitsexperiment niet goed mogelijk is; dit geldt bijvoorbeeld voor toxicokinetisch onderzoek. In zulke gevallen verdient het aanbeveling contact op te nemen met de Arbeidsinspectie.

Om een indruk te geven van de kosten die het toxiciteitsonderzoek met zich meebrengt, zijn deze kosten per niveau en per type proef in bijlage 1 globaal aangegeven.

NIVEAU A

Samenstelling

Op dit niveau dienen de volgende proeven (het z.g. basispakket) te worden uitgevoerd:

Acuut toxiciteitsonderzoek

- inhalatoir (4-uur LC₅₀), bij voorkeur ratten. Voor gassen, vluchtige vloeistoffen en aerosolen inclusief stofdeeltjes.
- oraal (LD₅₀), bij voorkeur ratten. Voor andere stoffen dan gassen.
- dermaal (LD₅₀), bij voorkeur albino konijnen. Voor andere stoffen dan gassen.

28-dagen toxiciteitsonderzoek

- herhaalde toediening (5 à 7 dagen/week; voor dermaal en inhalatoir onderzoek 6 à 7 uur/dag) gedurende 4 weken.

Veelal zal met één toedieningsweg kunnen worden volstaan. De keuze van de toedieningsweg is afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van de stof, van de acute toxiciteit en van de omstandigheden waaronder de stof wordt geproduceerd of verwerkt. Voor oraal en inhalatoir onderzoek dienen bij voorkeur ratten, voor dermaal onderzoek bij voorkeur konijnen te worden gebruikt.

Irritatie/corrosiviteitsonderzoek

- huid, bij voorkeur albino konijnen.
- ogen, bij voorkeur albino konijnen.

Wanneer ernstige huidirritatie is vastgesteld bij lage concentraties, zal oogirritatie zeer waarschijnlijk optreden, zodat in een dergelijk geval oogirritatie-onderzoek niet behoeft te worden uitgevoerd.

Huidsensibilisatie-toets

- bij voorkeur caviae. Voor andere stoffen dan gassen.

Vruchtbaarheids/reproductie-onderzoek

- fertiliteits/reproductiescreeningstest, waarbij informatie wordt verkregen over paargedrag, vruchtbaarheid en reproductievermogen; bij voorkeur ratten; meest relevante toedieningsroute.

Mutageniteitsonderzoek/pre-screening op carcinogeniteit

- Een test voor de detectie van gen- of puntmutaties bij bacteriën. Hierbij dient getest te worden op de inductie van terugmutaties, eventueel daarnaast voorwaartse mutaties, in tenminste vier verschillende stammen, met en zonder metabole activering.
- twee testen voor de detectie van puntmutaties in een eukaryotisch systeem. In aanmerking komen:
 - (a) testen voor puntmutaties bij zoogdiercellen in vitro met en zonder metabole activering;
 - (b) de geslachtsgekoppelde recessief-letaal test met *Drosophila melanogaster*, en
 - (c) testen met *Saccharomyces cerevisiae* voor puntmutaties, met en zonder metabole activering.

Voor de genoemde testen geldt, dat tenminste van twee verschillende diersoorten de metaboliserende systemen uit de lever gebruikt moeten worden.

Toxicokinetisch onderzoek

- oriënterend stapelingsonderzoek bij ratten; meest passende toedieningsweg.

Verantwoording van de samenstelling

Acuut toxiciteitsonderzoek is nodig om een indruk te krijgen over het risico verbonden aan kortdurende blootstelling aan een bepaalde stof in de werksituatie. De mate van acute toxiciteit wordt vaak uitgedrukt in de LD₅₀ of, bij inhalatie-onderzoek, in de LC₅₀. Bij dit laatste onderzoek is vier uur een zeer gebruikelijke blootstellingsperiode. Om een indruk te krijgen over de aard van de intoxicatieverschijnselen bij de mens is het van betekenis deze te registreren bij de proefdieren; hierbij wordt gedacht aan gedrag, verschijnselen waaronder dieren doodgaan, groei, sectiebeeld en doodsoorzaak.

De 28-dagen toxiciteitsproef wordt op dit niveau essentieel geacht omdat hierdoor informatie worden verkregen over de aard en mate van toxiciteit van de stof na herhaalde expositie.

Het onderzoek naar mogelijk irriterende of sensibiliserende eigenschappen van een stof levert informatie op over het risico van respectievelijk beschadiging van huid of ogen en van het opbouwen van overgevoeligheid voor de stof. Speciaal dit soort onderzoek kan aanwijzingen geven in

hoeverre middelen ter bescherming van ogen en huid moeten worden aangewend in de werksituatie.

Op niveau 0 van Richtlijn 79/831/EEG ten behoeve van gevaarlijke stoffen wordt in het geheel geen fertiliteits/reproductie-onderzoek gevraagd en worden ten aanzien van de mutageniteit (inclusief de pre-screening voor carcinogeniteit) twee onderzoeken gevraagd waarvan één bacteriologische, met en zonder metabole activatie, en één niet bacteriologische. In de huidige richtlijnen wordt hiervan afgeweken en worden in het basispakket opgenomen een eenvoudige vruchtbaarheid/reproductieproef en een drietal mutageniteitstoetsen; met het laatste worden de aanbevelingen opgevolgd van de "Commissie ter beoordeling van de mutageniteit van chemische stoffen van de Gezondheidsraad. Deze relatief zware eisen demonstreren dat het van groot belang wordt geacht informatie te hebben, nog voordat een stof in productie wordt genomen of toegepast wordt, over mogelijke effecten op de vruchtbaarheid en het nageslacht van mensen in de werksituatie. De speciale aandacht voor dit type onderzoek houdt ook verband met het feit dat in de omschrijving van de Maximaal Aanvaarde Concentratie (MAC), de gezondheid van het nageslacht met name wordt genoemd. De expliciete vermelding van de gezondheidsbescherming van het nageslacht in de MAC-definitie is geschied op voorstel van de Nationale MAC-Commissie die hiermee het grote belang ervan heeft willen benadrukken.

Het drietal mutageniteitstesten kan tevens dienen als pre-screenings testen voor carcinogeniteit. Dit wil niet zeggen dat een positieve score in een pre-screeningstest een stof tot een kankerverwekkend agens maakt. Wel houdt een dergelijk resultaat een aanwijzing in voor mogelijk carcinogene activiteit. Het betekent ook dat bij positieve resultaten voortgezet onderzoek zal moeten worden uitgevoerd teneinde gegevens te verkrijgen die het mogelijk maken het gezondheidsrisico te schatten. Eventueel kan dit uitmonden in een carcinogeniteitsonderzoek.

In afwijking van de EG-richtlijn (79/831/EEG) is in de onderhavige richtlijnen reeds in het basispakket een oriënterend stapelingsonderzoek met ratten opgenomen. Dit is gedaan om in een zo vroeg mogelijk stadium van het toxiciteitsonderzoek te weten in hoeverre een stof en/of (een) metaboliet(en) wel of niet in het lichaam wordt opgehoopt. Of vervolgtoxiciteitsonderzoek nodig is, en zo ja, hoelang dit moet worden voortgezet, kan mede afhangen van de resultaten van stapelingsonderzoek.

Stapelingsonderzoek met ratten zal als regel met radioactief gemerkte verbindingen moeten worden uitgevoerd; in sommige gevallen zal het met niet-gemerkte verbindingen kunnen worden verricht. De mate van stapeling kan worden bepaald door meting van de halveringstijd van de stof of een toxische metaboliet in het bloed en/of door bepaling van deze verbindingen in een beperkt aantal organen, na eenmalige en herhaalde toediening van de stof. Indien radioactief gemerkte verbindingen beschikbaar zijn verdient het overweging de stapeling met behulp van totaal-lichaam autoradiografie te bepalen. Als het stapelingsonderzoek op problemen stuit, dient dit aan de Arbeidsinspectie te worden meegedeeld. Eventueel kan dan worden besloten door middel van een (sub)chronische proef na te gaan of de stof cumulatief toxisch werkt.

Aan deze alternatieve mogelijkheid ligt de volgende overweging ten grondslag. In het conventionele toxiciteitsonderzoek wordt onderzocht hoe een stof inwerkt op biologische toetssystemen (proefdieren; in vitro systemen); bij toxicokinetisch onderzoek wordt nagegaan wat biologische toetssystemen met een stof doen. Voor het conventionele onderzoek zijn standaardmethoden beschikbaar; volstaan kan worden met het meten of waarnemen van afwijkingen ten opzichte van controletoeetssystemen, die men al dan niet van toxicologische betekenis acht. Voor dit type onderzoek zijn richtlijnen te formuleren; de kosten en de voor het uitvoeren benodigde tijd zijn van te voren te schatten. Toxicokinetisch onderzoek zal niet altijd zonder meer uitvoerbaar zijn, bijv. omdat er geen voor het gestelde doel bruikbare radioactief gemerkte verbindingen beschikbaar zijn of omdat geschikte analyse- en identificatietechnieken ontbreken, sommige technieken zullen zelfs speciaal ontwikkeld moeten worden. Voor dit type onderzoek zijn daarom geen volledig uitgewerkte richtlijnen op te stellen en is het niet mogelijk voor alle gevallen van te voren een realistische tijd- en kostenraming te geven. Er zijn dus gevallen denkbaar waarin conventioneel toxiciteitsonderzoek doelmatiger is dan toxicokinetisch onderzoek om vast te stellen of de stof accumulatief werkt.

De samenstelling van niveau A is zodanig gekozen, dat op basis van de verkregen resultaten het in principe mogelijk moet zijn om tenminste een voorlopige MAC vast te stellen.

NIVEAU B

Samenstelling

Dit niveau omvat de volgende onderzoeken:

Subchronisch (90-dagen) toxiciteitsonderzoek

- bij orale of inhalatoire toediening hebben ratten de voorkeur; bij dermale toediening worden bij voorkeur konijnen gebruikt; meest relevante toedieningsweg

Aanvullend mutageniteitsonderzoek/pre-screening op carcinogeniteit

- testen gericht op het verkrijgen van gegevens over chromosoomafwijkingen in vivo zoals: metafase test
micronucleustest
SCE-test
- indirecte testen gericht op het verkrijgen van gegevens over het optreden van puntmutaties in zoogdieren: host-mediated assay
fosfor-triester-vorming
remming DNA-synthese

Aanvullend toxicokinetisch onderzoek

- bepaling van het retentie- en uitscheidingspatroon van de stof en zijn metabolieten als functie van de tijd, uit te voeren met ratten; meest relevante toedieningsweg. Karakteriseren van metabolieten.

Teratogeniteitsonderzoek

- bij voorkeur worden ratten gebruikt; meest relevante toedieningsweg.

Verantwoording van de samenstelling

In afwijking van de EG-richtlijn is in niveau B geen vruchtbaarheids-reproductie-onderzoek opgenomen. Dit type onderzoek werd ondergebracht in niveau A; de redenen hiervoor zijn aangegeven in de verantwoording van de samenstelling van niveau A.

De EG-richtlijn vermeldt op niveau 1 subchronisch en/of chronisch toxiciteitsonderzoek, terwijl op niveau B van de onderhavige richt-

lijnen alleen subchronisch onderzoek wordt gevraagd; chronisch onderzoek is ondergebracht in niveau C. Enerzijds komt dit de eenduidigheid van de richtlijnen ten goede, terwijl anderzijds zonder bezwaar via het lijnonderzoek chronisch toxiciteitsonderzoek kan worden gevraagd zonder dat het volledige programma van niveau C afgewerkt behoeft te worden.

Op dit niveau wordt een 90-dagen proef van groot belang geacht omdat dit type onderzoek gegevens verschaft over de gezondheidsrisico's verbonden aan herhaalde blootstelling aan een stof gedurende een periode die circa 10 % van de gemiddelde levensduur beslaat en waarin lichaamsgroei en geslachtsrijp worden belangrijke facetten zijn. Deze proef geeft vaak ook informatie over:

- (a) het doelwitorgaan van een stof
- (b) mogelijke gevolgen van eventuele accumulatie van een stof, en
- (c) effecten met een relatief lange latentietijd.

Een goed uitgevoerde 90-dagen proef levert een "no-toxic effect level" op die van betekenis is voor het kiezen van een dosesreeks voor een eventuele chronische proef, maar vooral ook voor het vaststellen van aanvaardbare blootstellingsniveaus.

Afgezien van de geplande gefaseerde uitvoering van het onderzoek zullen aanvullende mutageniteits- en verdere pre-screeningstesten voor carcinogeniteit tevens nodig zijn wanneer in het niveau A-onderzoek aanwijzingen zouden zijn verkregen voor effecten van een stof op het erfelijk celmateriaal. De testen genoemd onder niveau A geven echter slechts een indicatie; voor de fase van extrapolatie, waarin gepoogd wordt de betekenis van de mutagene eigenschappen voor de mens vast te stellen, zijn ze ontoereikend.

Op niveau B zijn testen ingevoerd die informatie moeten geven over chromosomafwijkingen veroorzaakt door toediening van de stof in vivo. Echter een negatief resultaat hoeft niet te betekenen dat er geen puntmutaties zijn opgetreden. Behalve de nauwelijks praktisch uitvoerbare specifieke locus test zijn er geen geëvalueerde testen voor het aantonen van puntmutaties in vivo.

Daarom wordt voorgesteld gebruik te maken van een aantal indirecte testen.

In de EG-richtlijn (79/831/EEG) wordt op niveau 1, evenals op niveau 0, geen toxicokinetisch onderzoek gevraagd. Op niveau B van de huidige richtlijnen worden gegevens gevraagd over de retentie- en uitscheidingskinetiek van een stof bij ratten, en dienen de metaboliëten te worden geïdentificeerd of althans gekarakteriseerd (polairder dan de uitgangsstof, conjugaten van de uitgangsstof of conjugaten van de biotransformatieprodukten van de uitgangsstof). Juist omdat uit deze gegevens mogelijk een verband tussen het toxisch effect en het metabolisme van de stof kan worden afgeleid, is dit onderdeel van het toxicokinetisch onderzoek ondergebracht in hetzelfde niveau als waarin de subchronische proef is geplaatst; deze laatste geeft immers een diepgaand inzicht in de aard en mate van de toxische werking van een stof.

Een volledig embryotoxiciteits/teratogeniteitsonderzoek met één diersoort wordt noodzakelijk geacht om na te gaan in hoeverre de gezondheid van ongeborenen zou kunnen worden geschaad tijdens de blootstelling van zwangeren aan een bepaalde stof op de werkplek. De rat is voor dit type onderzoek een veelgebruikte proefdiersoort en verdient hier bovendien de voorkeur omdat het bij het interpreteren van de onderzoekresultaten een voordeel kan zijn wanneer deze verkregen zijn bij de diersoort die ook werd gebruikt bij het vruchtbaarheidsonderzoek op niveau A.

NIVEAU C

Samenstelling

In dit pakket zijn de volgende onderzoeken opgenomen:

Chronisch toxiciteits/carcinogeniteitsonderzoek

- als diersoort wordt de rat aanbevolen; het kan gewenst zijn een stof tevens te onderzoeken met een tweede diersoort waarvoor de muis of hamster wordt aanbevolen; meest passende toedieningsroute.

Embryotoxiciteits/teratogeniteitsonderzoek met tweede diersoort

- bij voorkeur worden konijnen gebruikt; meest passende toedieningsroute.

Acuut en 28-dagen toxiciteitsonderzoek met tweede diersoort

- bij voorkeur worden hamsters of muizen gebruikt
- de opmerkingen, gemaakt met betrekking tot dit soort onderzoeken in het basispakket, zijn ook hier van toepassing.

Voortgezet toxicokinetisch onderzoek

- Aanvullend toxicokinetisch onderzoek, eventueel met een tweede diersoort; meest relevante toedieningsweg.
- Identificatie van metabolieten. Alleen uit te voeren als de resultaten van het toxicokinetisch onderzoek uitgevoerd op de niveaus A en B hiertoe aanleiding geven.

Verantwoording van de samenstelling

Op dit niveau van de toxicologische evaluatie wordt grote waarde gehecht aan gegevens over de toxiciteit van een stof bij proefdieren na langdurige en herhaalde blootstelling. Een dergelijke chronische proef dient informatie op te leveren over effecten met een lange latentietijd inclusief kanker. Voor dit type onderzoek wordt de rat verreweg het meest gebruikt; de muis wordt vaak gebruikt als tweede diersoort, terwijl de Syrische hamster terrein wint vooral waar het inhalatie-onderzoek betreft. Wat de uitvoering van chronisch onderzoek betreft zij nog opgemerkt dat een gecombineerde chronische toxiciteits/carcinogeniteitsproef de voorkeur verdient boven een aparte chronische toxiciteitsproef plus een aparte carcinogeniteitsproef. Een belangwekkend voordeel van een gecombineerde proef boven een aparte chronische toxiciteitsproef plus een afzonderlijke carcinogeniteitsproef is dat bij de gecombineerde proef toxiciteits- en carcinogeniteitsgegevens worden verzameld binnen één experiment en derhalve worden verkregen met hetzelfde monster van de te onderzoeken stof, bij dezelfde populatie dieren, hetzelfde voer en drinkwater en onder dezelfde omstandigheden van huisvesting en verzorging van de dieren. Hierdoor zal bij de gecombineerde proef de interpretatie van vooral de carcinogeniteitsgegevens, met name in geval van een positief resultaat, worden vergemakkelijkt. Verder zullen bij de gecombineerde proef veelal de eindresultaten sneller beschikbaar kunnen zijn en zullen ook de kosten lager zijn dan bij twee aparte experimenten. Anderzijds kan uit voorafgaand lijnonderzoek gebleken zijn dat volstaan kan worden hetzij met een chronisch toxiciteitsonderzoek, hetzij een specifiek carcinogeniteitsonderzoek. Vaak zullen dergelijke proeven beperkter van opzet kunnen zijn (b.v. kleiner aantal proefgroepen, minder dieren per groep(en), beperkter aantal parameters) dan gecombineerde proeven.

Embryotoxiciteits/teratogeniteitsonderzoek met een tweede diersoort, evenals acuut en 28-dagen toxiciteitsonderzoek met een tweede diersoort is in deze fase van de toxicologische beoordeling van een stof van belang omdat de gegevens uit deze proeven een indruk geven over de mogelijke verschillen in de aard en mate van toxiciteit tussen diersoorten. Deze gegevens zullen de basis voor extrapolatie van de diergegevens naar de mens verbreden.

Wat het toxicokinetisch onderzoek betreft gaat het er op niveau C vooral om, het inzicht in de moleculaire relatie toxisch effect/toxische stof te verdiepen. Als verschillende diersoorten verschillend op een stof reageren, is toxicokinetisch onderzoek met een tweede diersoort noodzakelijk om na te gaan of de verschillen het gevolg zijn van verschillen in metabolisme of van verschillen in retentie- en uitscheidingskinetiek. Indien dit onderzoek met radioactief gemerkte verbindingen en een diersoort groter dan de rat zou moeten worden uitgevoerd, kan dit op experimenteel-technische bezwaren stuiten. Dit geldt vooral als het om vluchtige of gasvormige stoffen gaat. In zulke gevallen moet in overleg met de Arbeidsinspectie naar alternatieven worden gezocht.

Mutageniteitsproeven zijn in dit niveau niet opgenomen. Verwacht wordt dat de gegevens verkregen door uitvoering van de mutageniteitsproeven genoemd in niveau B, tezamen met de andere verkregen toxiciteitsgegevens onder meer over vruchtbaarheid/reproductie, voldoende zijn voor de risico-schatting ten aanzien van schade voor het nageslacht.

In tegenstelling tot Richtlijn 79/831/EEG wordt in de huidige richtlijn vruchtbaarheidsonderzoek, waarbij blootstelling aan een stof over drie generaties wordt toegepast, niet opgenomen. Dergelijke multigeneratieproeven lijken weinig relevant omdat blootstelling aan eenzelfde stof op de werkplek over meerdere generaties vrijwel is uit te sluiten. Het wordt zinvoller geacht bij aanwijzingen voor teratogene activiteit of voor andere effecten op de fertiliteit, deze effecten meer diepgaand te bestuderen en meerdere diersoorten in het onderzoek te betrekken.

BIJLAGE 1

GLOBALE AANDUIDING VAN DE KOSTEN

(Prijspeil 1980)

Niveau A

Acuut toxiciteitsonderzoek

- Vier uren LC ₅₀	f. 6000,-
- LD ₅₀ , oraal	1200,-
- LD ₅₀ , dermaal	5000,-

28-dagen toxiciteitsonderzoek

- inhalatie-onderzoek	50.000,-
- oraal "	18.000,-
- dermaal "	20.000,-

Irritatie/corrosiviteitsonderzoek

- huid	900,-
- ogen	800,-

Huidsensibilisatie-toets

3.000,-

Vruchtbaarheids/reproductie-onderzoek

- inhalatoir	60.000,-
- oraal	25.000,-
- dermaal	?

Mutageniteitsonderzoek/pre-screening op carcinogeniteit

- bacterietest	2.000,- à 3.000,-
- zoogdiercellen in vitro	2.100,-
- Drosophila test	5.000,- à 10.000,-
- Saccharomyces	2.000,- à 3.000,-

Toxicokinetisch onderzoek

- synthese radioactief materiaal	f. 5.000,- à 50.000,-
- oriënterend stapelingsonderzoek	5.000,- à 10.000,-

Niveau B

Subchronisch (90-dagen) toxiciteitsonderzoek

- inhalatie-onderzoek	110.000,-
- oraal onderzoek	50.000,-
- dermaal onderzoek	80.000,-

Aanvullend mutageniteitsonderzoek/pre-screening op carcinogeniteit

- metafase test (in vitro)	f. 2.500,- à f. 10.000,-
- micronucleus test	12.000,-
- SCE-test	3.900,-
- host mediated assay	12.000,-
- fosfor-triestervorming	?
- remming DNA-synthese	2.500,- à 10.000,-

Aanvullend toxicokinetisch onderzoek

- retentie- en uitscheiding	25.000,-
- karakteriseren van metabolieten	3.000,-
- synthese radio-actief materiaal	5.000,- à 50.000,-
- ontwikkelen analysetechnieken	niet te taxeren

Embryotoxicieteits/teratogeniteitsonderzoek

- inhalatie-onderzoek	65.000,-
- oraal "	48.000,-
- dermaal "	70.000,-

Niveau C

Chronisch toxiciteits/carcinogeniteitsonderzoek

specifiek chronisch onderzoek	
- inhalatie	900.000,-
- oraal	600.000,-
- dermaal	?
specifiek carcinogeniteitsonderzoek	
- inhalatie	750.000,-
- oraal	550.000,-
- dermaal	?
chronische toxiciteit/carcinogeniteit	
- inhalatoir	800.000,- à 1.200.000,-
- oraal	710.000,-
- dermaal	?

Embryotoxicieteits/teratogeniteitsonderzoek met tweede diersoort

- inhalatie-onderzoek (konijn)	70.000,-
- oraal " "	50.000,-
- dermaal " "	75.000,-

Acuut en 28-dagen toxiciteitsonderzoek met tweede diersoort

Zie hiervoor deze rubrieken onder Niveau A.

Voortgezet toxicokinetisch onderzoek

- tweede diersoort	20.000,- à 40.000,-
- identificatie metabolieten	10.000,- à 100.000,-
- ontwikkeling analysetechnieken	niet te taxeren

TOTALEN

Niveau A	f.100.000,- à 150.000,-
Niveau B	180.000,- à 325.000,-
Niveau C	1.000.000,- à 1.500.000,-

Algemeen totaal :

f. 1.625.000,-
(f.1.280.000,- à f. 1.975.000,-)