

Trichlormethan

(CAS-NR.: 67-66-3)

Dieser Einstufungsvorschlag stützt sich im Wesentlichen auf die MAK-Begründung von 1999 (Greim 1999).

1. Mutagenität:

1.1 Untersuchungen in vitro

1.1.1 Bakterielle Genmutationstests

Sämtliche in der Literatur berichteten konventionellen Ames-Tests waren mit und ohne metabolische Aktivierung negativ (zusammengestellt in IPCS 1994, später: LeCurieux et al. 1995). Pegram et al. (1997) dokumentierten eine statistisch signifikante Verdopplung der Revertanzahl bei hohen Chloroformdosierungen (2,1 und 2,8 mM) in Glutathion-S-Transferase T1-1-transgenen Salmonellen; in diesem System hatte Bromdichlormethan eine ausgeprägte mutagene Wirkung. Dieser Befund erinnert an Untersuchungen von Thier et al. (1993) mit Dihalomethanen in Glutathiontransferase T1-1-transgenen Salmonellen, die Mutagenität in der Rangfolge Dibrommethan > Bromchlormethan > Dichlormethan ergaben.

Es liegen eine Reihe von Tests in anderen bakteriellen Systemen vor, die ebenfalls mit und ohne metabolische Aktivierung negativ waren (zusammengestellt in IPCS 1994, außerdem DeMarini et al. 1991, Kada 1981, LeCurieux et al. 1995). Lediglich ein Test mit *Photobacterium phosphoreum* war positiv (Wecher and Scher 1982).

1.1.2 Genmutationstests an Eukaryonten

Zahlreiche Untersuchungen erfolgten an *Saccharomyces cerevisiae* und anderen Pilzen (zusammengestellt in IPCS 1994). Die meisten ergaben ein negatives Resultat; eine Untersuchung an *Saccharomyces cerevisiae* D7 war mit einem Anstieg der Genkonversion am *trp5*- und am *ilv1*- Locus und der mitotischen Rekombination am *ade2*- Locus positiv bei Konzentrationen von 20-50 mM, die bereits eine zytotoxische Wirkung aufwiesen (Callen et al. 1980). Chloroform war positiv in einem weiteren Test auf Deletionen durch intrachromosomale Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae* (Brennan and Schiestl 1998).

Ein HPRT-Test in V79-Zellen verlief in zwei von drei Experimenten positiv (Hoechst AG 1987). Eine weitere Studie ohne metabolische Aktivierung erbrachte ein negatives Ergebnis; in dieser Arbeit wurde allerdings keine Positivkontrolle angegeben (Sturrock 1977).

Ein L5178Y TK +/- (Maus-Lymphom) -Test war in 2 Versuchen schwach positiv im zytotoxischen Bereich nach metabolischer Aktivierung ab Konzentrationen von 0,025 µl/ml entsprechend ca. 1 mM. (Mitchell et al. 1988). Ebenfalls schwach positiv im zytotoxischen Bereich war der Test in 3 Versuchen ab 0,012 µl/ml entsprechend ca. 0,5 mM (Myhr and Caspary 1988). Ohne metabolische Aktivierung verlief der Test negativ (Caspary et al. 1988, Mitchell et al. 1988).

1.1.3 Tests auf DNA-Bindung

Ein Versuch zur Bindung an Kalbsthymus-DNA nach Aktivierung durch Lebermikrosomen von Phenobarbital-behandelten Ratten verlief positiv (DiRenzo et al. 1982).

1.1.4 Tests auf DNA-Reparatur

Es liegen eine Reihe von Tests auf außerplanmäßige DNA-Reparatur (UDS) in der Literatur vor, die auch bei metabolischer Aktivierung negativ verliefen (zusammengestellt bei IPCS 1994, außerdem Suzuki 1987).

1.1.5 Tests auf DNA-Strangbrüche

In einem Alkalielutions-Assay in Rattenhepatozyten war Chloroform in nicht toxischen Konzentrationen bis 3 mM negativ; höhere Konzentrationen wurden nicht geprüft. (Sina et al. 1983).

1.1.6 Zytogenetische Tests

Humanlymphozyten wiesen in einer Studie mit Konzentrationen bis 400 µg/ml entsprechend ca. 3,3 mM keine Chromosomenaberration und SCEs auf (Kirkland et al. 1981). In einer Studie an Humanlymphozyten ohne und mit metabolischer Aktivierung durch Rattenhepatozyten rief Chloroform ebenfalls keine SCE's hervor (Lindahl-Kiessling et al. 1989). In einer anderen SCE-Studie an Humanlymphozyten war Chloroform ab 10 mM positiv mit einem Anstieg der SCEs pro Zelle um den Faktor 1,5-2 (Morimoto and Koizumi 1983). In K₃D-Zellen war der SCE-Test ebenfalls positiv; mit 1 mM Chloroform stieg die SCE-Rate bei metabolischer Aktivierung von 7,4 auf 10,0 SCEs an (Fujie et al. 1993). Ein SCE-Test in SHE-Zellen mit 0,1-10 mM Chloroform soll mit und ohne metabolische Aktivierung positiv ausgefallen sein (Suzuki 1987). In CHO-Zellen führte eine Begasung mit 7000 ml/m³ Chloroform nicht zum Anstieg von SCEs (White et al. 1979). Eine weitere Studie an CHO-Zellen führte ebenfalls nicht zum Anstieg von SCEs (Perry and Thompson 1981), während in einer dritten Studie über ein positives Ergebnis berichtet wurde (Athanasίου and Kyrtopoulos 1981).

1.1.7 Zelltransformationstests

Zwei Zelltransformations-Tests mit BHK-Zellen verliefen negativ (Daniel et al. 1980, Styles 1981). In SHE-Zellen war ein Test auf Verstärkung der Zelltransformation durch SA7 Adenovirus nach Begasung mit Chloroform mit Konzentrationen, die das Überleben der Zellen schon beeinträchtigten, positiv (Hatch et al. 1983).

1.2 Untersuchungen in vivo/ ex vivo

1.2.1 Genmutationstest

Ein Genmutationstest in der Leber von lacI-transgenen (Big Blue) Mäusen war auch nach Inhalation einer hepatotoxischen Dosis von 90 ppm Chloroform an 6 Stunden/Tag über 10-180 Tage negativ (Butterworth et al. 1998).

Zwei sex-linked recessive lethal-Tests (Gocke et al. 1981, Vogel et al. 1981) und ein Augenmosaiktest (Vogel and Nivard 1993) an *Drosophila melanogaster* verliefen negativ.

Ein host-mediated assay an der Maus wird als schwach positiv beschrieben (San Agustin and Lim-Sylianco 1978).

1.2.2 Tests auf DNA-Bindung

Zur DNA-Bindung in vivo liegen zwei Untersuchungen vor. In der einen werden für Maus und Ratte Negativbefunde berichtet (Diaz-Gomez and Castro 1980), in der anderen waren die Befunde in Leber und Niere der Ratte nach Gabe von 48 mg/kg p.o. schwach positiv, jedoch negativ bei der Maus (Pereira et al. 1982).

1.2.3 Tests auf DNA-Reparatur

Negativ verliefen zwei Untersuchungen zur DNA-Reparatursynthese (UDS) in Rattenhepatozyten ex vivo nach Behandlung der Tiere mit Chloroform in Dosierungen bis zu 400 mg/kg p.o (Mirsalis et al. 1982) bzw. 477 mg/kg p.o. (Larson et al. 1994). Diese Dosen sind hepatotoxisch.

1.2.4 Tests auf DNA-Strangbrüche

Ein Alkalielutionstest in der Niere nach Behandlung mit bis zu 1.5 mmol/kg entsprechend ca. 180 mg/kg Chloroform p.o verlief negativ; diese Dosierung hatte keinen Einfluss auf Körpergewicht und Nierengewicht (Potter et al. 1996).

1.2.5 Zytogenetische Tests

Ein In-vivo-Chromosomenaberrationstest mit Chinesischen Hamstern führte zu einem negativen Ergebnis (Hoechst 1988). Bei diesem Knochenmarkstest mit je 5 Männchen und Weibchen pro Gruppe wurden Dosierungen von 40, 120 bzw. 400 mg/kg einmalig per Schlundsonde verabreicht. Die höchste Dosierung induzierte toxische Zeichen; lokale zytotoxische Effekte im Knochenmark traten nicht auf (Hemmung der mitotischen Aktivität); in einem Vortest wurden nach Gabe von 500 mg/kg letale Effekte beobachtet. Die Präparationszeitpunkte lagen bei 6 h, 24 h und 48 h nach Behandlung. Vereinzelt wurden so genannte "heavily damaged cells" gefunden, insbesondere nach Gabe der höchsten Dosierung: jeweils 1 "exchange" (d.h. Austauschaberration, die nicht weiter differenziert wurde) in 3 der 4 behandelten Tiergruppen bei jeweils 1000 ausgewerteten Zellen und jeweils 1 Zelle mit einer nicht näher definierten "multiplen Aberration" in 2 der 4 behandelten Tiergruppen. Die Autoren diskutieren dies kritisch, ohne das Ergebnis als positiv zu bewerten. Angesichts der vagen Beschreibung der so genannten "heavily damaged cells" und insbesondere der sehr niedrigen Ereignisraten kann kein Verdacht auf eine mutagene Wirkung abgeleitet werden.

In Knochenmarkszellen der Ratte war der Befund positiv nach Einmalgabe von 1 mmol/kg entsprechend etwa 120 mg/kg KG i.p. oder p.o. (Fujie et al. 1990). Angaben zur Toxizität wurden nicht gemacht. Bei der Maus war ein Chromosomenaberrationstest nach s.c.-Gabe von 100 und 200 mg/kg positiv (Sharma and Anand 1984), während eine andere Arbeit nach Gabe von bis zu 1000 mg/kg KG i. p. keine Chromosomenaberrationen fand (Shelby and Witt 1995). Ein Test auf Chromosomenaberrationen in *Allium cepa* war positiv (Cortés et al. 1985)

Ein SCE-Test in Knochenmarkszellen der Maus war mit einem Anstieg von 6 auf 9 SCEs/Zelle bei 4 x 200 mg/kg p.o. positiv. Angaben zur Toxizität fehlen. Ein weiterer SCE-Test bei der Maus war nach Inhalation von 300 ml/m³ über 3 und 6 Stunden positiv (Iijima et al. 1982).

Im Mikrokern-Test am Knochenmark der Maus war Chloroform in zwei Untersuchungen selbst in hoher Dosierung von 952 mg/kg KG i. p. (Gocke et al. 1981) oder 2 x 80 % der LD₅₀ i. p. (Salamone et al. 1981) negativ, es fehlte jedoch ein Beweis dafür, dass das Knochenmark erreicht worden war. Ein weiterer negativer Mikrokerntest an der Maus wurde mit 2 x 0,015– 0,06 ml/kg i.p. durchgeführt (Tsuchimoto and Matter 1981). Für einen Mikrokern -Test an der Maus ohne Angabe zum Applikationsweg wird ein positiver Befund bei 700 mg/kg KG berichtet (San Agustin and Lim-Sylianco 1978). In einer weiteren Studie war der Befund schwach positiv bei Dosierungen von bis zu 800 mg/kg i.p. (Shelby and Witt 1995). Ein Mikrokerntest an der Niere der Sprague-Dawley-Ratte war positiv bei Einmalgabe von 4 mmol/kg entsprechend ca. 480 mg/kg p. o. (Robbiano et al. 1998). Es fehlen Angaben zur Toxizität; die Literatur für die F344-Ratte ergibt, dass Tubulusschäden schon bei Einmalgabe von 34 mg/kg auftraten. Bei 477 mg/kg wurden ausgedehnte Nekrosen in der Niere beobachtet (Larson et al. 1993). In einer anderen Studie wurden allerdings nach Gabe von 477 mg/kg bei der F344-Ratte und 180 mg/kg bei der Osborne-Mendel-Ratte nur leichte Vakuolisierungen der Epithelzellen im proximalen Tubulus beobachtet (Templin et al. 1996). Ein Mikrokerntest am Wassermolch war negativ (LeCurieux et al. 1995).

Es liegen zwei Tests auf morphologische Abnormitäten in Maussperma vor, von denen ein mit einer inhalativen Applikation durchgeführter bei Dosierungen von 400 bzw. 800 ml/m³, je 4 Stunden/Tag über 5 Tage positiv verlief (Land et al. 1981). Das entspricht bei Zugrundelegung eines Atemzeitvolumens von 1,8 l/h/Maus einer Dosierung von 720 bzw. 1440 mg/kg Körpergewicht. Diese Dosis war nicht narkotisch; bei der höheren Dosis überlebten 9 von 10 Tieren. Negativ fiel der Maussperma-Abnormitätstest bei einer i. p. Applikation über 5 Tage aus, wobei Dosierungen von 0,025-0,25 ml/kg (entsprechend 37,5 – 374 mg/kg/Tag) angegeben werden (Topham 1980).

2. Kanzerogenität:

2.1 Epidemiologische Studien

Mehrere Studien untersuchen die Beziehung zwischen Tumorfrequenz und Trinkwasserchlorierung. Eine Metaanalyse von 1992 (Morris et al.) kommt zu dem Schluss, dass die Ergebnisse eine Assoziation zwischen der Aufnahme von Nebenprodukten der Chlorierung und dem Auftreten von Blasen- und Mastdarmkrebs nahe legen. Ein Bezug zur Chloroformexposition kann aus den Daten nicht abgelesen werden. Eine neuere prospektive Kohortenstudie an fast 30 000 Frauen im US-Bundesstaat Iowa versucht durch chemische Analyse der von den Studienteilnehmerinnen erfragten Trinkwasserquellen einen Bezug zur Exposition gegenüber einzelnen Trihalomethanen herzustellen. Dabei ergibt sich eine Assoziation zwischen Chloroformexposition und Dickdarmkrebs, Lungenkrebs, Melanomen und allen Krebsformen kombiniert (Doyle et al. 1997). Die IARC (1999) stuft die epidemiologischen Daten als „inadequate evidence for carcinogenicity“ ein.

2.2 Tierversuche

Tumorigene Wirkungen von Chloroform wurden bei Ratte und Maus nachgewiesen. Allerdings sind die Befunde in den drei bewertungsrelevanten Kanzerogenitätsstudien NCI 1976; Jorgensen et al. 1985, Nagano et al. 1998) uneinheitlich. Relativ konsistent werden als Zielgewebe der tumorigenen Wirkung Niere und Leber angegeben.

2.2.1 Niere

Bei der männlichen Ratte traten Nierentumoren in der Schlundsonden-Studie des NCI von 1976 (Tab.1) und in der Trinkwasserstudie von Jorgensen et al. 1985 (Tab.2) auf, nicht aber in der Inhalationsstudie von Nagano 1998 (Tab.3). Bei der Maus wurden in der Schlundsondenstudie des NCI (1976) und der Trinkwasserstudie von Jorgensen et al. (1985) keine Nierentumoren gefunden, in der Inhalationsstudie von Nagano (1998) war dagegen die Zahl der Nierentumoren bei der männlichen Maus erhöht. Für die beiden Positivbefunde bei der Ratte ist angenommen worden, dass die Nierentumoren in Zusammenhang mit chronischer Nierenentzündung (Ree-

valuierung der NCI-Studie durch Reuber 1979) bzw. chronischem Tubulusschaden (Reevaluierung der Studie von Jorgensen et al 1985 durch Hard et al. 2000) aufgetreten waren. Auch in der Inhalationsstudie bei der Maus war in den beiden höchsten Dosisgruppen Nephrotoxizität beobachtet worden. In dieser Studie musste initial die Chloroformdosis stufenweise gesteigert werden, um die Tiere an die z.T. letalen nephrotoxischen Dosen zu adaptieren.

2.2.2 Leber

Während in der NCI-Studie (1976) mit Schlundsondenapplikation bei der männlichen und der weiblichen B6C3F1-Maus eine sehr deutliche tumorigene Wirkung von Chloroform auf die Leber dokumentiert wurde, fehlt eine solche bei der weiblichen Maus (männliche Tiere wurden nicht untersucht) des gleichen Stammes und vergleichbarer Dosierung in der Trinkwasserstudie von Jorgensen et al. (1985). Larson et al (1994) verabreichten die in beiden Studien applizierten Dosen jeweils über Schlundsonde oder Trinkwasser über 3 Wochen an B6C3F1-Mäuse und fanden nur bei Schlundsondenapplikation Hepatotoxizität, möglicherweise aufgrund einer unterschiedlichen Zeitkinetik bei beiden Applikationsformen. In der Inhalationsstudie (Nagano 1998) zeigen nur die weiblichen Tiere des BDF1-Stammes eine Tendenz zum vermehrten Auftreten von Leberadenomen und –karzinomen. Bei der Ratte wurden in allen drei Studien zwar keine hepatozellulären Adenome oder Karzinome gefunden, doch fiel bei der Reevaluation der NCI-Studie durch Reuber (1979) auf, dass vermehrt hyperplastische Knoten in der Leber weiblicher und männlicher Ratten vorhanden waren. In einer Trinkwasserstudie mit nur einer Chloroformdosierung (Tumasonis et al. 1985) fanden sich ebenfalls hyperplastische Knoten in der Rattenleber.

2.2.3 Andere Tumorlokalisationen

Nur in der NCI-Studie (1976) wurden vermehrt Schilddrüsenadenome und –karzinome bei der weiblichen Ratte gefunden. Bei der Reevaluation durch Reuber (1979) wurde dies bestätigt. In den Studien von Jorgenson et al. (1985) und von Nagano (1998) war die Zahl der Schilddrüsentumoren bei Ratten nicht erhöht. Bei der Reevaluation der NCI-Studie (Reuber 1979) wurden vermehrt Cholangiofibrome und –karzinome bei weiblichen Ratten und Lymphome bei weiblichen und männlichen Mäusen gesehen. In der Trinkwasserstudie (Jorgensen et al. 1985) war die Zahl der Lymphome/Leukämien bei der männlichen Ratte (weibliche Tiere wurden nicht untersucht) in der niedrigsten und der höchsten Dosisgruppe erhöht; eine Dosisabhängigkeit fehlte. Ebenfalls in dieser Studie fielen Tumoren des Herz-Kreislauf-Systems bei der Ratte auf. In einer Schlundsondenstudie mit Sprague-Dawley-Ratten, in der nur eine Dosierung eingesetzt wurde, fanden sich vermehrt Mammatumoren (Palmer et al. 1979).

2.2.4 Korrelation mit Nephro- und Hepatotoxizität

In der Literatur wird mehrheitlich die Meinung vertreten, dass die Nieren- und Lebertumoren auf dem Boden einer cytotoxischen Wirkung und nachfolgenden Zellproliferation zustande kommen. Weiter oben wurde schon auf die Korrelationen verwiesen, auf die diese Schlussfolgerung sich stützt: Zusammen mit den Positivbefunden zu Nierentumoren bei der männlichen Ratte (NCI 1976, Jorgensen et al. 1985) und der männlichen Maus (Nagano et al. 1998) wurde Nephrotoxizität, zusammen mit dem Positivbefund zu Lebertumoren bei der Maus (NCI 1976) wurde Hepatotoxizität festgestellt. Es wird in der Literatur darauf hingewiesen, dass das Umgekehrte nicht gilt (Melnick et al. 1998): So fanden sich keine Tumoren in der Niere von F344-Ratten nach Inhalation (Nagano et al. 1998) sowie in der Niere von weiblichen Osborne-Mendel-Ratten und in der Niere von B6C3F1-Mäusen (NCI 1976), obwohl sich in diesen Geweben durch entsprechende Behandlung mit Chloroform ein Anstieg von Proliferationsparametern auslösen lässt (Templin et al. 1996, Larson et al. 1994b, 1995a, 1995b). In der Niere von B6C3F1-Mäusen sind nach Einmalgabe von Chloroform die Regenerationsprozesse ausgeprägter und langandauernder als in der Leber; dennoch findet man in diesen Tieren nur Lebertumoren, aber keine Nierentumoren (Gemma et al. 1996). Der Grund dafür könnte in der Inaktivierung fremdstoffmetabolisierender Enzyme in der Niere nach Einmalapplikation (Rossi et al. 1999) liegen, die eine metabolische Aktivierung des Chloroforms bei wiederholter Gabe nicht zulässt und so trotz deutlicher Nephrotoxizität die Entwicklung von Nierentumoren verhindert.

Tabelle 1 Kanzerogenitätsstudie NCI 1976 (*kursiv: Reevaluierung Reuber 1976*)

Ratte: Osborne-Mendel, m 90 und 180 mg/kg, w 100 und 200 mg/kg

Maus: B6C3F1, m 138 und 277 mg/kg, w 238 und 477 mg/kg

Schlundsonde, Vehikel Maisöl, 78 w – 5 d/w,

Nachbeobachtung Ratte bis 111. Woche, Maus bis 93. Woche

Aufgeführt sind nur Gewebe mit erhöhter Krebshäufigkeit

Ratte		Unbehandelte Kontrolle	Vehikelkontrolle (Maisöl)	niedrige Dosis	hohe Dosis
Niere					
Adenome + Adenomkarzinome	m	0/19	-	6/50	13/50
	w	0/20	-	1/49	2/48
Schilddrüse					
Adenome + Karzinome	m	1/9	-	8/49	10/46
<i>Adenome</i>	m	1/20	0/20	8/39	7/39
<i>Karzinome</i>	m	2/20	1/20	3/39	5/39
Adenome + Karzinome	w	1/19	-	8/49	10/46
<i>Adenome</i>	w	1/20	0/20	8/39	7/39
<i>Karzinome</i>	w	2/20	1/20	3/39	5/39
Gallengänge					
<i>Cholangiofibrome</i>	w	0/20	0/20	1/39	3/39
<i>Cholangiokarzinome</i>	w	0/20	0/20	2/39	8/39
Leber					
<i>hyperplastische Knoten</i>	m	0/20	2/20	5/50	8/49
		1/20	-	7/39	12/39
<i>hepatozelluläre Karzinome</i>	w	0/20	0/20	0/50	2/49
		0/20	-	2/39	2/39
Maus					
Leber					
Tumoren	m	2/18	-	19/50	44/45
	w	0/20	-	37/45	39/41
<i>Lymphome</i>	m	0/17	0/17	14/46	10/46
	w	0/20	0/19	9/45	4/40

Tabelle 2 Kanzerogenitätsstudie Jorgenson et al. 1985

Ratte: Osborne-Mendel, m 19, 38, 81 und 160 mg/kg

Maus: B6C3F1, w 34,65,130 und 263 mg/kg

Trinkwasser, 104 w

Aufgeführt sind nur Gewebe mit erhöhter Krebshäufigkeit

Ratte m	Kontrolle 1	Kontrolle 2*	19 mg/kg	38 mg/kg	81 mg/kg	160 mg/kg
Niere						
Nierentumoren	5/301	1/50	6/316	7/148	3/48	7/50*
Tubuluszelladenome	4/301	1/50	2/313	3/148	2/48	5/50*
Tubuluszelladenome und -adenokarzinome	4/301	1/50	4/313	4/148	3/48	7/50*
Lymphome, Leukämien	5/303	1/50	19/316*	5/148	2/48	3/50*
Herz-Kreislauftumoren	5/303	0/50	6/316	3/148	3/48*	3/50*
Maus w						
Leber	Kontrolle 1	Kontrolle 2*	34 mg/kg	65 mg/kg	130 mg/kg	263 mg/kg
hepatozelluläre Adenome	19/415	0/47	8/142	8/142	0/47	0/44
hepatozelluläre Karzinome	2/415	0/47	7/142	1/142	0/47	1/44

*Trinkwasseraufnahme angepasst an die der höchsten Dosisgruppe

Tabelle 3 Kanzerogenitätsstudie Nagano et al. 1998Ratte: F344, 0,10,30, 90 ml/m³Maus: BDF₁, 0, 5, 30, 90 ml/m³

Inhalation 104 w, 5d/w, 6h/d

Ratte: keine Tumoren

Maus	0 ml/m ³	5 ml/m ³	30 ml/m ³	90 ml/m ³
Niere				
Adenome + Karzinome	m 0/50	1/50	7/50*	12/48*
Leber				
Adenome + Karzinome	m 14/50	7/50	12/50	17/48
	w 2/50	2/49	4/50	6/48

3. Reproduktionstoxizität:

3.1 Fertilitätsminderung

In einer Mehrgenerationenstudie an der Maus (Borzelleca and Campbell 1982) finden sich Hinweise auf eine fertilitätsmindernde Wirkung von Chloroform. In dieser Studie erhielten 7 Wochen alte ICR Swiss-Mäuse 0, 0,1, 1 und 5 mg/ml Trinkwasser über 14 Wochen. In der höchsten Dosisgruppe trat bei Männchen und Weibchen der F0- und der F1-Generation eine Verzögerung der Körpergewichtsentwicklung auf. Lebervergrößerung und Lebertoxizität wurde dosisabhängig bei allen behandelten Tieren festgestellt. In der F1- und in der F2-Generation waren der Paarungsindex und der Gestationsindex bei der höchsten Dosisgruppe vermindert. Die Zahl der Jungtiere pro Wurf war in diesen Gruppen ebenfalls vermindert. Die Effekte traten in Anwesenheit starker maternaler Toxizität auf.

3.2 Fruchtschädigung

Epidemiologische Studien

Ein Review aus dem Jahr 2001 (Graves et al. 2001) fasst die Ergebnisse von 13 epidemiologischen Studien zu reproduktionstoxischen Wirkungen von Nebenprodukten der Trinkwasserdesinfektion zusammen. In vier dieser Studien wurde die Exposition gegenüber einzelnen Trihalomethanen mittels der lokalen Wasserqualitätsdaten erfasst (Kramer et al. 1992, Waller et al. 1998, Klotz and Pyrch 1999, King et al. 2000). Dabei ergab sich eine erhöhte Odds Ratio für intrauterine Wachstumsverzögerung (1,8) bei Chloroformkonzentrationen $>10 \mu\text{g/l}$ vs. $< 1 \mu\text{g/l}$ (Kramer et al. 1992) und für Totgeburten insgesamt (1,56) und Totgeburten mit Asphyxie (3,15) bei Chloroformkonzentrationen $> 100 \mu\text{g/l}$ vs $< 50 \text{mg/l}$ (King et al. 2000). Wegen Unsicherheiten der Expositionsermittlung reichen die Daten für eine Einstufung nicht aus.

3.2.2 Tierversuche

Es existieren 7 auswertbare Studien zur fruchtschädigenden Wirkung, 4 bei der Ratte, davon 2 Inhalationsstudien, 2 an der Maus, davon 1 Inhalationsstudie, und 1 orale Studie beim Kaninchen.

3.2.2.1 Ratte

3.2.2.1.1 Schwetz et al. (1974)

Schwetz et al. (1974) verabreichten 0, 147, 490 und 1470mg/m^3 (= 0, 30, 100 und 300 ppm) über 7h/d von Tag 6 bis Tag 15 der Trächtigkeit an Sprague-Dawley Ratten (20-30 Tiere die den verlangsamten Verlauf der Körpergewichtsentwicklung bei den Dosisgruppen nachahmen sollte, mitgeführt. Die Chloroformkonzentration in der

Begasungskammer wurde 3 Mal täglich überprüft. Die Auswertung erfolgte an Tag 21 der Trächtigkeit.

Maternale Toxizität: In der höchsten Dosisgruppe betrug die Verringerung der Gewichtszunahme an Tag 13 (21) 38% (38%), in der mittleren Dosisgruppe 12% (6%), in der niedrigsten Dosisgruppe an Tag 13 (21) 10%. In der Kontrollgruppe mit verminderter Futterzufuhr betrug die Verringerung an Tag 13 (21) 28% (16%). In der höchsten Dosisgruppe war das absolute Lebergewicht vermindert, das relative Lebergewicht erhöht; in der mittleren Dosisgruppe waren relatives und absolutes Lebergewicht erhöht. In keiner Gruppe wurde ein Anstieg der SGPT im Serum gefunden.

Befunde bei den Nachkommen: In der höchsten Dosisgruppe war der Prozentsatz an Trächtigkeiten und die Zahl der lebenden Föten pro Wurf deutlich vermindert, der Prozentsatz der Resorptionen und der Würfe mit Resorptionen deutlich erhöht. Geburtsgewicht und Länge der Föten war deutlich vermindert. Für eine Auswertung eventueller teratogener Effekte war die Zahl der Würfe nicht ausreichend (nur 3 Würfe). In der mittleren Dosisgruppe waren keine statistisch signifikanten embryo- und fetotoxischen Effekte vorhanden; dagegen wurden teratogene Effekte in Form einer Akaudie bzw. einer Verkürzung des Schwanzes und eines Anus imperforatus sowie fehlende Rippen in 3 von 23 (Kontrolle 0/68) Würfen und Ossifikationsverzögerungen und subkutane Ödeme in statistisch signifikanter Häufung gefunden. In der niedrigsten Dosisgruppe fand sich ein geringfügig verringertes Geburtsgewicht sowie Ossifikationsverzögerungen der Schädelknochen und Rippenhöcker in statistisch signifikanter Häufung. In der Kontrollgruppe mit verminderter Futteraufnahme waren Gewicht und Länge der Föten verringert, jedoch traten keine teratogenen Effekte und keine morphologischen Entwicklungsstörungen auf.

3.2.2.1.2 Hoechst 1990

In einer weiteren Inhalationsstudie mit den gleichen Chloroformdosierungen (Hoechst 1990, zitiert nach MAK 1999) wurden die in der Studie von Schwetz et al. (1974) gefundenen teratogenen Wirkungen nicht reproduziert. In dieser Studie wurden Wistar-Ratten (20 Tiere/ Gruppe) 6h/d von Tag 7 bis Tag 16 der Trächtigkeit exponiert.

Maternale Toxizität: Es wird über eine dosisabhängige Abnahme von Körpergewichtsentwicklung und Futteraufnahme berichtet. Der Tod aller Fruchtanlagen wurde in der höchsten Dosisgruppe bei 8 Tieren, in der mittleren Dosisgruppe bei 3 Tieren und in der niedrigsten Dosisgruppe bei 2 Tieren gefunden. In der Kontrollgruppe trat dieser Effekt nicht auf.

Befunde bei den Nachkommen: In allen Dosisgruppen waren Gewicht und Länge der Föten vermindert.

Eine gleich aufgebaute Studie mit um eine Größenordnung verringerten Dosierungen zeigte eine verlangsamte Körpergewichtsentwicklung der Muttertiere ab 10 ppm und Gewichts- und Längenverminderung sowie Ossifikationsverzögerungen bei den Föten ab 30 ppm.

3.2.2.1.3 Thompson et al. (1974)

Thompson et al. (1974) verabreichten per Schlundsonde 0, 20, 50 oder 126 mg Chloroform/kg Körpergewicht in Maisöl an Wistar-Ratten (25 Tiere pro Gruppe) von Tag 6 bis Tag 15 der Trächtigkeit. Die Auswertung erfolgte an Tag 20.

Maternale Toxizität: In der höchsten Dosisgruppe zeigten die Tiere Haarausfall und rauhes Fell; sie waren in der Körpergewichtsentwicklung gegenüber der Kontrollgruppe verlangsamt (keine quantitativen Daten). 2 von 2 ausgewählten Testtieren wiesen eine Fettleber auf. Auch in der mittleren Dosisgruppe kam es zu einer Verzögerung der Körpergewichtsentwicklung; 1 von 2 Testtieren hatte eine Fettleber.

Befunde bei den Nachkommen: Nur in der höchsten Dosisgruppe, d.h. bei deutlicher maternaler Toxizität, wurden verringertes Geburtsgewicht und akzessorische Rippen beobachtet.

3.2.2.1.4 Ruddick et al. (1983)

Ruddick et al. (1983) verabreichten Sprague-Dawley-Ratten (15 Tiere pro Gruppe) von Tag 6 bis Tag 15 der Trächtigkeit 0, 100, 200 und 400 mg Chloroform/kg Körpergewicht in Maisöl per Schlundsonde.

Maternale Toxizität: Die Verringerung der Körpergewichtszunahme bei den Muttertieren betrug in der höchsten Dosisgruppe 58%, in der mittleren Dosisgruppe 45% und in der niedrigsten Dosisgruppe 32 %. Das Lebergewicht war in allen Dosisgruppen erhöht, in der höchsten Dosisgruppe auch das Nierengewicht.

Befunde bei den Nachkommen: Bei den Feten wurde nur in der höchsten Dosisgruppe eine Abnahme des Geburtsgewichts sowie skelettale Entwicklungsverzögerungen gesehen.

3.2.2.2 Maus

3.2.2.2.1 Murray et al. (1979)

Aus der gleichen Arbeitsgruppe, aus der die Untersuchungen von Schwetz et al. (1974; s.o.) stammen, publizierten Murray et al. 1979 eine Inhalationsstudie mit Chloroform an der CD-1-Maus (keine Angaben zur Zahl der Tiere pro Gruppe). Die verwendete Chloroformdosierung war 100 ppm; die Konzentration im Beatmungsgefäß wurde regelmäßig überprüft. Die Exposition (7h/d) erfolgte entweder von Tag 1 bis Tag 7 oder von Tag 6 bis Tag 15 oder von Tag 8 bis Tag 15 der Trächtigkeit. Die Auswertung erfolgte an Tag 18 der Trächtigkeit.

Maternale Toxizität: In allen Chloroformgruppen war die Körpergewichtsentwicklung gegenüber der Kontrolle verlangsamt (keine quantitative Angabe). Bei den Behandlungsschemata Tag 6-15 und Tag 8-15 war das absolute und das relative Lebergewicht der Muttertiere erhöht. In einer parallel mitgeführten Gruppe stieg nach Behandlung an Tag 6-15 die SGPT der schwangeren chloroformbehandelten Tiere von 38 auf 140 Karmen units an.

Befunde bei den Nachkommen: Die Prozentsatz der Trächtigkeiten war bei den Gruppen Tag 1-7 und Tag 6-15 vermindert, bei der Gruppe Tag 1-7 war auch die Zahl der Resorptionen pro Wurf erhöht. Bei den Gruppe Tag 1-7 und Tag 8-15 waren Gewicht und Länge der Feten vermindert, in allen Gruppen wurden Ossifikationsverzögerungen gefunden. In der Gruppe Tag 8-15 wurden Gaumenspalten gefunden (10 Tiere in 4 Würfen vs. 1 Tier). Von den 10 missgebildeten Feten stammten 6 aus einem Wurf mit sehr niedrigem Geburtsgewicht (0,39 g vs. 0,82 g in der gesamten von Tag 8 bis Tag 15 behandelten Gruppe).

3.2.2.2 Borzelleca and Carchman (1982)

Borzelleca and Carchman (1982, zitiert nach IPCS 1994) führten eine Multigenerationsstudie bei der ICR-Maus (10 männliche, 30 weibliche Tiere pro Gruppe) mit Verabreichung über das Trinkwasser in Konzentrationen von 0, 0,1, 1 und 5 mg Chloroform/ml Trinkwasser (=0, 20, 200 und 1000 mg/kg Körpergewicht) durch. Die Exposition begann 5 Wochen vor der Verpaarung und wurde bis zur Tötung der F_{2b}-Nachkommen fortgeführt.

Maternale Toxizität: In den höchsten Dosisgruppen war die Mortalität erhöht und die Körpergewichtsentwicklung verlangsamt. In der mittleren Dosisgruppe war bei weiblichen Tieren der F₁-Generation die Körpergewichtsentwicklung verlangsamt. In der F₀- und F₁-Generation kam es zu Verfärbung und Knötchenbildung auf der Leber.

Befunde bei den Nachkommen: In den höchsten Dosisgruppen, also bei maternaler Toxizität, traten bei den Tieren der F₁- und der F₂-Generation eine Abnahme der Fertilität, der Wurfgröße sowie der Gestations- und Lebensfähigkeitsindices auf.

3.2.2.3 Kaninchen

3.2.2.3.1 Thompson et al. (1974)

Thompson et al. (1974) behandelten Dutch-Belted Kaninchen (15 Tiere pro Gruppe) von Tag 6 bis Tag 18 der Trächtigkeit per Schlundsonde mit Chloroform in Maisöl in den Dosierungen 0, 20, 35 oder 50 mg/kg Körpergewicht. Die Auswertung erfolgte an Tag 29.

Maternale Toxizität: In der höchsten Dosisgruppe war die Körpergewichtsentwicklung verzögert; 4 Tiere verstarben an Hepatotoxizität.

Befunde bei den Nachkommen: Bei 50 mg/kg (maternale Toxizität) und 20 mg/kg (keine maternale Toxizität) war das Geburtsgewicht der Feten verringert. Bei 20 mg/kg und 35 mg/kg (keine maternale Toxizität) wurden Ossifikationsverzögerungen beobachtet.

4. Fazit:

4.1 Mutagenität

Es liegen Positivbefunde aus einer Reihe von in vivo-Tests vor; die Keimzellen werden erreicht. Die Positivbefunde traten bei hohen Dosierungen auf und waren nur schwach ausgeprägt. Bei einigen der Untersuchungen, die Positivbefunde erbrachten, sind methodische Fragen offen. Den Positivbefunden stehen Negativbefunde aus anderen Untersuchungen zum gleichen Endpunkt gegenüber. Diese Datenlage begründet einen Verdacht auf mutagene Wirkung. Gemäß den EG-Einstufungskriterien erfolgt daher eine Einstufung als mutagen Kategorie 3 (M: 3).

4.2 Kanzerogenität

Es liegen Positivbefunde zur Kanzerogenität in zwei Spezies sowie zur Genotoxizität vor. Gemäß den EG-Einstufungskriterien erfolgt daher eine Einstufung als krebserzeugend Kategorie 2 (C: 2).

4.3 Reproduktionstoxizität

4.3.1 Fertilitätsmindernde Wirkung

Die fertilitätsmindernde Wirkung in der Mehrgenerationenstudie an der Maus trat in Gegenwart starker maternaler Toxizität auf. Eine Einstufung erfolgt deshalb nicht. Gemäß den EG-Einstufungskriterien erfolgt daher keine Einstufung (R_F: -).

4.3.2 Entwicklungsschädigende Wirkung

Bei Ratte und Maus wurde eine Verzögerung der fetalen Entwicklung bei maternaltoxischen Dosierungen beobachtet, wobei Schweregrad und Inzidenz der maternalen Toxizität nicht in allen Studien belegt ist. In einer Inhalationsstudie bei der Ratte traten bei maternaltoxischer Dosierung teratogene Effekte auf, die aber in einer später bei gleicher Applikationsform und Dosierung durchgeführten Studie nicht reproduziert werden konnten, ebenso wenig wie in den Studien mit oraler Applikation. Beim Kaninchen wurden entwicklungsverzögernde Wirkungen auch bei nicht maternaltoxischen Dosierungen beobachtet, jedoch fehlt eine deutliche Dosisabhängigkeit. Die beobachteten entwicklungs-schädigenden Wirkungen sind als Sekundäreffekte maternaler Toxizität anzusehen. Gemäß den EG-Einstufungskriterien erfolgt daher eine Einstufung als entwicklungsschädigend Kategorie 3 (R_E: 3).

Literatur:

- [1] Anderson D, Conning DM (1990) Experimental Toxicology- The Basic principles. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1990.
- [2] Athanasiou K, Kyrtopoulos SA (1981) Induction of sister chromatid exchange by non-mutagenic chemicals. NATO Adv Stud Inst Ser A 40: 557-562, zitiert nach IPCS.
- [3] Borzelleca JF, Carchman RA (1982) Effect of selected organic drinking water contaminants on male reproduction. Research Triangle Park, North Carolina, US Environmental Protection agency (EPA 600-/1-82-009; PB82-259847), zitiert nach IPCS 1994.
- [4] Brennan RJ, Schiestl RH (1998) Chloroform and carbon tetrachloride induced intrachromosomal recombination and oxidative free radicals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 397, 271-278.
- [5] Bull RJ, Brown JM, Meierhenry EA, Jorgenson TA, Robinson M, Stober JA (1986): Enhancement of the hepatotoxicity of chloroform in B6C3F1 mice by corn oil: implications for chloroform carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 69, 59-58.
- [6] Butterworth BE, Templin MV, Constan AA, Sprankle CS, Wong BA, Pluta LJ, Everitt KI, Recio L (1998): Long-term mutagenicity studies with chloroform and dimethylnitrosamine in female lacI transgenic B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen* 31, 248-256.
- [7] Callen DF, Wolf CR, Philpot RM (1980): Cytochrome P-450 mediated genetic activity and cytotoxicity of seven halogenated aliphatic hydrocarbons in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 77, 55-63.
- [8] Caspary WJ, Lee YJ, Poulton S, Myhr BC, Mitchell AD, Rudd CJ (1988): Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: quality-control guidelines and response categories. *Environ Mol Mutagen* 12, 19-36.
- [9] Cortés F, Mateos S, Escalza P (1985) C-Mitosis, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges induced by chloroform in root-tip cells of *Allium cepa*. *Cytobios* 44: 231-237, zitiert nach IPCS 1994
- [10] Daniel MR and Dehnel JM (1981) Cell transformation test with baby hamster kidney cells. In: Ashby J, deSerres (eds) *Progress in mutation research*, Vol. 1, Evaluation of short term tests for carcinogens, Elsevier, New York, 626-637, zitiert nach IPCS 1994
- [11] Diaz-Gomez MI, Castro JA (1980) Covalent binding of chloroform metabolites to nuclear proteins – no evidence for binding to nucleic acids. *Cancer Lett* 9: 213-218.
- [12] DeMarini DM, Lawrence BK, Brooks HG, Houk VS (1991) Compatibility of organic solvents with the Microscreen prophage-induction assay: solvent-mutagen interactions. *Mutat Res* 263: 107-113.
- [13] DiRenzo AB, Gandolfi AJ, Sipes IG (1982): Microsomal bioactivation and covalent binding of aliphatic halides to DNA. *Toxicol Lett* 11, 243-252.

- [14] Doyle TJ, Zheng W, Cerhan JR, Hong C-P, Sellers TA, Kushi LH, Folsom AR (1997) The association of drinking water source and chlorination by-products with cancer incidence among postmenopausal women in Iowa: a prospective cohort study. *Am J Public Health* 87: 1168-1176.
- [15] Fujie K, Aoki T, Ito Y, Maeda S (1993): Sister-chromatid exchanges induced by trihalomethanes in rat erythroblastic cells and their suppression by crude catechin extracted from green tea. *Mutat Res* 300, 241-246.
- [16] Fujie K, Aoki T, Wada M (1990): Acute and subacute cytogenetic effects of the trihalomethanes on rat bone marrow cells in vivo. *Mutat Res* 242, 111-119.
- [17] Gemma S, Faccioli S, Chieco P, Sbraccia M, Testai E, Vittozzi L (1996) In vivo CHCl_3 bioactivation, toxicokinetics, toxicity, and induced compensatory cell proliferation in B6C3F1 male mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 141: 394-402.
- [18] Golden RJ, Holm SE, Robison DE, Julkunen PH, Reese EA (1997): Chloroform mode of action: implications for cancer risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 26, 142-155.
- [19] Gocke E, Kinf M-T, Eckhardt K, Wild D (1981) Mutagenicity of cosmetics ingredients licensed by the European Communities. *Mutat Res* 90, 91-109.
- [20] Gomez MID, Castro JA (1980): Covalent binding of chloroform metabolites to nuclear proteins – no evidence for binding to nucleic acids. *Cancer Lett* 9, 213-218.
- [21] Graves CG, Matanoski GV, Tardiff RG (2001) Weight of evidence for an association between adverse reproductive and developmental effects and exposure to disinfection by-products: A critical review. *Regul Toxicol Pharmacol* 34, 103-124.
- [22] Greim H (Hrsg) (1999): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten: Trichlormethan, Nachtrag 1999. VCH, Weinheim.
- [23] Hard GC, Boorman GA, Wolf DC (1999) Re-evaluation of the 2-year chloroform drinking water carcinogenicity bioassay in Osborn-Mendel rats supports chronic renal tubule injury as the mode of action underlying the renal tumor response. *Toxicological Sciences* 53, 237-244.
- [24] Hatch GG, Mamay PD, Ayer ML, Casto BC, Nesnow S (1983): Chemical enhancement of viral transformation in Syrian hamster embryo cells by gaseous and volatile chlorinated methanes and ethanes. *Cancer Res* 43, 1945-1950.
- [25] Hoechst AG (1987) Chloroform: detection of gene mutations in somatic cells in culture. HGPRT test with V79 cells. Report No 870692, unveröffentlichte Untersuchung, zitiert nach MAK 1999.
- [26] Hoechst AG (1988) Chromosome aberrations in chinesis hamster bone marrow cells. Report No 880445, unveröffentlichte Untersuchung, zitiert nach MAK 1999.
- [27] Hoechst AG (1990) Chloroform: supplemental inhalation embryotoxicity study in Wistar rats. Reports 910902 and 921047, unveröffentlichte Untersuchung, zitiert nach MAK 1999.

- [28] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol.73 (1999): Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. Lyon 1999.
- [29] ICPS (International Programme on Chemical Safety) (1994) Environmental Health Criteria 163: Chloroform. World Health Organisation, Geneva.
- [30] Iijima M, Coté MG, Plaa GL (1983) A semiquantitative morphologic assessment of chlordecone-potentiated chloroform hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 17: 307-314.
- [31] Jorgenson TA, Meierhenry EF, Rushbrook CJ, Bull RJ, Robinson M (1985) Carcinogenicity of chloroform in drinking water to male Osborne-Mendel rats and female B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 5: 760-769.
- [32] Kada T (1981) The DNA-damaging activity of 42 coded compounds in the rec-assay: In: Ashby J, deSerres (eds) *Progress in mutation research*, Vol. 1, Evaluation of short term tests for carcinogens, Elsevier, New York, 175-182, zitiert nach IPCS 1994
- [33] King WD, Dodds L, Allen A (2000) Relation between stillbirth and specific chlorination by-products in public water supplies. *Environ Health Perspect* 108, 883-886.
- [34] Kirkland DJ, Smith KL, VanAbbé NJ (1981): Failure of chloroform to induced chromosome damage or sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes and failure to induce reversion in *Escherichia Coli*. *Fd Cosmet Toxicol* 19, 651-656.
- [35] Klotz JB and Pynch LA (1999) Neural tube defects and drinking water disinfection. *Epidemiology* 10, 383-390.
- [36] Kramer MD, Lynch CF, Isacson P, Hanson JW (1992) The association of waterborne chloroform with intrauterine growth retardation. *Epidemiology* 3, 407-413.
- [37] Land PC, Owen EL, Linde HW (1981): Morphologic changes in mouse spermatozoa after exposure to inhalational anesthetics during early spermatogenesis. *Anesthesiology* 54, 53-56.
- [38] Larson JL, Wolf DC, Butterworth BE (1993) Induced cytotoxicity and cell proliferation in the hepatocarcinogenicity of chloroform in female B6C3F₁ mice: comparison of administration by gavage in corn oil vs ad libitum in drinking water. *Fundam Appl Toxicology* 22, 90-102.
- [39] Larson JL, Sprankle CS, Butterworth BE (1994): Lack of chloroform-induced DNA repair in vitro and in vivo in hepatocytes of female B6C3F1 mice. *Environ Mol Mutagen* 23, 132-136.
- [40] Larson JL, Wold DC, Butterworth BE (1994) Induced cytolethality and regenerative cell proliferation in the livers and kidneys of male B6C3F₁ mice given chloroform by gavage. *Fundam Appl Toxicology* 23, 537-543.
- [41] Larson JL, Wolf DC, Butterworth BE (1995): Induced regenerative cell proliferation in livers and kidneys of male F-344 rats given chloroform in corn oil by gavage or ad libitum in drinking water. *Toxicology* 95, 73-86.

- [42] LeCurieux F, Gauthier L, Erb F, Marzin D (1995): Use of the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test to study the genotoxicity of four trihalomethanes. *Mutagenesis* 10, 333-341.
- [43] Lindahl-Kiessling K, Karlberg I, Olofsson AM (1989) Induction of sister-chromatid exchanges by direct and indirect mutagens in human lymphocytes, co-cultured with intact rat liver cells. Effect of enzyme induction and preservation of the liver cells by freezing in liquid nitrogen. *Mutat.Res.* 211, 77-87.
- [44] Melnick RL, Kohn MC, Dunnick JK, Leininger JR (1998) Regenerative hyperplasia is not required for liver tumor induction in female B6C3F₁ mice exposed to trihalomethanes. *Toxicol Appl Pharmacol* 148, 137-147.
- [45] Mirsalis JC, Tyson CK, Butterworth BE (1982): Detection of genotoxic carcinogens in the in vivo-invitro hepatocyte DNA repair assay. *Environ Mutagen* 4, 553-562.
- [46] Mirsales JC, Tyson CK, Steinmetz KL, Loh EK, Hamilton CM, Bakke JP, Spalding JW (1989): Measurement of unscheduled DNA synthesis and S-phase synthesis in rodent hepatocytes following in vivo treatment: testing of 24 compounds. *Environ Mol Mutagen* 14, 155-164.
- [47] Mitchell AD, Myhr BC, Rudd CJ, Caspary WJ, Dunkel VC (1988): Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: methods used and chemicals evaluates. *Environ Mol Mutagen* 12, 1-18.
- [48] Mitchell AD, Rudd CJ, Caspary WJ (1988): Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: intralaboratory results for sixt-three coded chemicals tested at SRI international. *Environ Mol Mutagen* 12, 37-101.
- [49] Morimoto K, Koizumi A (1983): Trihalomethanes induce sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro and mouse bone marrow cells in vivo. *Environ Res* 32, 72-79.
- [50] Morris RD, Audet, A-M, Angelillo IF, Chalmers TC, Mosteller F (1992) Chlorination, chlorination by-products, and cancer: a meta-analysis. *Am J Public Health* 82: 955-963.
- [51] Murray FJ, Schwetz JG, McBride JGM, Staples RE (1979) Toxicity of inhaled chloroform in pregnant mice and their offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 50: 515-522.
- [52] Myhr BC, Caspary WJ (1988) Evaluation of the L5178Y mouse lymphoma cell mutagenesis assay: intralaboratory results for sixty-three coded chemicals tested at Litton Bionetics, Inc.. *Environ.Mol.Mutagen* 12(Suppl.13), 103-194.
- [53] Nagano K, Nishizawa T, Yamamoto S, Matsushima T (1998) Inhalation carcinogenesis studies of six halogenated hydrocarbons in rats and mice. In: Chiyo-tani K, Hosoda Y, Aizawa Y (eds), *Advances in the prevention of occupational respiratory diseases*, Amsterdam, Elsevier, 741-746, zitiert nach IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 73, 1999.
- [54] NCI (National Cancer Institute) (1976) Report on carcinogenesis bioassay of chloroform. NIH 76-1279, NCI Bethesda, MD, NTIS PB264018, NTIS, Springfield, VA, USA.

- [55] Pegram RA, Andersen ME, Warren SH, Ross TM, Claxton LD (1997): Glutathione S-transferase-mediated mutagenicity of trihalomethanes in *Salmonella typhimurium*: contrasting results with bromodichloromethane or chloroform. *Toxicol Appl Pharmacol* 144, 183-188.
- [56] Perry PE, Thomson EJ (1981) Evaluation of sister chromatid exchange method in mammalian cells as a screening system for carcinogens. In: Ashby J, deSerres (eds) *Progress in mutation research, Vol. 1, Evaluation of short term tests for carcinogens*, Elsevier, New York, 560-569, zitiert nach IPCS 1994
- [57] Pereira MA, Knutsen GL, Herren-Freund SL (1985) Effect of subsequent treatment of chloroform or phenobarbital on the incidence of liver and lung tumors initiated by ethylnitrosourea in 15 day old mice. *Carcinogenesis* 6, 203-207.
- [58] Potter CL, Chang LW, DeAngelo AB, Daniel FB (1996): Effects of four trihalomethanes on DNA strand breaks, renal hyaline droplet formation and serum testosterone in male F-344 rats. *Cancer Lett* 106, 235-242.
- [59] Reuber MD (1979) Carcinogenicity of chloroform. *Environ Health Perspect* 31, 171-182.
- [60] Robbiano L, Mereto E, Morando AM, Pastore P, Brambilla G (1998): Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutat Res* 413, 1-6.
- [61] Rossi S, Gemma S, Fabrizi L, Testai E, Vittozzi L (1999) Time dependence of chloroform-induced metabolic alterations in the liver and kidney of B6C3F1 mice. *Arch Toxicol* 73: 387-393.
- [62] Ruddick JA, Villeneuve DC, Chu, I (1983) A teratological assessment of four trihalomethanes in the rat. *J Environ Sci Health B* 18: 333-349.
- [63] Salamone MF, Heddle JA, Katz, M (1981) Mutagenic activity of 41 compounds in the in vivo micronucleus assay. In: Ashby J, deSerres (eds) *Progress in mutation research, Vol. 1, Evaluation of short term tests for carcinogens*, Elsevier, New York, 686-697.
- [64] San Agustin J, Lim-Sylianco CY (1978) Mutagenic and clastogenic effects of chloroform. *Bull Phil Biochem Soc.* 1(2): 17-23.
- [65] Schwetz BA, Leong BKJ, Gehring PJ (1974) Embryo-and fetotoxicity of inhaled chloroform in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 28: 442-451.
- [66] Sina JF, Bean CL, Dysart GR, Taylor VI, Bradley MO (1983): Evaluation of the alkaline elution / rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic / mutagenic potential. *Mutat Res* 113, 357-391.
- [67] Sharma GP, Anand RK (1984) Two halogenated hydrocarbons as inducers of chromosome aberrations in rodents. *Proc Natl Acad Sci India* 54: 61-67.
- [68] Shelby MD, Witt KL (1995) Comparison of results from mouse bone marrow chromosome aberrations and micronucleus tests. *Environ Mol Mutagen* 25: 302-313.
- [69] Sturrock J (1977): Lack of mutagenic effect of halothane or chloroform on cultured cells using the azaguanine test system. *Br J Anaesth* 49, 207-210.

- [70] Suzuki H (1987) Assessment of the carcinogenic hazard of 6 substances used in dental practices. *Shigaku* 74: 1385-1403, zitiert nach MAK 1999.
- [71] Templin MV, Jamison KC, Sprankle CS, Wolf DC, Wong BA, Butterworth BE (1996) Chloroform-induced cytotoxicity and regenerative cell proliferation in the kidneys and liver of BDF₁ mice. *Cancer Lett* 108: 225-231.
- [72] Thier R, Taylor JB, Pemble SE, Humphreys WG, Persmark M, Ketteler B, Guengerich FP (1993) Expression of mammalian glutathione S-transferase 5-5 in *Salmonella typhimurium* TA 1535 leads to base-pair mutations upon exposure to dihalomethanes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8576-8580.
- [73] Thompson DJ, Warner SD, Robinson VB (1974) Teratology studies on orally administered chloroform in the rat and rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol* 29: 348-357.
- [74] Topham JC (1980). Do induced sperm-head abnormalities in mice specifically identify mammalian mutagens rather than carcinogens? *Mutat Res* 74, 379-387.
- [75] Tsuchimoto T, Matter BE, Activity of coded compounds in the micronucleus test. Ashby J, deSerres (eds) *Progress in mutation research*, Vol. 1, Evaluation of short term tests for carcinogens, Elsevier, New York, 705-711.
- [76] Tumasonis CF, McMartin DN, Bush B (1985) Lifetime toxicity of chloroform and bromodichloromethane when administered over a lifetime in rats. *Ecotoxicol Environ Safety* 9: 233-240, zitiert nach IPCS 1994.
- [77] Vogel E, Blijleven WGH, Kortselius MJH, Zijlstra JA (1981) In: Ashby J, deSerres (eds) *Progress in mutation research*, Vol. 1, Evaluation of short term tests for carcinogens, Elsevier, New York, 660-665, zitiert nach IPCS 1994
- [78] Waller K, Swan SH, Delorenze G, Hopkins B (1998) Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion. *Epidemiology* 9, 134-140.
- [79] Wecher RA, Scher S (1982) Bioassay procedures for identifying genotoxic agents using light emitting bacteria as indicator organisms. In: Seno M, Pazzagli M (eds) *Luminescent assays: perspectives in endocrinology and clinical chemistry*, New York, Raven press Ltd., 109-113, zitiert nach IPCS 1994.
- [80] White AE, Takehisa S, Eger EI, Wolff S, Stevens WC (1979): Sister chromatid exchanges induced by inhaled anesthetics. *Anesthesiology* 50, 426-430.