



DIE BEDEUTUNG DER KURZZEIT-TESTS IN DER GENETISCHEN TOXIKOLOGIE

Friedrich E. Würzler

Institut für Toxikologie
der ETH und der Universität Zürich
Schorenstrasse 16
8603 Schwerzenbach ZH

ZUSAMMENFASSUNG

Die genetische Toxikologie hat die Aufgabe, den Menschen vor chemisch induzierten Schädigungen seines Erbautes zu schützen. Etwa 150 Kurzzeit-Tests, grösstenteils an Bakterien, Hefen, Insekten und Säugerzellen in Kultur, erlaubt mutagene Chemikalien zu identifizieren. Die Relevanz der Kurzzeit-Tests für eine Voraussage des karzinogenen Risikos lässt sich für diejenigen Substanzen direkt bestimmen, für welche eine karzinogene Wirkung beim Menschen nachgewiesen oder wahrscheinlich gemacht wurde. Je nach verwendetem Test werden etwa 65-85 % der menschlichen Karzinoogene als Mutagene erkannt. Für eine grosse Zahl von Verbindungen können die Kurzzeit-Test-Ergebnisse mit den Befunden im Langzeit-Karzinogenese Test bei Nagern verglichen werden. Stark mutagene Karzinoogene sind gut erfassbar. Schwache Mutagene und Karzinoogene, die über nicht-genotoxische Mechanismen wirken, verlangen weitere Abklärungen und die Entwicklung neuer Kurzzeit-Tests. Versuche am Säuger können nur schrittweise reduziert werden. Ergebnisse der Genotoxizitäts-Tests sind auch relevant für eine Beurteilung der potentiellen Induktion von erblichen Mutationen in Keimzellen und von weiteren, heute noch wenig beachteten genotoxischen Wirkungen, insbesondere der Förderung von Alterseffekten.

EINLEITUNG

Fremdstoffe (Xenobiotika) können Lebewesen und somit auch den Menschen schädigen. Akute Schädigungen, Vergiftungen, werden üblicherweise auf Grund der sofort erkennbaren Symptome bemerkt und können bekämpft oder vermieden werden. Viel heimtückischer sind jedoch jene Schadstoffe, die ohne sofort erkennbare Symptome zu irreversiblen Schäden führen. Zu den gefährlichen irreversiblen Schädigungen gehören:



- Schädigungen des Zentralnervensystems (es findet keine Regeneration der Nervenzellen statt)
- Schädigungen in der Entwicklung der Augenlinse (irreversible Trübungen)
- Missbildungen, die im Laufe der embryonalen und fötalen Entwicklung induziert werden (teratoogene Effekte)
- Karzinoogenese (Veränderung von Zellen, sodass sie oder ihre Nachkommenzellen später maligne entarten können)
- Mutagenese (genetische Veränderungen in Keimzellen oder somatischen Zellen)

Karzinogene und mutagene Schädigungen sind dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Induktion und der Manifestation lange Latenzzeiten von 10 und mehr Jahren liegen können. Bei den mutagenen Effekten, aber auch in vielen Fällen der karzinogenen und teratoogenen Wirkungen, spielen genetische Veränderungen, Mutationen, eine zentrale Rolle. Diese gemeinsame Wurzel hat dazu geführt, dass die Untersuchungen der auf genetischen Veränderungen beruhenden Schädwirkungen unter dem Begriff "Genetische Toxikologie" zusammengefasst wurden. Die Universalität des entscheidenden Treffermoleküls, der DNA, führte dazu, dass gerade auf diesem Gebiete die Einsatzmöglichkeiten von Nichtsäugersystemen (submammalian assays) erkannt und realisiert wurden.

ENTSTEHUNG DER GENETISCHEN TOXIKOLOGIE

Dass Umwelteinflüsse Mutationen auslösen können, wurde für ionisierende Strahlen erstmals von H.J. Muller 1927 erkannt (1). In den frühen 40er Jahren wurde auf Grund der mutagenen Aktivität von Senfgas das erste chemische Mutagen gefunden.(2). Zunächst wurden die genetischen Risiken der Strahlen als wesentlich bedeutsamer eingeschätzt, als jene der chemischen Mutagene. Die meisten der früh erkannten Mutagene waren hoch toxisch, und man musste daher kaum mit einer bedeutsamen Exposition menschlicher Populationen rechnen.

Diese Situation änderte sich in den frühen 60er Jahren schlagartig, als Substanzen gefunden wurden, die bereits bei Dosierungen mutagen waren, die weder die Fertilität beeinflussten noch toxisch waren. Zu diesen



Verbindungen gehörten etwa EMS (Aethyl-methansulfonat), und MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoquanidin), die mit hoher Potenz in einer ganzen Reihe von Organismen Mutationen induzieren. Im September 1966 verabschiedete dann eine kleine Konferenz die ersten Empfehlungen zur Mutationsprophylaxe (3):

- (a) Ein öffentlich zugängliches Register mutagener Chemikalien soll errichtet und laufend nachgeführt werden
- (b) Nahrungsmittelzusätze, Medikamente und Substanzen, mit denen weite Teile der Bevölkerung in Kontakt kommen, sollen routinemässig auf Mutagenität geprüft werden.
- (c) Die Entwicklung empfindlicher und billiger Prüfmethode soll gefördert werden.
- (d) Die Bevölkerung soll bezüglich somatischer mutagener Effekte und einer möglichen Zunahme von Erbkrankheiten überwacht werden.

Im Jahre 1969, mit der Gründung der amerikanischen "Environmental Mutagen Society", gelangte die Sorge um die potentielle Gefährdung des menschlichen Erbgutes durch Umweltchemikalien auch langsam ins öffentliche Bewusstsein.

DIE GRÖSSE DER AUFGABE

Jeder Mensch ist täglich Hunderten von chemischen Stoffen ausgesetzt. Es sind zum Teil natürliche Stoffe, zum Teil synthetische Stoffe. Gerade die Produktion künstlicher Stoffe hat in wenigen Jahrzehnten drastisch zugenommen. Sie stieg von 2 Billionen Kilogramm 1940 bis zu 11 Billionen Kilogramm im Jahre 1955 und auf etwa 114 Billionen Kilogramm im Jahre 1979.

Dank der Arbeit der Chemical Abstract Services der Amerikanischen Chemischen Gesellschaft ist es möglich, die Anzahl bekannter chemischer Verbindungen abzuschätzen (4). Auf Grund der Aufarbeitung der gesamten chemischen Literatur wurde am 24. Februar 1983 die 6-millionste Verbindung registriert. Schätzungsweise nochmals 1,3 Millionen Verbindungen dürften zudem in der zwischen 1920 und 1964 veröffentlichten Literatur vorhanden sein, die aber derzeit noch nicht in die Datenbank aufgenommen wurden.



Für die 6 Millionen Chemikalien enthält das Verzeichnis 9,2 Millionen Namen (Spitzenreiter ist Polyäthylen mit rund 1200 Namen). Es kommen täglich etwa 1000 Chemikalien neu dazu.

Natürlich sind nicht alle diese Verbindungen im täglichen Gebrauch. Etwa 75 % der Verbindungen sind nur ein einziges Mal in der wissenschaftlichen Literatur erwähnt. Erhebungen bei den verschiedenen staatlichen Behörden der USA, die sich mit der Kontrolle der chemischen Stoffe in verschiedenen Anwendungsgebieten befassen, ergab eine Schätzung von 63'000 Substanzen, die im täglichen Gebrauch stehen (5). Etwa 50'000 Stoffe werden von Industrie, Handel und Gewerbe gebraucht, etwa 1500 aktive Stoffe finden in Pestiziden Verwendung. Dazu kommen etwa 4000 Wirkstoffe in Medikamenten, 2000 Stoffe zur Stabilisierung der Medikamente, 2500 Nahrungsmittelzusätze mit Nährwert und etwa 3000 Substanzen zur Haltbarmachung der Nahrung. Es wird angenommen, dass in den USA jährlich zwischen 300 und 3000 neue industrielle Chemikalien in Gebrauch genommen werden. Zum weltweiten Gebrauch kommen jährlich etwa 100 Substanzen neu dazu (6).

Eine besonders bedeutsame Expositionsquelle ist die Nahrung, nimmt doch ein Mensch in den ersten 50 Jahren seines Lebens etwa 10 Tonnen (Trockengewicht) an Nahrung auf. Es wurde geschätzt, dass dabei pro Mensch und Tag zwischen 1 und 2 Gramm potentiell mutagene Stoffe aufgenommen werden (7).

KURZZEIT-TESTS

In den frühen 70er Jahren wurde mit der Entwicklung von Kurzzeit-Tests, in vielen Fällen ohne Verwendung von Säugern, begonnen. Die Grundlage für diese Entwicklung bildete die Universalität des Greffermoleküls, der DNA. Simplifizierte Begründungen wie "DNA is DNA" oder "what is true for E.coli is true for the elephant" waren damals für viele Leute einsichtig. Der Aufbau eines Nachweissystems für chemisch induzierte Genmutationen am Bakterium *Salmonella typhimurium* (dem Erreger des Mäusetyphus) ist ein Musterbeispiel systematischer Test-Entwicklung. Die Grundidee war die Ausnutzung effizienter mikrobiologischer Techniken, insbesondere der selektiven Erfassung der Mutationsereignisse, ohne dass Tausende von



normalen, nicht mutierten Kolonien gezählt werden müssen. Behandelt man nämlich Bakterien, die als Folge einer Genmutation nicht fähig sind, selber die Aminosäure Histidin zu synthetisieren, mit einem Genmutations-induzierenden Agens, so kann die Histidin-Mutation rückmutieren. Und nur diese rückmutierten Zellen sind fähig, auf einem Histidin-freien Medium Kolonien zu bilden.

Da die beiden Grundtypen von Genmutationen, die Basenpaar-Substitutionen und die Rastermutationen, über verschiedene molekulare Mechanismen rückmutieren, mussten mehrere Teststämme ausgewählt werden. Auch für die über Radikalmechanismen wirkenden Substanzen musste ein weiterer Stamm hinzugefügt werden. Die Verwendung mehrerer Stämme erhöht zwar den experimentellen Aufwand, liefert aber bereits mit den ersten positiven Befunden auch einen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus einer mutagenen Substanz.

Die ursprünglichen Stämme waren recht unempfindlich. Ihre Empfindlichkeit konnte jedoch drastisch gesteigert werden. Die heutige Hyperempfindlichkeit wurde erreicht durch: (a) verbesserte Substanzaufnahme in die Zellen (Verwendung einer Mutante, die zu einer unvollständigen Lipopolysaccharid-Hülle der Zellen führt), (b) Ausschaltung der DNA-Exzisions-Reparatur und (c) Störung der verbleibenden DNA-Reparatur durch Einführung eines spezifischen Plasmids.

Doch selbst mit all diesen Verbesserungen erkannte Salmonella nur einen Teil der im Säugetier aktiven Mutagene. Die Ursache liegt in den enormen metabolischen Unterschieden zwischen Bakterien und Säugetieren. Der Nachweis der Mehrzahl der Säugetiermutagene gelingt heute dank der Zugabe eines, vor allem die vom Cytochrom P-450 abhängigen Enzyme enthaltenden, Leberextraktes (meist die sog. S9-Fraktion aus der Leber Arochlor-induzierter Ratten). In dieser Form nennt man den Test heute "Salmonella/mammalian microsome assay" oder einfach nach seinem "Vater", dem in Berkeley (Kalifornien, USA) tätigen Biochemiker Bruce Ames, den "Ames-Test" (8).

Mitte der 70er Jahre waren wenige Hundert Substanzen im Ames-Test geprüft, darunter eine Reihe bekannter Karzinogene. Das Hauptergebnis ist dem nachfolgenden Literaturzitat zu entnehmen:



Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., and Lee, F.D.: Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 2281-2285 (1973).

Diese Botschaft hat für rund 10 Jahre das Gebiet der genetischen Toxikologie weitgehend geprägt. Für viele, vor allem ausenstehende Beobachter, waren Mutagenitätstests gleichbedeutend mit Kurzzeittests auf Karzinogenität. Die allgemein anerkannte Relevanz der Karzinogenese-forschung, der mindestens vom theoretischen Standpunkt aus wesentlich erscheinende Einbezug weiterer genetischer Endpunkte (Chromosomen-Aberrationen, Rekombinationen, Aneuploidien), sowie Versuche, rascher ans Ziel zu kommen durch Registrierung vor-mutativer Ereignisse (DNA-Addukte, DNA-Strangbrüche, induzierte Reparatur, etc.), führten zu einer Inflation der Testsysteme. Es existieren heute etwa 150 verschiedene Assays. Die Methodologie der wichtigsten Assays ist in einem Handbuch zusammengefasst (9).

TESTSTRATEGIEN

Für die Anwendung der Kurzzeittests werden zwei prinzipiell verschiedene Ansätze diskutiert:

1) Der "tier approach": Dies ist eine sequenzielle, schichtweise (engl. tier = Schicht) Testung einer Substanz in verschiedenen hintereinander geschalteten Assays. Da nach einer Anzahl negativer Ergebnisse die Testung jederzeit abgebrochen werden kann, ist dies ein kostengünstiger Ansatz. Von Nachteil ist der verhältnismässig grosse Zeitaufwand.

2) Der "battery approach": Hier wird ein Satz von Assays gleichzeitig, parallel durchgeführt. Damit stehen schon nach relativ kurzer Zeit die zur Beurteilung einer Substanz notwendigen Daten zur Verfügung. Allerdings ist dieser Ansatz relativ kostenaufwendig, weil sich eine gewisse Redundanz nicht vermeiden lässt.

Welche Assays für eine bestimmte Fragestellung in einem Tier oder einer



Batterie verwendet werden, wurde bisher vor allem auf Grund theoretischer Überlegungen festgelegt. Wenn auch im Rahmen der OECD und der EG Bestrebungen zu einer Vereinheitlichung der Richtlinien unternommen werden, so bestehen heute doch recht grosse Unterschiede in den verschiedenen Ländern. Häufig wird ein Grund-Set von Tests verlangt und dabei die Auswahl der individuellen Tests den verantwortlichen Wissenschaftlern überlassen. Zusätzliche Tests werden dann meist nur im Falle klarer positiver Ergebnisse verlangt (10).

EVALUATION DER KURZZEIT-TESTS

Daten zur Genotoxizität werden heute vor allem als Indikatoren für eine potentielle Induktion von Krebs und von Erbkrankheiten betrachtet. Nur selten wird beachtet, dass grundsätzlich alle Lebensfunktionen, die unter genetischer Kontrolle stehen, durch genotoxische Wirkungen beeinflusst werden können. Am Einzelindividuum kann dies geschehen durch somatische Mutationen oder durch strukturelle Umbauten der Chromosomen, die heterozygot bereits vorhandene, "krankhafte" Gene zur Auswirkung bringen können. Ein bereits klassisch gewordenes Beispiel sind die heterozygot vererbten Tumorkrankheiten, wie Retinoblastom und Wilm's Tumor, die erst auf Grund eines zusätzlichen genetischen Ereignisses (Chromosomen-Verlust, mitotische Rekombination, Deletion, somatische Mutation) im Laufe der Entwicklung des betroffenen Organs zur Ausprägung gelangen (11). Es ist anzunehmen, dass die Auftretenswahrscheinlichkeit einer ganzen Reihe weiterer familiär auftretender Tumorkrankheiten durch genotoxische Effekte erhöht werden kann (12). Es existieren Hinweise, wenn auch meist indirekter Natur, dass auch Sterilität oder Semisterilität, Herzkrankheiten, Arteriosklerose, Altersstar (Katarakte), Metaplasien (Umwandlungen einer Gewebeart in eine andere) und allgemein Alterungserscheinungen durch genotoxische Effekte gefördert werden könnten (13,14).

Die zentrale Frage der Evaluation der Kurzzeit-Tests lautet: Geben die Daten der Kurzzeit-Tests die korrekte Voraussage für die Wirkung oder die Unwirksamkeit einer Substanz beim Menschen? Eine direkte Antwort ist dort zu erhalten, wo unmittelbar Daten am Menschen bekannt sind. Es ist

heute kein Fall bekannt, in dem nachgewiesen werden konnte, dass eine bestimmte chemische Substanz zu einer in der Keimbahn des Menschen weitervererbten Mutation geführt hat. Epidemiologische Studien auf diesem Gebiete sind so schwierig, dass es nicht einmal gelang, für das wohlbekannte Umweltmutagen "ionisierende Strahlung" in den Bevölkerungen von Hiroshima und Nagasaki einen unumstößlichen Nachweis induzierter Keimbahn-Mutationen zu erbringen (15). Es gibt jedoch keine wissenschaftlich vertretbaren Gründe anzunehmen, dass chemische Mutagene in der Keimbahn des Menschen unwirksam sein müssten. Bei Kurzzeit-Tests und/oder im Säuger nachgewiesene potente Mutagene stellen sicher ein Risiko für die menschliche Keimbahn dar. Sie können mit Kurzzeit-Tests als Mutagene erkannt werden. Die Validierung der Drosophila-Keimzelltests und weiterer Kurzzeit-Tests bezüglich der Ergebnisse an Keimzellen des Säugers ist noch nicht abgeschlossen. Für eine quantitative Extrapolation des genetischen Risikos reichen aber derzeit Kurzzeit-Tests alleine nicht aus. Quantitative Risiko-Beurteilungen basieren heute auf experimentellen Daten bei der Maus (16).

Mindestens 70 verschiedene Krebs-Typen wurden beim Menschen klinisch identifiziert. Sie können auf sehr unterschiedliche Ursachen zurückgehen. Epidemiologen vermuten, dass bis zu 80 oder 90 % der auftretenden Krebserkrankungen mit Umweltfaktoren und mit dem Lebensstil zusammenhängen. Allerdings sind die Faktoren nicht im Detail bekannt, und es ist auch nicht bekannt, in welchem Ausmass sie eliminiert oder vermieden werden können (17). Einen dramatischen Anstieg zeigt nur der Lungenkrebs, und dies ist sicherlich auf das wohl bekannte "Umweltrisiko Tabakrauch" zurückzuführen (18).

In den Arbeiten von IARC, der International Agency for Research on Cancer in Lyon, wurden 23 Chemikalien und 7 industrielle Prozesse identifiziert, für die eine Krebsauslösung beim Menschen nachweisbar ist. Für weitere 61 Chemikalien, Gruppen von Chemikalien oder industrielle Prozesse ist eine karzinogene Wirkung beim Menschen wahrscheinlich (19). Mit diesen Befunden lassen sich die Versuchsergebnisse der Kurzzeit-Tests unmittelbar überprüfen: Obwohl in manchen Datensets der Salmonellen Test über 70% der Karzinogene erkennt, ergab sich bei diesem Material für den Salmonellen/Säuerermikrosomentest nur eine Sensitivität von 62,1% (36 Chemikalien unter 58 geprüften menschlichen Karzinogenen waren positiv). Die Befunde für andere Tests sind: E. coli Genmutationen (30/38 = 78,9%),



verschiedene Tests bei Pilzen ($23/35 = 65,7\%$), DNA-Schäden bei Prokaryonten ($33/41 = 80,5\%$), Genmutationen ($27/37 = 73,0\%$) sowie Chromosomenaberrationen ($29/47 = 65,7\%$) und Schwesterchromatid-Austausche (SCE) ($25/31 = 80,6\%$) bei Säuerzellen in Kultur, und schliesslich für Zelltransformation ($21/24 = 87,5\%$).

Es ist klar, dass diese Gruppe von Chemikalien zu klein ist, um schon zu fundierten, endgültigen Schlüssen zu kommen. Es werden daher weltweit verschiedene Anstrengungen unternommen, weitere Evaluationen durchzuführen. Diese Arbeiten befassen sich vor allem mit der Beurteilung der Voraussage-Möglichkeiten für karzinogene Wirkungen. Zu diesem Zweck werden die Daten aus den Kurzzeit-Tests mit den bei Ratte und Maus im Langzeit-Karzinogenese-Test erhobenen Befunden verglichen. Es werden zur Zeit vor allem zwei Datensets bearbeitet:

(1) Die GENE-TOX-Datenbasis: Im Auftrage der amerikanischen EPA (Environmental Protection Agency) wurde die Literatur über chemische Mutagene kritisch aufgearbeitet. Die Datenbasis umfasst zur Zeit (nach einem unveröffentlichten Zwischenstand von GENE-TOX Phase III) Daten über 3798 Chemikalien. 73 Genotoxizitäts-Tests und der Langzeit-Karzinogenese-Test wurden berücksichtigt. Die meisten Substanzen wurden bei Salmonella (1813) und Drosophila (782) getestet. 25 Tests enthalten über 100 geprüfte Chemikalien. Allerdings sind 2354 von den 3798 Substanzen, oder 62%, nur in einem Test geprüft worden und stehen also für Vergleiche nicht zur Verfügung. Die Karzinogenese-Datenbank umfasst 412 Substanzen mit genügenden Daten (351 Karzinogene und 61 Nicht-Karzinogene).

(2) Die NTP-Datenbasis: Im Rahmen des gross angelegten National Toxicology Program (NTP) der USA werden unter anderem auch Langzeitkarzinogenese- und Genotoxizitätsstudien durchgeführt. Die noch ständig anwachsende Karzinogenese-Datenbasis umfasst etwa 300, jene der Kurzzeit-Tests je nach Assay, bis einige hundert Substanzen. Eine erste Auswertung wurde mit 73 Verbindungen durchgeführt, für die genügend Karzinogenese- und Genotoxizitäts-Daten vorhanden sind (21). Die Publikation weiterer kritischer Analysen ist für das laufende Jahr vorgesehen.

Betrachtet man die Gesamtheit der Karzinoogene, so ergibt sich, dass kein einzelner, aber auch keine Batterie von Kurzzeit-Tests, alle Karzinoogene korrekt voraussagen kann. Dabei ist zu beachten, dass die Voraussage der Maus für die Karzinoogenese bei der Ratte auch nur 71% bei NTP und 85% bei GENE-TOX beträgt. Befriedigende Voraussagen in den Kurzzeit-Tests erhält man vor allem für die bei verschiedenen Tierarten und in verschiedenen Organen wirksamen Karzinoogene. Für andere wohl im Säuger sehr spezifisch wirkende Karzinoogene (Promotion von spontan auftretenden prämaligen Zellen in spezifischen Organen?) muss zunächst der Wirkungsmechanismus abgeklärt werden, um zu erkennen, ob es sich um genotoxische oder nicht-genotoxische Stoffe handelt. Je nach Ergebnis solcher Untersuchungen müssen weitere Assays entwickelt werden, z.B. Induktion von S-Phase-Zellen in der Leber, etc. Ganz wichtig sind in der nahen Zukunft Kurzzeittests mit Substanzen, die in korrekt durchgeführten Langzeitstudien als Nicht-Karzinoogene definiert wurden. Nur mit solchen Daten lässt sich die Frage nach der korrekten Erkennung von Nicht-Karzinoogenen in den Kurzzeit-Tests überprüfen. Zudem ist davon ein wichtiger Beitrag zur Lösung des Problems der schwachen genotoxischen Säuger-Karzinoogene zu erwarten.

Die Analysen der letzten Monate haben uns gelehrt, dass eine einfache positiv-negativ Beurteilung der Genotoxizitäts-Daten alleine nicht genügt, um die uns gestellten Aufgaben zu lösen. Auch die heute üblichen globalen Vergleiche von Daten aus Kurzzeit-Testen mit der Gesamtheit der in Ratte und Maus Tumor-induzierenden Substanzen müssen ersetzt werden durch eine differenzierte Betrachtung der Früherkennung genotoxischer Karzinoogene, denn die in mehreren Arten und dort in mehreren Organen aktiven Karzinoogene sind von besonderer Relevanz für die menschliche Gesundheit. Es muss vermehrtes Gewicht auf die Erfassung von Struktur-Wirkungsbeziehungen gelegt werden (22). Am Beispiel der Voraussage karzinoogener Wirkungen für den Menschen werden wir neue Strategien mit einer schrittweisen Reduktion der Versuche an Säugern entwickeln müssen, um diese dann in Zukunft auch auf die Voraussage weiterer, auf genotoxischen Wirkungen beruhender Schädigungen für den Menschen anwenden zu können.



LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Muller, H.J. (1927) Artificial transmutation of the gene, *Science* 66, 84-87.
- 2 Auerbach, Ch. and Robson, J.M. (1947) The production of mutations by chemical substances, *Proc. Roy. Soc. Edinb.*, B, 62, 271-283.
- 3 Crow, J.F. (1968) Chemical risk to future generations. *Scientist and Citizen*, June-July 1968, pp. 113-117.
- 4 Maugh II, T.H. (1983) How many chemicals are there? *Science* 220, 293.
- 5 Maugh II, T.H. (1978) Chemicals: How many are there? *Science* 199, 162.
- 6 Fishbein, L. (1984) Mutagens and carcinogens in the environment. XV International Congress of Genetics, New Delhi, Plenary Symposia and Symposia Session. Summaries of Contributions, Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 99-101.
- 7 Stich, H.F., Wu, C., and Powrie, W. (1982) Enhancement and suppression of genotoxicity of food by naturally occurring components in these products. In: Sugimura, T., Kondo, S., and Takebe, H. (eds): "Environmental Mutagens and Carcinogens", Tokyo, University of Tokyo Press; New York, Alan R. Liss; pp. 347-353.
- 8 Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.* 113, 173-215.
- 9 Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., and Ramel, C. (1984) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Amsterdam, Elsevier, 859 pp.
- 10 Berry, D.J. and Litchfield, M.H. (1985) A review of the current regulatory requirements for mutagenicity testing. In: Ashby, J., de Serres, F.J., Draper, M., Ishidate, M., Marqolin, B.H., Matter, B.E., and Shelby, M.D. (eds): Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens; Report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on In Vitro Assays; Progress in Mutation Research, Vol. 5, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp. 727-740.
- 11 Cavenne, W.K., Koufos, A., and Hansen, M.F. (1986) Recessive mutant genes predisposing to human cancer, *Mutation Res.* 168, 3-14.
- 12 Würzler, F.E. and Müller, H.J. (1987) Somatic effects of genotoxic agents; in preparation.
- 13 Hartman, P.E. (1983) Mutagens: Some possible health impacts beyond carcinogenesis, *Environmental Mutagenesis* 5, 139-152.
- 14 Brusick, D. (1980) Principles of Genetic Toxicology, New York, Plenum Press, 279 pp.



- 15 Neel, J.V., Schull, W.J., and Otake, M. (1982) Current status of genetic studies in Hiroshima and Nagasaki. In: Bora, K.C., Douglas, G.R., and Nestmann, E.R. (eds): Chemical Mutagenesis, Human Population Monitoring and Genetic Risk Assessment, Progress in Mutation Research, Vol. 3, Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, pp. 39-51.
- 16 ICPEMC (1983) International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. Estimation of genetic risks and incidence of genetic diseases due to environmental mutagens, Mutation Res. 115, 255-291.
- 17 Doll, R. and Peto, R. (1981) The Causes of Cancer, Oxford, Oxford University Press, 115 pp.
- 18 Loeb, L.A., Ernster, V.L., Warner, K.E., Abbott, J., and Laszlo, J. (1984) Smoking and lung cancer: an overview, Cancer Res. 44, 5940-5958.
- 19 IARC (1982) International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans; Chemicals, Industrial Processes and Industries Associated with Cancer in Humans, Lyon, IARC, 292 pp.
- 20 Kuroki, T. and Matsushima, T. (1987) Performance of short-term tests for detection of human carcinogens, Mutagenesis 2, 33-37.
- 21 Tennant, R.W., Stasiewicz, S., and Spalding, J.W. (1986) Comparison of multiple parameters of rodent carcinogenicity and in vitro genetic toxicity, Environmental Mutagenesis 8, 205-227.
- 22 Rosenkranz, H.S., Mitchell, C.S., and Klopman, G. (1985) Artificial intelligence and Bayesian decision theory in the prediction of chemical carcinogens, Mutation Res. 150, 1-11.

ES WAR EINE
MUTAGENESE-STUDIE...

DROSOPH

