

69 5 50 2e nr.

Rapport inzake grenswaarde Chloroform

Gezondheidskundig advies van de
Werkgroep van Deskundigen ter
vaststelling van MAC-waarden

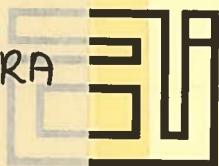
Directoraat-Generaal van de Arbeid

000

-AIRA

7/7

ZW



RA 7/87

Rapport inzake grenswaarde Chloroform

Gezondheidskundig advies van de
Werkgroep van Deskundigen ter
vaststelling van MAC-waarden

Centrale Bibliotheek
en Documentatie van de
Arbeidsinspectie
Balen van Andelplein 2
Voorburg
46.490

Door de Werkgroep van Deskundigen is aan de hand van de beschikbare literatuur de toxiciteit van chloroform bestudeerd. Op basis daarvan is dit advies opgesteld over de gezondheidkundig gezien aanvaardbare concentratie van chloroform in de lucht op de werkplek. Voor de procedure welke gehanteerd wordt bij het vaststellen van een MAC-waarde wordt verwezen naar het rapport "Uitgangspunten bij advisering inzake MAC-waarden". Dit rapport is in 1978 gepubliceerd als supplement 1 bij nr. 25 van het Tijdschrift voor Sociale Geneeskunde. Overdrukken zijn verkrijgbaar door overmaking van f. 7,- per exemplaar op postrekening 425088 ten name van het Ministerie van Sociale Zaken en Werkgelegenheid te 's-Gravenhage (rekening Directoraat-Generaal van de Arbeid) onder vermelding van "Uitgangspunten advisering MAC-waarden".

Inhoudsopgave

1.	Algemene gegevens	1
1.1	Fysische en chemische eigenschappen	1
1.2	Voorkomen en toepassing	1
2.	Monitoring	3
2.1	Omgevingsmonitoring	3
2.2	Biologische monitoring	3
3.	Grenswaarden	4
4.	Kinetiek	5
4.1	Opname en verdeling	5
4.2	Omzetting en uitscheiding	6
5.	Effecten	9
5.1	Lokale effecten	9
5.2	Systemische effecten	9
5.2.1	Kortdurende blootstelling	9
5.2.2	Langdurige blootstelling	13
5.2.2.1	Niet-carcinogene effecten	13
5.2.2.2	Carcinogene effecten	17
5.2.2.3	Epidemiologie	24
5.2.3	Reproductie	25
5.3	Genotoxische effecten	29
5.3.1	In vitro testen	29
5.3.1.1	Prokaryoten	29
5.3.1.2	Eukaryoten	29
5.3.2	In vivo testen	31
5.3.2.1	Geslachtsgekekoppelde recessief-letaal test	31
5.3.2.2	Micronucleus test	31
5.3.2.3	Sperm morphology test	32
5.3.3	Andere studies	32
6.	Risicogroep	35
7.	Gewenst onderzoek	36
8.	Evaluatie en advies	37
8.1	Evaluatie	37
8.2	Advies	37
	Literatuur	38
	Bijlage 1	48
	Bijlage 2	49
	Bijlage 3	50
	Bijlage 4	51
	Bijlage 5	52
	Bijlage 6	53
	Bijlage 7	54

1. Algemene gegevens

chemische benaming	chloroform
synoniemen	trichloromethaan methanylchloride trichloroform methyltrichloride trichloroformmethaan
handelsnamen	Freon 20 R 20
CAS registratienummer	67-66-3

1.1 Fysische en chemische eigenschappen

chemische formule	CHCl_3
molecuul gewicht	119, 39
kookpunt 1 (bar)	+ 61,7°C
smeltpunt 1 (bar)	- 63,5°C
dampspanning (20°C, 1 bar)	0,2 mbar
relatieve dichtheid van verzadigde damp in lucht (lucht = 1) (20°C, 1 bar)	1,6
dichtheid van de stof (20°C)	1,485 g/ml
Percentage van de damp in verzadigde lucht (20°C, 1 bar)	0,02%
oplosbaarheid (20°C, 1 bar)	
water	8,2 g/l
ethanol	mengbaar
diethylether	mengbaar
conversie factoren (25°C en 1 bar)	1 ppm = 4,89 mg.m ⁻³ 1 mg.m ⁻³ = 0,206 ppm
reukgrens	200 ppm (978 mg.m ⁻³)

Chloroform is een heldere, kleurloze vloeistof met een karakteristieke reuk en zoete smaak.

Bij blootstelling aan lucht en licht wordt het langzaam afgebroken tot fosgeen (COCl_2), zoutzuur (HCl) en chloor (Cl_2). Deze ontleding verloopt snel in aanwezigheid van vuur.
(Mercier 1977, IARC 1979 en Barlow et al 1982.)

1.2 Voorkomen en toepassing

Chloroform wordt met de volgende procédés geproduceerd (Mercier 1977):

1. hydrochlorering van methanol (CH_3OH)
2. chlorering van methaan (CH_4)
3. gelimiteerde reductie van tetrachloormethaan (CCl_4) (op beperkte schaal).

Het technische produkt kan de volgende verontreinigingen bevatten: methyleen chloride, bromochloromethaan en tetrachloormethaan.

Chloroform is meestal gestabiliseerd door additie van 0,6-1% ethanol of

0,0005-0,01% thymol, t-butyl phenol of n-octyl-phenol om fotochemische omzetting te voorkomen.
(Fishbein 1976 volgens Mercier 1977 en IARC 1979.)

De volgende toepassingen van chloroform zijn bekend:

- chloroform was het belangrijkste anestheticum vanaf 1847 tot na de tweede wereldoorlog (minimum alveolaire concentratie is 5000 ppm) (Davidson et al 1982)
- chloroform is gebruikt als additief in medicijnen en cosmetische producten, bijvoorbeeld hoestdrank en tandpasta (max. 4%). In 1976 is dit gebruik verboden in de V.S. (E.P.A. 1976).
- chloroform wordt gebruikt in antivries, plastics, graanontsmetting, als oplosmiddel voor plakmiddelen, harsen en bestrijdingsmiddelen en als extractiemiddel van vitamines en smaakstoffen.
(Danni et al 1982)

Chloroform komt vrij als tussenproduct bij de bereiding van medicijnen, pesticiden en verf.
(Danni et al 1982)

Chloroform komt algemeen in de atmosfeer en het oppervlaktewater voor. In de atmosfeer zijn gemiddelde gehalten gemeten van 0,045-5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,009-1,03 ppb) (IARC 1979), lokatie onbekend.

Chloroform ontstaat bij de chlorering van drinkwater (Rook 1978 en Kool 1983). In 1974 bevatte in Nederland het drinkwater gemaakt uit water uit de Biesboschbekkens gemiddeld 22 $\mu\text{g CHCl}_3/\text{l}$ (5-64 $\mu\text{g}/\text{l}$) (Rook 1978).

Chloroform werd in de volgende concentraties gevonden in voedingsmiddelen in Engeland in 1973: zuivelprodukten 1,4-33 mg/kg, vlees 1-4 mg/kg, olie en vetten 2-10 mg/kg, dranken 0,4-18 mg/kg en fruit en groente 2-18 mg/kg.
(McConnell et al 1975 naar IARC 1979)

Chloroform is aangetoond in menselijke weefsels (na de dood), in concentraties van 1-68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (nat weefsel).
(McConnell et al 1975 naar IARC 1979)

2. Monitoring

2.1 Omgevingsmonitoring

Een algemene methode ter bepaling van concentraties van gehalogeneerde koolwaterstoffen in werkplekatmosfeer is beschreven door NIOSH (1984). Deze methode berust op bemonstering van de betreffende stof m.b.v. koolbuisjes, desorptie van de geadsorbeerde stof door elutie met zwavelkoolstof, en analyse van het eluaat m.b.v. gaschromatografie met vlamionisatie-detectie.

Het beschreven bereik van de methode is 100 - 416 mg/m³, de laagst bepaalde hoeveelheid 0,01 mg per monster.

De precisie van de methode is 5,7%.

2.2 Biologische monitoring

Volgens Monster zijn er nog geen goede biologische monitoringsmethoden ontwikkeld die een goed verband aangeven met de blootstellingsdosis. Er moet gezocht worden naar parameters in de uitgeademde lucht en in het bloed (Monster 1973, Monster et al 1976, Monster en Zielhuis 1983).

3. Grenswaarden

- Nederland: - DGA/MAC-lijst, 1985
TGG 10 ppm (50 mg/m³)
- USA: - OSHA
TWA 50 ppm (250 mg/m³) 8 uur
- NIOSH 1981 (aanbeveling)
TWA 10 ppm (50 mg/m³) 8 uur
50 ppm (250 mg/m³) pieken van
10 min. toegestaan
- ACGIH/TLV-lijst, 1984/1985
TWA 10 ppm (50 mg/m³)
toevoeging:
A2 (verdacht carcinogeen voor mens).
- Duitsland: - DFG/MAK-lijst (1984)
10 ppm (50 mg/m³)
toevoeging:
III B (verdacht carcinogeen).
- USSR: - 1 ppm (IRPTC, 1984).

4. Kinetiek

4.1 Opname en verdeling

Algemeen

Chloroform wordt snel en goed opgenomen via de longen en het maag-darm-kanaal. Inhalatie is de hoofdroute voor de mens in werksituaties. Orale opname is belangrijk in verband met het voorkomen van chloroform in drinkwater en voedingsmiddelen. Opname via de huid is van belang bij contact met vloeistof (Davidson et al 1982).

Chloroform wordt verdeeld over alle lichaamsweefsels. Het passeert ook de placenta want het is gevonden in de foetale lever (Von Oettingen, 1964 naar Davidson et al, 1982).

Inhalatie

Tijdens narcose- (5000 ppm, minimum alveolaire concentration) wordt chloroform in menselijk weefsel in de volgende afnemende reeks aangetroffen: vetweefsel, hersenen, lever, nier en bloed (Steward et al, 1973 naar Davidson et al, 1982; Monster en Zielhuis, 1983).

Na inhalatie van ^{14}C -chloroform (3,6 mg (2,4 μl) in 10 minuten) is bij NMRI-muizen (sexe onbekend) de totale radioactiviteit gemeten na 0,15 en 120 minuten na de blootstelling (Cohen and Hood, 1969 naar Davidson et al, 1982). De maximale concentratie aan chloroform werd in bruin vet, lever, nier en long na respectievelijk 15 minuten, 120 minuten en later dan 120 minuten gemeten. De radioactiviteit in deze weefsels was 15; 6,7; 1,53 en 1,43 maal de radioactiviteit gemeten in het bloed.

Oraal

Na orale toediening van 0,5 g ^{13}C -chloroform wordt bij mensen snel na de toediening een stabiele isotoop gemeten in de uitgeademde lucht. In het bloed wordt na één uur het piekniveau aan radioactiviteit gemeten (Fry et al, 1972).

Brown en Taylor voerden whole-body autoradiography uit met de muizenrassen CF/LP, CBA en C57, Sprague-Dawley ratten en squirrel monkeys na een orale toediening van 60 mg/kg ^{14}C -chloroform (gavage).

1 uur na toediening werden pieken van radioactiviteit gemeten in het bloed van muizen en apen. Opvallend was dat in mannelijke muizen de hoogste gehalten aan chloroform en metaboliëten gevonden werden in de lever en de nier (vooral de niercortex).

Bij de vrouwelijke muizen werden de hoogste gehalten in de lever, de darmen en de blaas gevonden. In de nieren werd weinig radioactiviteit aangetoond. Dit sexeverschil werd alleen bij de muizen gevonden en niet bij de ratten en de apen. (Brown et al, 1974 en Taylor et al, 1974 naar Davidson et al, 1982).

Huid

Tsurata vond voor een geschoren huid van een muis in contact met vloeibare chloroform een opname van $39,2 \mu\text{g}$ (329 nmol)/min/cm² (Tsurata, 1975 en 1977 naar Davidson et al, 1982).

Invloed toedieningsweg

De toedieningsweg heeft invloed op de uiteindelijke verdeling van de stof. Na inhalatie van chloroform werd bij de NMRI-muis (sexe onbekend) het hoogste gehalte aan chloroform gevonden in het lichaamsvet (Cohen and Hood, 1969 naar Davidson et al, 1982). Na orale toediening van chloroform bij CF/LP, CBA en C57 muizen bevatten de lever en de nieren bij de mannelijke muizen en de lever bij de vrouwelijke muizen de hoogste gehalten aan chloroform (Brown et al; 1974 naar Davidson et al, 1982).

4.2 Omzetting en uitscheiding

Algemeen

Chloroform wordt alleen uitgescheiden via de longen. Omzetting van chloroform vindt plaats in de lever en in mindere mate in de nieren. Het eindprodukt dat bij de omzetting ontstaat is CO₂, wat grotendeels uitgeademd wordt. In de urine en de faeces worden bijna geen resten en/of metaboliëten aangetoond. Van Doorn (1985) meldt de aanwezigheid van chloride, ureum, CO₃²⁻ en OTZ in de urine. De omzetting van chloroform naar CO₂ vindt plaats via de cytochroom P-450-NADPH afhankelijke oxidatieweg. (Davidson et al, 1982; Smith et al, 1983; Ahmadizadeh et al, 1981 en Bergman, 1979).

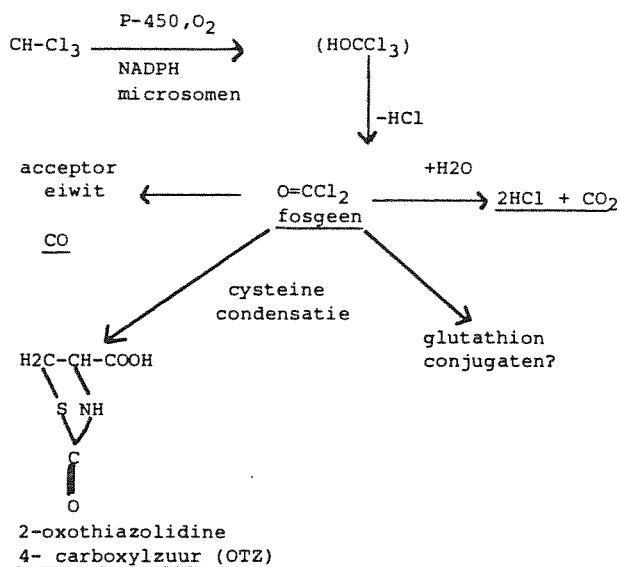
Fosgeen is in vitro aangetoond als intermediair bij de omzetting van chloroform naar CO₂ (Ahmadizadeh, 1981; Davidson et al, 1982; Smith et al, 1983 en Pohl et al, 1984).

Fosgeen is zeer reactief, het kan gehydrolyseerd worden tot CO₂ of het reageert met weefselmacromoleculen. Het gaat dan een irreversibele covalente binding aan. Deze binding zou te maken kunnen hebben met de schadelijke werking van fosgeen en dus chloroform. (Mansuy et al, 1977). Bij de omzetting van chloroform naar fosgeen is de C-H binding van groot belang. Het blijkt dat CDCl₃ minder snel wordt omgezet dan CHCl₃. De C-D binding is sterker en de verbreking ervan is de snelheidsbepalende stap (Branchflower et al, 1984).

Pohl et al toonden het verschil in omzetting tussen CHCl₃ en CDCl₃ kwantitatief aan door de ontstane hoeveelheid fosgeen af te vangen met cysteine en te meten als 2-oxothiazolidine 4-carboxylic zuur (OTZ) (Pohl et al 1984).

Tabel 1: Omzetting van CHCl_3 en CDCl_3 in fosgeen (gemeten als OTZ) door middel van nierhomogenaten van mannelijke DBA/ZJ muizen (Pohl et al, 1984).

substraat	COCl_2 als OTZ (nmol/mg eiwit/10 min)
CHCl_3	$5,62 \pm 0,07$
CDCl_3	$1,80 \pm 0,09$



Figuur 1 Oxidatieve afbraak van chloroform, volgens Davidson et al, 1982. De onderstreepte metaboliëten zijn geïdentificeerd.

Na orale toediening

Davidson et al (1982) en Bergman (1979) beschreven duidelijke verschillen tussen de omzetting van chloroform bij muizen, ratten en apen na een orale toediening van 60 mg/kg ^{14}C -chloroform (gavage).

Tabel 2: Uitscheiding van oraal toegediend $^{14}\text{CHCl}_3$ (60 mg/kg) in 48 uur in % van de beginhoeveelheid Davidson et al, 1982 en Bergman, 1979).

Dier	uitgeademd $^{14}\text{CHCl}_3$	uitgeademd $^{14}\text{CO}_2$	urine en faeces	totaal
muis CF/LP,CBA en C57stam	6,1	85,1	2,6	93,8
rat S-D	19,7	65,9	7,6	93,2
squirrel monkeys	78,7	17,6	2,0	98,3

Als we de uitgeademde hoeveelheid $^{14}\text{CO}_2$ als maat nemen voor het percentage omgezette $^{14}\text{CHCl}_3$ dan zijn er tussen muizen, ratten en apen grote verschillen in de omgezette hoeveelheid chloroform (Reitz, 1978).

Fry et al (1972) vonden in 8 mensen na een orale toediening van 500 mg ^{13}C -chloroform (in een gelatinecapsule) een gemiddelde uitademing van onveranderd $^{13}\text{CHCl}_3$ van 40,3%, met een range van 17,8-66,6% (8 uur na toediening). Bij 2 mensen werd na 8 uur respectievelijk 50,6 en 48,5% $^{13}\text{CO}_2$ gemeten (cumulatief).

Fry et al (1972) vonden ook een dosis afhankelijkheid in het percentage uitgeademde chloroform (zie tabel 3).

Tabel 3: percentage uitgeademde $^{13}\text{CHCl}_3$ na orale toediening bij mensen (Fry et al 1972)

Dosis (mg)	percentage uitgeademd in 8 uur (cumulatief)
100	0
250	12,4
500	40,3 (17,8-66,6)
1000	64,7

5. Effecten

5.1 Lokale effecten

Blootstelling van geschoren konijnenhuid aan vloeibare chloroform (1,2 en 4 g/kg) gedurende 24 uur, leidt tot necrose van de huid. Druppels chloroform in het oog van een konijn geven irritatie van de conjunctiva. (Torkelson et al 1976).

5.2 Systemische effecten

5.2.1 Kortdurende blootstelling

Inhalatie

Mannelijke Long-Evans ratten werden blootgesteld aan anesthesische concentraties chloroform.

Harrison en Manca vonden een afname van het leverglutathionniveau na een blootstelling van 0,30, 90 en 180 minuten bij met phenobarbital voorbehandelde ratten, respectievelijk 197, 128*, 69* en 27* µg/100 mg nat gewicht (*P<0,05). Bij ratten zonder phenobarbital voorbehandeling werd geen verlaging waargenomen: voor 0, 30, 90 en 180 minuten respectievelijk 223, 235, 201 en 208 µg/100 mg nat gewicht. (Harrison and Manca, 1979).

Brondeau et al stelden per dosis 8 mannelijke Sprague-Dawley ratten bloot aan 137, 292, 400, 618, 942 en 1075 ppm chloroform gedurende 4 uur. Bij de doses 292 ppm en hoger vonden ze een significante toename van glutamaat-dehydrogenase (GLDH) en sorbitol dehydrogenase (SDH).

Bij 137 ppm was de toename niet significant.

Concentratie CHCl ₃ (ppm)	GLDH(U/l)		SDH(U/l)	
	controle	test	controle	test
137	1,8	2,5	1,3	1,9
292	3,4	4,5*	1,1	1,8*
400	1,9	3,6*	1,2	1,5*
618	4,0	6,4*	1,2	2,9*
942	2,9	20,7*	0,7	4,4*
1075	2,8	9,6*	1,5	5,4

* P<0,02 (Student's t-test)

1 U = 1µmol/min

De gehalten glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) en glutamic pyruvic transaminase (GPT) veranderden niet (Brondeau et al 1983).

Oraal

Torkelson et al vonden bij mannelijke ratten een LD50 van 2000 mg/kg (doses 1,05-3,8 g/kg) (Torkelson et al, 1976).

De WHO (1979) noemt de volgende LD50 waarden voor muis en rat.

dier	stam	sexe	LD50 (mg/kg)
muis	Swiss	M	1664
		V	1919
	CBA	M	500- 768
		V	768-1200
	C57BL	M	250- 500
		V	500- 768
rat	Sprague-	M	1970
	Dawley	V	2440

Bowman et al vonden voor ICR muizen na een eenmalige toediening van chlo-rofom (gavage) een LD50 voor mannelijke muizen van 1120 mg/kg en voor vrouwelijke muizen van 1400 mg/kg (doses 500-4000 mg/kg).
(Bowman et al, 1978).

Groger en Grey gaven Colworth Wistar ratten 0,5-50 mg/kg chloroform (gavage). Ze stelden de ratten 1, 5 of 10 keer bloot.
Zij keken naar het effect van chloroform op 24 leverenzymen. Deze waren verdeeld in 4 groepen, namelijk enzymen uit de mitochondria, uit de lyso-somen en peroxisomen, uit de microsomen en uit de vloeibare fase uit de lever. Daarnaast is gekeken naar het cytochroom P-450 gehalte.
Zij vonden al veranderingen in enzymgehalten na 1 blootstelling bij de laagste dosis (0,5 mg/kg).
(Groger and Grey, 1979).

Intraperitoneaal

Na een éénmalige dosis chloroform (0, 148, 446 en 743 mg/kg; 0,1-0,3 en 0,5 ml/kg) namen Cornisch et al (1973) een dosis afhankelijke stijging waar van het serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) gehalte bij mannelijke Sprague-Dawley ratten. Bij met phenobarbital voorbehandelde ratten was de stijging groter.

Dosis (mg/kg)	SGOT (u/ml)	
	+phenobarbital	-phenobarbital
0	74	79
148	106	103
446	19850	187
743	47926	413

Gomez en Castro vonden geen binding van radioactief chloroform aan lever RNA en DNA bij mannelijke Sprague-Dawley ratten en mannelijk A/J muizen. De dieren kregen 5 mg/kg (10 ml oplossing; concentratie 22,72 µCi/ml en een specifieke activiteit van 5,4 Ci/mol) en 743 mg/kg (5 ml van een 10% CHCl₃ oplossing met een specifieke activiteit van 13,15 µCi/µmol).
De proef werd uitgevoerd met en zonder voorbehandeling van de dieren met

phenobarbital, 3 methyl-cholantreen en dimethylmaleaat.
(Gomez and Castro, 1980).

Pereira en Chang vonden bij de rattenstammen Osborne-Mendel, SpragueDawley en Fisher-344 en de muizenstammen Swiss (CFN), B6C3F1 en Swiss (SENCAR) een dosisafhankelijke binding van chloroform aan hemoglobine na orale toediening van 11,9 eg-11,9 mg/kg (0,1-100 emol/kg) (lineair verband) (Pereira and Chang 1982).

Ahmadizadeh et al vergeleken CHCl_3 en CDCl_3 ten aanzien van het optreden van lever- en nierschade bij mannelijke ICR-muizen. Voor de leverschade werd gekeken naar het serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT)-gehalte. Voor de nierschade werd in vivo gekeken naar het blood urea nitrogen (BUN) gehalte. In vitro werd de accumulatie in de niercortex gemeten van p-aminohippurate (PAH) en tetraethylammonium (TEA).

De muizen kregen 0-149-371-743-1114 en 1485 mg/kg (0-0,1-0,25-0,5-0,75 en 1 ml/kg) CHCl_3 of CDCl_3 (i.p.).

Bij toenemende dosis vonden de onderzoekers een significante verhoging van SGPT en BUN en een significante verlaging van PAH en TEA.

De effecten waren bij CDCl_3 minder sterk.

(Ahmadizadeh et al, 1981; zie ook Smith and Hook, 1983).

Savage et al vonden een verhoging van de ornithine decarboxylase activiteit (ODC) in nier en lever in mannelijke en vrouwelijke Fischer 344 albino ratten na één i.p. dosis van 750 mg/kg. De vrouwtjes bleken 2 tot 4 maal gevoeliger dan de mannetjes. Bij herhaalde blootstelling nam de stijging van de ODC-activiteit af. ODC wordt in dit artikel gezien als een moleculaire marker voor tumorpromotie.

(Savage et al, 1982; Pereira et al, 1984).

Lavigne et al keken naar de invloed van het toedieningstijdstip op het optreden van leverschade bij mannelijke Sprague-Dawley ratten na een i.p. dosis van 743 mg/kg (0,5 ml/kg) chloroform.

Als indicatie voor leverschade werden de gehalten aan serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), lactic dehydrogenase (LDH) in serum en glucose-6-phosphatase (G6Pase) in leverhomogenaat gemeten.

De ratten kregen chloroform of saline (controle) en werden 4 uur na de toediening gedood. De toediening vond plaats om 9.00 uur, 13.00 uur, 17.00 uur, 21.00 uur of 3.00 uur.

Na de toediening om 21.00 uur werden de grootste afwijkingen in de gehalten van de leverenzymen waargenomen.

SGPT: 126,2 t.o.v. 40,2 controle U/ml.

SGOT: 682,7 t.o.v. 122,4 controle U/ml.

LDH : 2348,0 t.o.v. 215,2 controle U/ml.

G6Pase: 6,90 t.o.v. 6,86 controle mg anorganisch P/g lever.

Om 21.00 uur begint de actieve periode van de ratten.

(Lavigne et al, 1983).

Smith et al stelden mannelijke en vrouwelijke ICR-muizen bloot aan chloroform i.p. en s.c. (subcutaan). De doses liepen van 743 tot 1485 mg/kg (50-1000 µl/kg).

Voor het optreden van nierschade werd gekeken naar de gehalten PAH, TEA en BUN. Voor het optreden van leverschade werd het SGPT-gehalte gemeten. Nierschade werd alleen bij mannelijke ICR-muizen gevonden. Bij beide sexen werd bij toenemende dosis een verhoogd SGPT-gehalte gemeten. Tussen beide manieren van blootstelling werd geen verschil waargenomen. (Smith et al, 1983).

Ahmadizadeh et al stelden mannelijke en vrouwelijke DBA-muizen en mannelijke C57BL/6J-muizen bloot aan een éénmalige i.p. dosis van 74,3-149-371 of 743 mg/kg (0,05-0,1-0,25 of 0,5 ml/kg).

Voor optredende nierschade werd gekeken naar PAH en TEA in de nier en BUN in het bloed. Voor leverschade naar SGPT.

Bij alle typen muizen werd bij toenemende dosis een verhoging van het SGPT-gehalte waargenomen. Bij vrouwelijke DBA-muizen trad totaal geen effect in de nieren op. Mannelijke DBA-muizen hadden meer nierschade dan mannelijke C57BL/6J-muizen. Vrouwelijke muizen bleken geschubte nierepitheelcellen te hebben en mannelijke muizen hoofdzakelijk kubusvormige nierepitheelcellen.

Dit verschil in morfologie is waarschijnlijk niet de oorzaak van het verschil in nierschade. Waarschijnlijk speelt testosteron een belangrijke rol. Vrouwtjes behandeld met testosteron vertoonden ook nierschade en gecastreerde mannetjes werden minder gevoelig voor blootstelling aan chloroform (Ahmadizadeh et al, 1984; Zie ook Smith et al, 1984 en Smith and Hook, 1983).

Capel et al stelden mannelijke Sprague-Dawley ratten 2, 4, 6 of 8 keer bloot aan met chloroform verzadigde lucht (3 minuten, ongeveer 200.000 ppm). Na elke blootstelling werd 1 uur gewacht met de volgende blootstelling.

Na 2 blootstellingen en meer trad een significante verhoging op van de lever- en plasma $-h-$ glucuronidase activiteit. Bij 4 en 8 blootstellingen was het uridine diphosphoglucuronic acid transferase significant verhoogd. Na 6 en 8 blootstellingen was het cytochroom P-450-gehalte significant verlaagd. (Capel et al, 1980).

Brondeau et al (1983) stelden mannelijke Sprague-Dawley ratten bloot aan 292 ppm chloroform (6 uur/dag, 2 of 4 dagen). Als indicatie voor het optreden van leverschade vonden ze na 2 dagen een significante verhoging van de GLDH, GOT en SDH-gehalten. Na 4 dagen was ook het GPT-gehalte significant verhoogd.

In Bijlage 1 staat een samenvatting van de effecten bij kortdurende blootstelling aan chloroform.

Samenvatting

Kortdurende blootstelling

Inhalatie

Bij ratten die 4 uur werden blootgesteld aan doses hoger dan 292 ppm trad

een toename op van het GLDH- en SDH-gehalte. Bij 137 ppm was de toename niet significant. Het GOT- en GPT-gehalte veranderde niet. In een ander onderzoek werden ratten blootgesteld aan 292 ppm, 6 uur per dag, 2 of 4 dagen lang. Er trad leverschade op.

Oraal

Bij ratten treedt na een éénmalige dosis van 0,5 mg/kg (gavage) verandering op in het gehalte van enkele leverenzymen.

Intraperitoneaal

Bij ratten en muizen treedt na i.p. toediening van 148-1485 mg/kg chloroform een verhoging op van het SGPT-gehalte en een verlaging van het PAH- en TEA-gehalte (nierschade). Er treedt een dosis-effect relatie op. Bij voorbehandelde dieren (b.v. met phenobarbital) is het effect van chloroform groter dan bij niet voorbehandelde dieren.

Bij ratten is het effect het grootst als toediening plaatsvindt aan het begin van de actieve periode (21.00 uur). Mannelijke ICR en DBA muizen vertonen nierschade, vrouwelijke muizen niet. Na toediening van testosteron treedt ook bij vrouwelijke muizen nierschade op.

Bij ratten vindt een stijging plaats van het ODC-gehalte (moleculairemarker voor tumorpromotie) na i.p.toediening van 750 mg/kg chloroform. Vrouwtjes zijn gevoeliger dan mannetjes. Na i.p. toediening van 5 en 743 mg/kg chloroform wordt bij ratten en muizen geen binding van chloroform aan DNA of RNA waargenomen.

Conclusie

Toediening van chloroform langs diverse routes heeft direct effecten op lever of nier tot gevolg bij rat en muis.

5.2.2 Langdurige blootstelling

5.2.2.1 Niet-carcinogene effecten

Inhalatie

Torkelson et al voerden inhalatieproeven uit met ratten, konijnen, cavia's en honden. De dieren werden blootgesteld aan 25, 50 en 85 ppm. Uit de resultaten blijkt dat bij een blootstelling van 25 ppm, 7 uur per dag, 5 dagen per week, 6 maanden lang in alle species nier- of leverschade optreedt.

Een duidelijke dosis effect relatie werd niet gevonden. Blootstelling aan 25 ppm (7u/dag) gaf lichte effecten te zien in alle soorten en was reversibel in de rat. Kortere blootstelling bij 25 ppm (1-4 uur) bij de rat was zonder effect. Inhalatie van 50 ppm (7u/dag) was zonder effect bij konijn en cavia. Volgens de auteurs werd dit veroorzaakt door het kleine aantal overlevende dieren, afwijkende controlegroepen en verschillende caviastammen.

(Torkelson et al, 1976).

In tabel 4 zijn de resultaten samengevat.

Tabel 4: Effecten op mannelijke (M) en vrouwelijke (V) ratten, konijnen, cavia's en honden na inhalatie van chloroform, 5 dagen/week gedurende 6 maanden (Torkelsen et al 1976).

Dier	uur/dag	25 ppm (122 mg/m ³)	50 ppm (244 mg/m ³)	85 ppm (416 mg/m ³)
Rat n = 10-12	1 2 4	geen effect	niet onderzocht	niet onderzocht
	7	M nier : toename relatief gewicht zwellend tubulus epitheel lever: lobulaire granulaire degeneratie, necrose V toename nier- en miltgewicht (microscopisch geen effect)	M pathologie zie 85 ppm afname lichaamsgewicht toename niergewicht V toename niergewicht (zwellend) lever: degeneratie	M pneumonitis lever: degeneratie nier: zwellend V geen pneumonitis lever: degeneratie nier: zwellend
Konijn n = 2-3	7	M nier : interstitiele en tubulaire nefritis V pneumonitis nier: nefritis lever: degeneratie en necrose	geen effect	M pneumonitis lever: vacuolevorming en necrose V lever: degeneratie en necrose nier: zwellend
Cavia n = 8-12	7	M lever: lobulaire granulaire degeneratie nier : interstitiele en tubulaire nefritis V lever: vacuolevorming	geen effect	V pneumonitis
Hond n = 1	7	M geen effect V nier: vergroting kapselruimte zwellend tubulus epitheel	niet onderzocht	niet onderzocht

Oraal

Osborne-Mendel ratten werden 5 maal per week en 78 weken lang via gavage blootgesteld aan chloroform (gemiddelde doses: M 90 of 180 mg/kg, V 100 of 200 mg/kg). Bij beide doses trad interstitiele fibrose op van de nier (bij M in meer gevallen dan bij de V).

B6C3 F1-muizen kregen bij hetzelfde blootstellingsregiem de volgende gemiddelde doses: M 138 of 277 mg/kg en V 238 of 477 mg/kg.

Bij 477 mg/kg werd bij vrouwelijke muizen thrombose van het hart (atrium) waargenomen (NCI, 1976).

Roe, Palmer, Heywood en medewerkers dienden muizen, ratten en honden oraal (by gavage) tandpasta toe met chloroform.

Muizen (n = 52).

Mannelijke en vrouwelijke ICI, C57BL, CBA en CF/1-muizen kregen 60 mg/kg/dag, 6 dagen/week en 80 weken lang. M ICI-muizen kregen ook 17 mg/kg/dag.

De CBA en C57BL-muizen werden na 104 weken gedood, de CF/1-muizen na 93 weken en de ICI muizen na 97 en 99 weken.

Naast het voorkomen van tumoren (zie paragraaf 5.2.2.2 carcinogene effecten) is gekeken naar veranderingen in orgaangewichten en vervetting van de lever. Er werden geen significante verschillen gevonden ten opzichte van de controlegroep (Roe et al, 1979).

Ratten (n = 25 en n = 50).

Sprague-Dawley-ratten zijn 6 dagen/week 52 weken, behandeld met 15, 75 en 165 mg/kg. Er is gekeken naar allerlei biochemische parameters zoals, SGPT, SGOT, plasma- en erythrocyten-cholinesterase en de hoeveelheid en verdeling van serumeiwitten.

Er werden geen significante verschillen waargenomen ten opzichte van de controlegroep.

Voor het eigenlijke carcinogeniteitsonderzoek werden de ratten blootgesteld aan 60 mg/kg/dag, 6 dagen/week en 80 weken lang. Na 95 weken werden de ratten gedood en onderzocht.

Het bleek dat de behandelde ratten beter overleefden dan de controlegroep.

Controlegroep en blootgestelde ratten vertoonden een hoge incidentie aan niet-neoplastische schade aan nier en ademhalingswegen.

Bij de blootgestelde vrouwtjes werd een verlaging van het plasma cholinesterase geconstateerd.

(Palmer et al, 1979).

Honden (n = 8).

Beagle honden zijn 6 dagen/week 7,5 jaar lang, behandeld met 15 of 30 mg CHCl₃/kg/dag. Er is gekeken naar veranderingen van orgaangewichten, naar veranderingen van de totale hoeveelheid serumeiwitten en de verdeling over de verschillende soorten. Ook is gekeken naar veranderingen in de SGPT-, SGOT- en GDH-gehalten en naar plasma- en erythrocyt cholinesterase gehalten.

Alleen het SGPT-gehalte was in de blootstellingsgroepen significant verhoogd ten opzichte van de controlegroep. Het grootste verschil trad op na 6 jaar, namelijk voor de 15 mg/kg groep, 95 t.o.v. 22 mU/ml en voor de 30 mg/kg groep, 138 t.o.v. 21 mU/ml. (Heywood et al, 1979).

Capel en Williams (1979) gaven mannelijke Sprague-Dawley ratten chloroform via het drinkwater (0,15 mg/kg en 15 mg/kg per dag, 14 dagen lang). Zij keken naar veranderingen in het cytochrome P-450-gehalte, het UDPGA-gehalte en de binding van DNA met ³H benzo(a)pyrene met of zonder toevoeging van 1,1,1 trichloropropene,2,3-oxide (TCPO). Zij vonden een significante afname van het cytochrome P-450-gehalte bij de dosis 15 mg/kg/dag en van het UDPGA-gehalte bij beide doses. Ze vonden een significante toename van de DNA-binding aan benzo(a)pyreen met toevoeging van TCPO.

dosis (mg/kg/d)	P-450 (nmol/mg eiwit)	DNA-binding aan benzo(a)pyreen	UDPGA (nmol/mg/min.)
		+TCPO (nmol/mg/min.)	
0	1,3 ± 0,08	66182 ± 8377	1,41 ± 0,30
0,15	1,2 ± 0,09	73934 ± 6258*	1,02 ± 0,08*
15	1,0 ± 0,09*	90970 ± 8469*	1,06 ± 0,25*

* P < 0,05.

Condie et al (1983) onderzochten lever- (SGPT-gehalte) en nierschade (BUN-gehalte) bij mannelijke CD-1 muizen na toediening van 37, 74 en 148 mg/kg/dag, 14 dagen lang. Bij de hoogste dosis (148 mg/kg) traden intra tubulaire mineralisatie en hyperplastische cytomegalie van het epitheel op in de nier. Het SGPT- en BUN-gehalte waren significant verhoogd bij de hoogste dosis.

dosis (mg/kg)	SGPT (I.U./l)	BUN (mg-%)
0	19 ± 3	24,0 ± 1,6
37	17 ± 1	21,9 ± 1,0
74	24 ± 4	21,9 ± 0,9
147	102 ± 31*	37,1 ± 4,5*

* P < 0,05.

In bijlage 2 staat een samenvatting van de effecten bij langdurige blootstelling aan chloroform.

Samenvatting

Langdurige blootstelling

Inhalatie

Ratten, konijnen en cavia's werden 6 maanden lang, 7 uur per dag blootgesteld aan 25, 50 of 85 ppm chloroform, honden alleen aan 25 ppm. Bij 25 ppm trad bij de ratten, konijnen en cavia's lever- en nierschade op (geen dosis-effect relatie). Bij de honden trad alleen leverschade op.

Oraal

Ratten werden 78 weken lang blootgesteld aan chloroform (gavage). De mannetjes kregen 90 of 180 mg/kg/d en de vrouwtjes 100 of 200 mg/kg/d (5 dagen/week). Bij beide doses en beide sexen trad nierschade (interstitiële fibrose) op. Ratten 52 weken, 6 dagen/week, blootgesteld aan 165 mg/kg/d vertoonden geen significante verschillen ten opzichte van een controlegroep.

Ratten die 80 weken, 6 dagen/week werden blootgesteld aan 60 mg/kg/d overleefden beter dan een controlegroep.

Bij ratten 14 dagen blootgesteld aan 0,15 of 15 mg/kg/d via het drinkwater trad een significante verhoging op van het UDPGA-gehalte en de binding van chloroform aan DNA. Bij 15 mg/kg was het cytochroom P-450 gehalte significant verlaagd.

Bij vrouwelijke muizen trad bij een dosis van 477 mg/kg/d, 5 dagen/week, na 78 weken, thrombose van het hart (atrium) op.

Bij verschillende muizenstammen werden bij een dosis van 60 mg/kg/d (6 dagen/week) na 80 weken geen significante verschillen waargenomen ten opzichte van een controlegroep. Het SGPT- en BUN-gehalte was significant verhoogd bij muizen die 14 dagen lang blootgesteld waren aan 148 mg/kg/dag. Bij 74 en 148 mg/kg/dag was het PAH-gehalte significant verlaagd.

Na een blootstelling van 7,5 jaar aan 15 of 30 mg/kg/d, 6 dagen/week, werd bij honden bij beide doses een verhoging van het SGPT-gehalte waargenomen.

Conclusie

Inhalatie van 25 ppm chloroform bij een drietal species gedurende lange tijd had lichte effecten tot gevolg op lever en nier. Er is hier dus sprake van een effect-niveau van 25 ppm.

5.2.2.2 Carcinogene effecten

De NCI heeft een studie laten uitvoeren bij Hazleton Laboratories met ratten en muizen. De dieren werden 5 dagen per week en 78 weken lang blootgesteld aan chloroform in maisolie (via gavage).

De dieren kregen de volgende gemiddelde doses:

Osborne-Mendel rat (n=50)	M 90 of 180 mg/kg/dag
	V 100 of 200 mg/kg/dag
B6C3F1 muis (n=50)	M 138 of 277 mg/kg/dag
	V 238 of 477 mg/kg/dag

Het werkelijke blootstellingsregime staat in bijlage 3.

Bij de studie werden twee soorten controlegroepen onderscheiden:

matched: dieren waren zoveel mogelijk vergelijkbaar met proefdieren (stam, afkomst). Ze waren gehuisvest in dezelfde ruimte als de blootgestelde dieren en werden op dezelfde manier behandeld. Ze kregen dezelfde hoeveelheid drager (maisolie) toegediend.

colony: bevat de matched groepen van chloroform en van andere chemicaliën die tegelijkertijd werden getest. Ze werden hetzelfde behandeld als de matched controle. Met deze behandeling werd binnen 3 maanden na het starten van de blootstellingsperiode gestart.

Er is gekeken naar het voorkomen van alle soorten tumoren bij de ratten na 111 weken en bij de muizen na 92 weken.

De NCI concludeerde dat bij mannelijke ratten (beide doses) de incidentie van niertumoren significant verhoogd was ($P=0,0016$). Bij de vrouwelijke ratten was de incidentie van thyroid tumoren significant verhoogd bij beide doses ($P < 0,05$). Door het voorkomen van 2 typen schildklier tumoren, follicular cel type en C-cel type, de wisselende achtergrond incidentie van deze tumoren in deze rattestam en een verlaging bij de mannetjes en verhoging bij de vrouwtjes na blootstelling, concludeerde de NCI dat de thyroid tumoren niet biologisch significant waren.

Bij de muizen was bij beide sexen de incidentie van levertumoren significant verhoogd (beide doses, $P < 0,001$).

In tabel 5 is een samenvatting van de resultaten gegeven (NCI, 1976).

Tabel 5. Tumorincidentie in ratten en muizen in de NCI-studie (1976) na orale toediening

Osborne-Mendel rat		tumorincidentie		
sexe	dosis (mg/kg)	lever	nier	schildklier
M	0 (colony)	1/99 (1%)	0/99 (0%)	8/99 (8%)
	0 (matched)	0/19 (0%)	0/19 (0%)	4/19 (21%)
	90	0/50 (0%)	4/50 (8%)*	3/49 (6%)
	180	1/50 (2%)	12/50 (24%)*	4/48 (8%)
V	0 (colony)	0/98 (0%)	0/98 (0%)	1/98 (1%)
	0 (matched)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	1/19 (5%)
	100	0/49 (0%)	0/49 (0%)	8/49 (16%)*
	200	0/48 (0%)	2/48 (4%)	10/46 (22%)*

B6C3F1 muis		tumorincidentie		
sexe	dosis (mg/kg)	lever	nier	schildklier
M	0 (colony)	5/77 (6%)	1/77 (1%)	0/77 (0%)
	0 (matched)	1/18 (6%)	1/18 (6%)	0/17 (0%)
	138	18/50 (36%)*	1/50 (2%)	0/48 (0%)
	277	44/45 (98%)*	2/45 (4%)	0/43 (0%)
V	0 (colony)	1/80 (1%)	0/80 (0%)	0/80 (0%)
	0 (matched)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
	238	36/45 (80%)*	0/45 (0%)	0/41 (0%)
	477	39/41 (95%)*	0/40 (0%)	0/36 (0%)

* significant verhoogd t.o.v. beide controlegroepen

Jorgenson et al (1985) stelden vergelijkbaar met de NCI-studie mannelijke Osborne-Mendel ratten en vrouwelijke B6C3F1 muizen via het drinkwater bloot aan chloroform. De doseringen waren voor de rat 0-160 mg/kg/dag en voor de muis 0-263 mg/kg/dag.

Net zoals bij de NCI-studie kon een verhoogde incidentie van niertumoren worden vastgesteld bij de mannelijke rat (zie onderstaand overzicht).

dosis (mg/kg/dag)	aantal tumordragende dieren/ totaal aantal dieren (%)
0	5/301 (2)
19	6/313 (2)
38	7/148 (5)
81	3/48 (6)
160	7/50 (14%)*

* p < 0,01

De niertumoren bestonden hoofdzakelijk uit tubulusceladenomen en adenocarcinomen. Nefropathie kwam in alle groepen (inclusief controle) in hoge mate voor (90-100%).

In tegenstelling tot de NCI-studie kon echter geen statistisch significante verhoging van de levertumorincidentie worden vastgesteld bij de vrouwelijke muizen (controle 53%, blootgestelde groepen 34-63%).

Tumasonis et al (1985) stelden mannelijke en vrouwelijke Wistar-ratten gedurende het gehele leven ook bloot aan chloroform bevattend drinkwater (concentratie 2900 mg/l). Op grond van een grafische weergave kan de dagelijkse dosis van de mannelijke dieren geschat worden op gemiddeld 150-200 mg/kg en voor de vrouwelijke dieren op gemiddeld 200-250 mg/kg. Tumorincidentie is weergegeven in onderstaand overzicht, waarin tevens het voorkomen van neoplastische knobbeltjes en leveradenofibrose is weergegeven.

effect	mannelijke dieren		vrouwelijke dieren	
	controle	blootgesteld	controle	blootgesteld
leverknobbeltjes	5/22 (23%)	5/28 (18%)	0/18 (0%)	10/40 (25%)***
leveradenofibrose	0/22 (0%)	17/28 (61%)*	0/18 (0%)	34/40 (85%)*
lymfosarcoom	14/22 (64%)	6/28 (21%)**	2/18 (11%)	4/40 (10%)
hypofysetumor	1/22 (5%)	2/28 (7%)	6/18 (33%)	1/40 (3%)**
borstkliertumor	-	-	8/18 (44%)	0/40 (0%)*

* p < 0,001
 ** p < 0,01
 *** p < 0,03

Een hepatocellulair carcinoom werd slechts vastgesteld in één mannelijke rat en één vrouwelijke rat in de experimentele groep (in beide controle-groepen niet).

Ook werden een nieradenoom en een nieradenocarcinoom gezien bij de mannelijke blootgestelde dieren (controle nul). Opvallend is echter het sterk verhoogde voorkomen van leveradenofibrose bij beide sexen en een verhoogde incidentie van leverknobbeltjes bij de vrouwelijke dieren die blootgesteld waren.

Roe et al (1979), Palmer et al (1979) en Heywood et al (1979) stelden muizen, ratten en honden bloot aan chloroform in tandpasta (gavage). Als controlegroepen werden dieren gebruikt die onbehandeld waren of alleen drager (tandpasta) kregen.

Voor de muizenstudie werden mannelijke en vrouwelijke muizen (n=52) gebruikt van de stammen C57BL, CBA, CF/1 en ICI. De muizen kregen 60 mg CHCl₃/kg/dag, 6 dagen/week, 80 weken lang. Mannelijke ICI-muizen kregen ook een dosis van 17 mg/kg/dag.

Na 93 tot 104 weken zijn de muizen gedood en onderzocht op het voorkomen van tumoren in de lever, longen, nieren, lymfklieren, borst, testis en maag. Daarnaast zijn alle andere gezwellen onderzocht.

Alleen mannelijke ICI-muizen met een dosis van 60 mg/kg/dag hadden een verhoogde incidentie van niertumoren.

Bij een dosis van 17 mg/kg/dag werd geen verhoging waargenomen.

Bij vrouwelijke ICI-muizen en de andere stammen werd geen verhoogde tumorincidentie waargenomen (Roe et al, 1979).

Mannelijke en vrouwelijke Sprague-Dawley ratten (n=50) werden blootgesteld aan 60 mg CHCl_3 /kg/dag, 6 dagen/week en 80 weken lang.

Na 95 weken zijn alle geobserveerde tumoren en gezwellen histopathologisch onderzocht.

De blootgestelde ratten overleefden beter dan de beide controlegroepen (drager en onbehandeld).

Bij de blootgestelde dieren werd geen significante toename van de tumorincidentie waargenomen ten opzichte van de controlegroepen (Palmer et al, 1979).

Mannelijke en vrouwelijke Beagle honden (n=8) werden 7,5 jaar lang, 6 dagen/week blootgesteld aan 15 en 30 mg/kg/dag. Er waren 3 controlegroepen (onbehandeld, drager (tandpasta) en een andere tandpasta).

20 tot 24 weken na het stoppen van de blootstelling werden de honden onderzocht op het voorkomen van tumoren en gezwellen.

Volgens Heywood et al (1979) konden de voorkomende tumoren niet gerelateerd worden met de blootstelling aan chloroform (er waren geen nier- en levertumoren).

Het totaal aantal gezwellen was als volgt:

dosis (mg/kg)	totaal aantal gezwellen			
	M	plaats	V	plaats
0 (onbehandeld)	1/7 (14%)	testis	0/5 (0%)	-
0 (drager)	0/15 (0%)	-	4/12 (33%)	schildklier, bijnier, borstklier
15	4/7 (57%)	long, testis, schildklier	4/8 (50%)	huid, borst- klier, ovarium
30	2/7 (29%)	huid, milt	0/8 (0%)	-

Reuber (1979) heeft de histologische coupes van de NCI-studie (1976) opnieuw bestudeerd en beoordeeld. Van de studies van Roe et al (1979), Palmer et al (1979) en Heywood et al (1979) heeft Reuber (1979) de laboratoriumgegevens (raw data) bestudeerd en beoordeeld.

NCI-studie (1976)

Reuber (1979) vindt bij de mannelijke ratten een significante toename van het aantal levertumoren bij de hoogste dosis (180 mg/kg) en bij de vrouwelijke ratten bij beide doses (100 en 200 mg/kg).

Bij mannelijke ratten vindt Reuber net als het NCI een significante toename van het aantal niertumoren bij beide doses. Reuber vindt een sterkere toename van het aantal schildkliertumoren dan het NCI bij vrouwelijke ratten. Reuber heeft echter minder dieren bekeken (39 i.p.v. 49).

Bij de muizen vindt ook Reuber een significante verhoging van het aantal levertumoren bij beide sexen.

De conclusies van Reuber staan vermeld in tabel 6.

Tabel 6. Tumorincidentie in ratten en muizen in de NCI-studie (1976) volgens Reuber (1979)

Osborne-Mendel rat		tumorincidentie		
sexe	dosis (mg/kg)	lever	nier	schildklier
M	0 (onbehandeld)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	1/20 (5%)
	0 (drager)	2/19 (11%)	0/19 (0%)	4/19 (21%)
	90	5/50 (10%)	6/50 (12%)*	3/50 (6%)
	180	12/49 (24%)*	12/49 (25%)*	7/49 (14%)
V	0 (onbehandeld)	1/20 (5%)	niet	3/20 (15%)
	0 (drager)	2/20 (10%)	weergegeven	1/20 (5%)
	100	10/39 (26%)*	door Reuber	11/39 (28%)*
	200	20/39 (51%)*		12/39 (31%)*
B6C3F1 muis		tumorincidentie		
sexe	dosis (mg/kg)	lever	lymfevaten	
M	0 (onbehandeld)	3/17 (18%)	0/17 (0%)	
	0 (drager)	2/17 (12%)	0/17 (0%)	
	138	31/46 (67%)*	14/46 (30%)*	
	277	44/44 (100%)*	10/44 (23%)*	
V	0 (onbehandeld)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	
	0 (drager)	0/19 (0%)	0/19 (0%)	
	238	41/45 (91%)*	9/45 (20%)*	
	477	40/40 (100%)*	4/40 (10%)	

* significant verhoogd t.o.v. beide controlegroepen.

Studies Roe et al, Palmer et al en Heywood et al (1979)

Reuber (1979) is het eens met de conclusies ten aanzien van de tumorincidentie bij muizen en ratten (Roe et al 1979 en Palmer et al 1979). Bij de honden concludeert hij echter dat er wel een significante toename is van het totaal aantal gezwellen bij blootgestelde honden. Hij trekt deze conclusie aan de hand van de volgende gegevens van Heywood et al (1979).

dosis (mg/kg)	totaal aantal gezwellen (lokatie niet gegeven)		
	M	V	M + V
0 (onbehandeld)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/16 (0%)
0 (drager)	0/16 (0%)	2/16 (13%)	2/32 (6%)
15	1/8 (13%)	3/8 (38%)	4/16 (25%)
30	2/8 (25%)	0/8 (0%)	2/16 (13%)
15 + 30	3/16 (19%)	3/16 (19%)	6/32 (19%)

In bijlage 4 is een samenvatting gegeven van de carcinogeniteit bij dieren na orale toediening van chloroform.

Samenvatting

Carcinogeniteit

Oraal

Ratten kregen 78 weken (5 dagen/week) chloroform (mannetjes 90 of 180 mg/kg/d, vrouwtjes 100 of 200 mg/kg/d). Na 111 weken was er bij de mannetjes een significante verhoging van de niertumorincidentie bij beide doses (respectievelijk 8% (90 mg/kg) en 24% (180 mg/kg) t.o.v. 0% (controle)).

Bij de vrouwtjes was de thyroïd tumorincidentie significant verhoogd bij beide doses (respectievelijk 16% (100 mg/kg) en 22% (200 mg/kg) t.o.v. 5% (controle)).

Ratten werden 80 weken lang, 6 dagen/week blootgesteld aan 60 mg/kg/d. Na 95 weken was er geen verhoging van de tumorincidentie t.o.v. de controlegroep.

Muizen kregen 78 weken, 5 dagen/week 138 of 277 mg/kg/d (M) en 238 of 477 mg/kg/d (V). Na 92 weken trad bij beide sexen en beide doses een significante verhoging op van de lever tumorincidentie. Bij de mannetjes respectievelijk 36% (138 mg/kg) en 98% (277 mg/kg) t.o.v. 6% (controle) en bij de vrouwtjes respectievelijk 80% (238 mg/kg) en 95% (477 mg/kg) t.o.v. 0% (controle).

Mannelijke ICI muizen kregen 17 of 60 mg/kg/d, 6 dagen/week en 80 weken lang. Bij de dosis van 60 mg/kg was de niertumorincidentie significant verhoogd, bij 17 mg/kg werd geen verhoging geconstateerd.

Honden werden 7,5 jaar lang blootgesteld aan 15 of 30 mg/kg/d, 6 dagen/week. 24 weken na het stoppen van de blootstelling was er geen verhoging van de tumorincidentie t.o.v. een controlegroep.

Conclusie

Door Reuber (1979) zijn de gegevens van de hier beschreven carcinogeniteitsstudies opnieuw bekeken en geëvalueerd. Hoewel Reuber op bepaalde punten tot afwijkende incidenties en conclusies komt, blijft de strekking van de uitkomsten m.b.t. de gevonden carcinogene werking van chloroform ongewijzigd. Met name kan gesteld worden dat de carcinogene werking dan tot uiting komt wanneer toxische doseringen in het geding zijn. In dit licht zal de carcinogene werking van chloroform gezien moeten worden.

5.2.2.3 Epidemiologie

Inhalatie

Chloroform was het belangrijkste anestheticum van 1930 tot na de tweede wereldoorlog.

Linde en Mesnick hebben gekeken naar de doodsoorzaken van anesthesisten uit die periode in Amerika.

Het aantal sterfgevallen door kanker (vooral in maag-darmkanaal) was hoger bij anesthesisten dan bij andere doktoren (niet blootgesteld aan chloroform). Daarnaast was het aantal sterfgevallen door kanker onder anesthesisten groter in het chloroformtijdperk dan daarna. Een probleem bij deze studie is dat chloroform één van de gebruikte anesthetica was en dat geen rekening gehouden werd met omgevings- en sociaal-economische factoren (Linde and Mesnick, 1980 volgens Davidson et al, 1982).

Phoon et al (1983) vonden dat 31 mensen uit Singapore die volgens de eerste diagnose aan virale hepatitis (geelzucht) leden, allemaal blootgesteld waren aan chloroform tijdens hun werk. In het artikel wordt niet aangegeven of het om vrouwen of mannen gaat. Het betreft twee groepen arbeiders.

De eerste groep bestaat uit 13 werknemers uit één fabriek die tussen oktober 1973 en juli 1974 geelzucht kregen. 11 van de 13 klaagden over gebrek aan eetlust, misselijkheid en braken.

Op de afdeling waar deze mensen werkten werd een ontvettingsmiddel gebruikt dat voor 99,5% uit chloroform en voor 0,5% uit ethylalcohol bestond. Andere chemicaliën werden op de betreffende afdeling niet gebruikt. In de lucht op de afdeling werden gehalten aan chloroform gemeten van meer dan 400 ppm. Bij geen van de slachtoffers was er een duidelijke andere aanwijzing voor het ontstaan van geelzucht (medicijngebruik, familiegegevens, etc.). Van 5 personen die geelzucht hadden gehad en 4 andere die op de afdeling werkten werden bloedmonsters genomen. Het chloroformgehalte lag in de range van 1-2,9 mg/l.

In het tweede geval ging het om 18 werknemers van 1 fabriek die in de periode van mei 1980 tot oktober 1981 geelzucht kregen.

Op de afdeling waar zij werkten werd chloroform gebruikt in een kleefmiddel. In de lucht werden concentraties gemeten van 14,4 tot 50,4 ppm.

Ook hier is het chloroformgehalte in het bloed gemeten. Op dat moment werkte slechts 1 arbeider met chloroform. Het bloed van deze arbeider en van 4 anderen bevatte geen chloroform (detectielimiet onbekend).

In beide voorbeelden waren de arbeiders korter dan 5 maanden aan chloroform blootgesteld toen de geelzucht optrad (merendeel 1 maand of korter) (Phoon et al, 1983).

Bomski et al (1967) beschreven de werking van chloroform ($10-1000 \text{ mg/m}^3$) op 68 arbeiders in een farmaceutische fabriek waar de stof als oplosmiddel werd toegepast. De blootstellingsduur was 1-4 jaar. Van de blootgestelde arbeiders had 25% een vergrote lever (21% leververvetting en 6% toxische hepatitis).

Bij vroeger blootgestelde employees (39 p) was dat 13% en in een tweetal controlegroepen 9 en 4% (23 resp. 165 p). Op grond hiervan (en met gegevens uit klinisch-chemische bepalingen in bloed en serum) kwamen de auteurs tot de conclusie dat blootstelling aan chloroform toxische leverschade veroorzaakt. In kwantitatief opzicht (blootstelling, omvang van cohorten) kunnen uit het artikel geen onderbouwde conclusies worden getrokken. In kwalitatief opzicht echter lijkt er een relatie te zijn tussen blootstelling en leverschade.

Samenvatting

Epidemiologie

In de V.S. was het aantal sterfgevallen van anesthesisten aan maag- en darmkanker groter in het tijdperk dat chloroform als anestheticum gebruikt werd dan daarna. Het is belangrijk op te merken dat het hier blootstelling betrof aan meerdere anesthetica.

31 arbeiders in Singapore die aan geelzucht leden bleken allemaal tijdens hun werk blootgesteld te zijn aan chloroform. Het betrof twee fabrieken waar respectievelijk 13 mensen waren blootgesteld aan 400 ppm of meer en 18 mensen aan 14,4 tot 50,4 ppm chloroform. Of dit de werkelijke blootstellingsdoses waren is niet te achterhalen omdat de metingen later waren verricht. Het merendeel van de mensen werkte minder dan 1 maand op de betreffende afdeling.

Arbeiders in een farmaceutische fabriek vertoonden verhoogde incidentie van leververvetting en toxische hepatitis.

Conclusie

Epidemiologisch onderzoek lijkt te wijzen op een verband tussen lever- schade en o.a. blootstelling aan chloroform.

In bijlage 5 staat een overzicht van de epidemiologische gegevens.

5.2.3 Reproductie

Inhalatie

Land et al (1981) stelden mannelijke (C57B1 x 3HF) muizen bloot aan 400 en 800 ppm chloroform gedurende 5 dagen, 4 uur/dag. 28 dagen na de eerste blootstelling onderzochten ze de spermatozoïden op morfologische afwijkingen. De spermatozoïden waren afgeplat, amorf of hadden abnormale hoeken ten opzichte van de normale spermatozoïden. Ze vonden een significante toename van het aantal morfologische afwijkingen bij beide doses ten opzichte van de controlegroep.

Dosis % abnormale spermatozoïden
(ppm)

0	1,42 ±0,08
400	2,76 ±0,31*
800	3,48 ±0,66*

* P < 0,01

Bevruchte vrouwelijke CF-1 muizen werden blootgesteld aan 100 ppm chloroform (7 uur/dag) tijdens verschillende fasen van de zwangerschap. Murray et al (1979) stelden drie groepen muizen op verschillende dagen van de zwangerschap bloot (dag 1-7, 6-15 of 8-15). Blootstelling bleek toxisch zowel voor het moederdier als voor de foet/embryo, hetgeen bleek uit het verloop van de dracht. Het aantal zwangerschappen werd vastgesteld na 18 dagen.

CHCl ₃ (ppm)	Aantal dieren zwanger/gedekt (% zwanger)		
	dag 1-7	dag 6-15	dag 8-15
0	26/35 (74%)	31/34 (91%)	26/40 (65%)
100	15/34 (44%)*	15/35 (43%)*	24/40 (60%)

* P < 0,05

Murray et al (1979) stelden bevruchte CF-1 muizen bloot aan 100 ppm chloroform, 7 uur/dag op verschillende tijdstippen tijdens de zwangerschap (dag 1-7, dag 6-15 of dag 8-15). Op dag 18 van de zwangerschap werden de foeten onderzocht.

In alle groepen trad een verminderde botvorming op van de beenderen (niet sign.).

In de 8-15 groep nam het aantal foeten met een gespleten gehemelte significant toe. Het aantal resorpties nam in de dag 1-7 groep significant toe. In de groepen 1-7 en 8-15 nam het foetale lichaamsgewicht significant af (Murray et al, 1979).

Schwetz et al (1974) stelden bevruchte vrouwelijke Sprague-Dawley ratten bloot aan 30, 100 en 300 ppm chloroform (7 uur/dag), tijdens de dagen 6 tot 15 van de zwangerschap. Op dag 21 werd het aantal zwangerschappen bepaald.

Zij vonden een significante afname van het aantal zwangerschappen bij een dosis van 300 ppm, mede ten gevolge van een verhoogde resorptie. De auteurs vinden chloroform embryotoxisch.

CHCl ₃ (ppm)	Aantal dieren zwanger/gedekt (% zwanger)	resorpties/ inplantaties (%)
0	68/77 (88%)	63/769 (8)
30	22/31 (71%)	24/291 (8)
100	23/28 (82%)	16/278 (6)
300	3/20 (15%)*	20/33 (61%)*

* P < 0,05

Bevruchte Sprague-Dawley ratten werden tijdens de dagen 6 tot 15 van de zwangerschap blootgesteld aan 30, 100 en 300 ppm chloroform (7 uur/dag). Op dag 21 van de zwangerschap werden de foeten op aangeboren afwijkingen onderzocht.

Bij de 30 ppm-groep trad een significante vertraging op in de botvorming van de schedelbeenderen en kwam het ontbreken van ribben vaker voor.

Bij de 100 ppm-groep was het aantal foeten met geperforeerde anus, afwezigheid van de staart, onderhuidse ophoping van vocht, niet aanwezige ribben en een vertraagde botvorming van het borstbeen significant groter dan in de controlegroep.

Het aantal foeten in de 300 ppm-groep was zo klein dat de opgetreden veranderingen niet significant waren (Schwetz et al, 1974).

Oraal

Na orale toediening van chloroform tijdens de zwangerschap bij Sprague-Dawley ratten en Dutch-Belted konijnen trad geen afname van het aantal zwangerschappen en foeten op.

De ratten (n=22) kregen van dag 6 tot dag 15 van de zwangerschap 20, 50 en 126 mg CHCl₃/kg/dag (in 2 doses per dag). Op dag 20 werd het aantal zwangerschappen vastgesteld. De konijnen (n=15) kregen van dag 6 tot dag 18 van de zwangerschap 20, 35 en 50 mg CHCl₃/kg/dag. Op dag 29 werd het aantal zwangerschappen vastgesteld (Thompson et al, 1974).

Bevruchte Sprague-Dawley ratten kregen 20, 50 of 126 mg CHCl₃/kg/dag (gavage; in 2 porties/dag) tijdens de dagen 6-15 van de zwangerschap. Op dag 20 werden de foeten onderzocht.

Bevruchte Dutch-Belted konijnen kregen 20, 35 of 50 mg/kg/dag (gavage) op de dagen 6-18 van de zwangerschap. Op dag 29 van de zwangerschap werden de foeten onderzocht.

Bij de ratten was er bij de hoogste dosis sprake van effecten op het moederdier (lever- en nierschade).

Bij de konijnen traden deze effecten op bij een dosis van 100 mg/kg/dag. In beide gevallen werd bij de hoogste dosis een significante vermindering van het foetale gewicht geconstateerd. Aangeboren afwijkingen zijn niet waargenomen (Thompson et al, 1974).

Ruddick et al gaven bevruchte ratten 100, 200 en 400 mg CHCl₃/kg/dag tijdens de dagen 6-15 van de zwangerschap. Alle dosisniveaus waren toxisch voor het moederdier: het lichaamsgewicht en enkele orgaangewichten namen af, ook enkele biochemische en bloedparameters veranderden.

De schade aan de foeten is waarschijnlijk voor een deel toe te schrijven aan de toxische gevolgen voor het moederdier (Ruddick et al, 1980 naar Davidson et al, 1982).

In bijlage 6 is een samenvatting gegeven over de effecten van chloroform op de reproductie.

Samenvatting

Reproductie

Het aantal morfologische afwijkingen bij spermatozoïden van muizen nam significant toe bij een blootstelling van 400 en 800 ppm, 4 uur/dag, 5 dagen lang.

Bij gedekte vrouwelijke muizen, die blootgesteld werden aan 100 ppm chloroform (7 uur/dag), nam het aantal zwangerschappen significant af als de blootstelling plaatsvond op de dagen 1-7 of 6-15 van de zwangerschap. Bij blootstelling op de dagen 8-15 was dit niet het geval. Hier werd echter een significante toename van gespleten gehemelten geconstateerd.

Bij gedekte vrouwelijke ratten nam het aantal zwangerschappen significant af als ze werden blootgesteld aan 300 ppm, 7 uur/dag, op de dagen 6-15 van de zwangerschap. Bij 30 ppm werd een vertraagde botvorming en afwezigheid van ribben geconstateerd.

Na orale toediening van chloroform aan ratten (maximaal 126 mg/kg/dag) en konijnen (maximaal 50 mg/kg/dag) tijdens de dagen 6-15 respectievelijk 6-18 van de zwangerschap, werd geen afname van het aantal zwangerschappen geconstateerd. Wel constateerde men een significante afname van het foetale gewicht.

Zwangere ratten werden blootgesteld aan 100, 200 of 400 mg/kg/dag tijdens de dagen 6-15 van de zwangerschap. Alle doses waren toxisch voor het moederdier waardoor niet duidelijk werd of chloroform een teratogene werking had.

Conclusie

Genoemde effecten op de reproductie komen voor in een aantal gevallen bij doseringen welke reeds toxisch zijn voor het moederdier, of waar een dergelijke toxiciteit te verwachten valt.

De effecten van chloroform op de reproductie van ratten en muizen kunnen in verband worden gebracht met de effecten op het drachtige moederdier.

5.3 Genotoxische effecten

5.3.1 In vitro testen

5.3.1.1 Prokaryoten

Chloroform is getest in verschillende E.coli systemen

Teststelsysteem	mutageen/niet mutageen*
- E.coli rec ⁻	2/6 mutageen)-S9 4/6 niet mutageen)
- Differential killing E.coli WP2, WP67 en CM871	niet mutageen
- DNA polymerase Deficient, E.coli W3110 (Pol A ⁺)	niet mutageen -S9
P3478 (Pol A ₁ ⁻)	zwak mutageen +S9

* Serres and Ashby, 1981

Kirkland et al hebben chloroform getest op mutageniteit met de E.coli stammen WP 2p en WP ZuvrA, met en zonder activatie. Chloroform was niet mutageen (Kirkland et al, 1981).

Verscheidende auteurs vonden bij de Ames-test met of zonder activatie dat chloroform niet mutageen was bij de S.Typhimurium stammen TA1535, TA100, TA1538, TA98, TA1537 en TA92 (Uehleke et al, 1977; Gocke et al, 1981; Serres and Ashby, 1981; Simmon et al, 1982 en Van Abbé et al, 1982).

Zie voor meer gegevens tabel 12.

5.3.1.2 Eukaryoten

Zoogdiercellen

Sturrock stelde geïsoleerde fibroblast longcellen van een chinese hamster gedurende 24 uur bloot aan 10.000 tot 25.000 ppm chloroform. Hij vond geen mutageen effect (Sturrock, 1977).

White et al stelden chinese hamster ovariumcellen bloot aan 7100 ppm chloroform. Na 1 uur blootstelling vonden ze geen significante toename van de Sister Chromatid Exchanges (White et al, 1979).

Kirkland et al stelden geïsoleerde menselijke lymphocyten (geactiveerd met S9) bloot aan chloroform (50, 100, 200 en 400 µg/ml). Ze vonden geen verhoging van het aantal chromosoombreuken. Ook de Sister Chromatid Exchange nam niet toe (Kirkland et al, 1981).

Tabel 12: Mutageniteitstesten van chloroform in bacterie-systemen

Bact. stam	S9	Hoeveelheid CHCl ₃	mutageen (wel/niet)	Bron
- E.coli rec-	-		2/6 wel 4/6 niet	
- E.coli WP2, WP67, CM871	+/-		niet	
- E.coli W3110, P3478	-		niet	Serres and Ashby, 1981
	+		wel (zwak)	
- E.coli, WP2p, WP2uvra	+/-	0,1-1-10-100-1000 10.000 µg/plaat	niet	Kirkland et al, 1981
S. Typhimurium TA1535, TA1538	lever M mmri muis M Wistar FW19 rat phenobarbital	600 mg	niet	Uehleke et al, 1977
TA1535, TA1539 TA1538, TA98 TA100	lever S-D (sivso) rat aroclor	0 tot 3600 µg/ plaat	niet	Gocke et al, 1981
TA1535, TA1537 TA1538, TA98, TA100, TA92	10 verschillende proeven met verschillend S9 en doses CHCl ₃		niet	Serres and Ashby, 1981
TA1535, TA1537 TA1538, TA98 TA100	lever: CFy S-D rat IGI/CFIP muis nier: S-D rat CDI muis aroclor	10-100-1000 en 10.000 µg/plaat	niet	
TA1535 TA1538	lever: CFy S-D rat	5400 ppm 2, 4, 6 of 8 uur	niet	Abbé, Van et al, 1982

Serres en Ashby (1981) beschrijven de volgende testen met chloroform. In Hela cellen (unscheduled DNA synthesis) was chloroform positief. In chinese hamster ovariumcellen nam de Sister Chromatid Exchange niet toe (concentraties: 0,01-0,1-1,0-10 µg/ml). Verder is gekeken naar het optreden van transformaties in baby hamster niercellen. In de 2 proeven was chloroform eenmaal negatief en eenmaal positief (Serres and Ashby, 1981).

Gisten

Callen et al dienden aan *Saccharomyces Cerevisiae* (D7 en D5) 2,5 - 4,9 en 6,4 g chloroform per plaat toe.

Bij de D7 stam (meer P-450 dan D5 stam) induceerde chloroform mutaties en recombinaties en in mindere mate terugmutaties.

Pas bij de hoogste dosis nam het aantal mutaties met een factor 20 toe, terwijl het overlevingspercentage maar 10% was ten opzichte van dosis 0 (Callen et al, 1980).

Serres en Ashby (1981) beschrijven de volgende testen van chloroform met gistculturen.

Teststelsysteem	mutageen/niet mutageen
- voorwaartse mutatie	
<i>S.pombe</i> P1	mutageen
- terugmutatie	
<i>S.cerevisiae</i> XV 185-14 C	niet mutageen
- recombinatie	
<i>S.cerevisiae</i> JD1	niet mutageen
D7	niet mutageen
D4	?
T1, T2	niet mutageen
- aneuploidie	
<i>S.cerevisiae</i> D6	niet mutageen
- DNA repair test	
<i>S.cerevisiae</i> rad-mutant	niet mutageen

5.3.2 In vivo testen

5.3.2.1 Geslachtsgekoppelde recessief-letaal test

Gocke et al stelden *Drosophila melanogaster* (stammen Berlin K en Basc) oraal bloot aan chloroform (3g/l in 5% saccharose). Zij vonden geen verhoging van het aantal mutaties (Gocke et al, 1981).

Serres en Ashby beschrijven een test waarbij *Drosophila melanogaster* werd blootgesteld aan 2000 ppm chloroform. Ook zij vonden geen verhoging van het aantal mutaties (Serres and Ashby, 1981).

5.3.2.2 Micronucleus test

NMRI-muizen kregen i.p. chloroform toegediend (2x238, 2x476 of

2x952 mg/kg). Bij alle doses was de micronucleus test (beenmerg) negatief (Gocke et al, 1981).

Serres en Ashby beschreven een proef waarbij muizen 89,1 mg/kg (60µl/kg) chloroform kregen. De micronucleus test (beenmerg) was negatief (Serres and Ashby, 1981).

Augustin en Lim-Sylianao gaven muizen chloroform in doses van 100 tot 900 mg/kg. Bij toenemende dosis nam het aantal micronucleuscellen (beenmerg) toe. De significantie van deze toename wordt niet vermeld.

orale dosis (mg/kg)	aantal micronucleuscellen per 10 ³ polychromatische erythrocyten*
0	4 ±1
100	3 ±1
200	5 ±1
400	5 ±1
600	9 ±2
700	17 ±4
800	9 ±2
900	10 ±2

* Augustin and Lim-Sylianao, 1978 naar Davidson et al, 1982

5.3.2.3 Sperm morphology test

Land et al stelden mannelijke (C57B1x(3H)F1) muizen 4 uur/dag, 5 dagen lang, bloot aan 400 en 800 ppm chloroform. 28 dagen na de eerste blootstelling werden de spermatozoïden morfologisch onderzocht. Bij beide concentraties vonden ze een significante toename van morfologische afwijkingen (Land et al, 1981).

Serres and Ashby beschrijven een onderzoek waarbij mannelijke muizen 5 dagen 1485 mg CHCl₃/kg/dag krijgen. Ze vonden geen toename van het aantal morfologische afwijkingen van de spermatozoïden (Serres and Ashby, 1981).

5.3.3 Andere studies

Augustin en Lim-Sylianao gaven muizen 700 mg/kg chloroform (oraal) en testten daarna de urine van deze muizen op mutageniteit met de S.Typhimurium stam TA1537 (Host mediated test). De urine van de blootgestelde muizen was mutageen (Augustin and Lim-Sylianao, 1978 naar Davidson et al, 1982).

Pereira et al (1982) gaven mannelijke Sprague-Dawley ratten en vrouwelijke B6C3/F1 muizen via gavage radioactief chloroform (ratten 180 mg/kg (1,5 mmol/kg) en muizen 119 mg/kg (1 mmol/kg)). Ze keken naar de binding van chloroform aan DNA uit de lever en de nieren. Bij de ratten vonden ze binding van chloroform aan DNA uit de lever en de nieren (lage bindingsindex). Bij de muizen vonden ze geen binding van

chloroform aan DNA uit de lever.

Dier	Orgaan	Bindingsindex*
rat	lever	0,017
rat	nier	0,0055
muis	lever	0,0012

* Bindingsindex in pmol per mg DNA (Pereira et al, 1982).

Reitz et al vonden bij mannelijke CD-1 en B6C3 F1 muizen en mannelijke Sprague-Dawley ratten geen binding van chloroform aan DNA. In de DNA-repair test was chloroform negatief (dosis 240 mg/kg). Bij de muizen nam de cellulaire regeneratie toe met toenemende dosis (15, 60 en 240 mg/kg). Het nierweefsel was gevoeliger dan het leverweefsel. Bij een dosis van 15 mg/kg werd bij de muis geen cellulaire regeneratie waargenomen (Reitz et al, 1982).

Een samenvatting van de genotoxiciteitstoetsen van chloroform staat in bijlage 7.

Samenvatting

Genotoxische effecten

Procaryoten

Chloroform is niet mutageen in *E.coli* en *S. typhimurium* in testen met en zonder activatie.

Eucaryoten

Chloroform is niet mutageen in geïsoleerde fibroblast longcellen en ovariumcellen van chinese hamsters. Bij geïsoleerde menselijke lymfocyten treedt geen verhoging op van het aantal chromosoombreuken en SCE.

In Hella cellen is chloroform positief.

In de *S. cerevisiae* D7 stam nam na blootstelling aan chloroform het aantal mutaties toe. Het overlevingspercentage was echter maar 10% ten opzichte van de controle. In andere gistsystemen was chloroform niet mutageen.

In de geslachtsgekoppelde recessief letaal test (*Drosophila*) was chloroform na inhalatie en na orale toediening niet mutageen.

De micronucleustest (muis) geeft geen eenduidig resultaat. Een maal is de test negatief bij een dosis van 2x 952 mg/kg. In een ander onderzoek treedt bij een dosis van 700 mg/kg en hoger wel een toename op van het aantal cellen met een micronucleus.

Chloroform is positief in de sperm morphology test na inhalatie en negatief na orale toediening aan de muis.

De urine van oraal blootgestelde muizen (700 mg/kg) is mutageen in de Ames-test.

Bij ratten en muizen wordt na orale toediening weinig tot geen binding van chloroform waargenomen aan DNA en RNA uit de lever en de nieren.

Conclusie

Chloroform is niet mutageen in prokaryoten; in eukaryoten is chloroform overwegend niet mutageen. Slechts in Hela-cellen, in de sperm morphology test (muis, inhalatie) en de urine van blootgestelde muizen is mutageen. Chloroform kan als niet-mutageen worden beschouwd.

6. Risicogroep

In de literatuur wordt binnen de groep mensen die beroepsmatig blootgesteld wordt aan chloroform geen extra risicogroep genoemd op grond van predispositie, overgevoeligheid en erfelijkheid. Echter, personen met lever- of nieraandoeningen kunnen extra risico lopen bij blootstelling.

7. Gewenst onderzoek

Er is behoefte aan een inhalatieonderzoek (7 à 8 uur per dag, 5 dagen per week) bij proefdieren gedurende langere tijd om de no-effect level vast te stellen waarbij geen lever- en/of nierschade meer optreedt en om een dosiseffect relatie voor dit effect vast te stellen.

8. Evaluatie en advies

8.1 Evaluatie

- Uit inhalatie onderzoek blijkt dat 25 ppm nog een effect-niveau is voor lichte lever- en nierschade in diverse proefdieren.
- Carcinogene werking van chloroform wordt manifest bij toxische doseringen.
- Humane gegevens wijzen op een verband tussen leverschade en blootstelling aan chloroform.
- Reproductie-effecten bij proefdieren zijn manifest bij toxische doseringen voor het moederdier.
- Chloroform is niet genotoxisch.
- Aangezien chloroform niet genotoxisch maar wel carcinogeen in ratten en muizen is na orale opname, is de conclusie dat chloroform geen initiërend carcinogeen is.

8.2 Advies

Het advies zou gebaseerd moeten zijn op de no-toxic-effect-level uit een inhalatieproef. Er is slechts een effect-level bekend van 25 ppm. Daarom kan slechts een MAC-waarde worden geadviseerd, afgeleid uit deze effect level en factoren voor verschillen in gevoeligheid tussen mens en dier en mensen onderling. Ter voorkoming van snel optredende toxische effecten dient een plafondwaarde te worden vastgesteld.

Het advies luidt: MAC-waarde 1 ppm (5 mg/m^3), 8 uur per dag, 5 dagen per week, tijdgewogen gemiddelde. Ceiling 5 ppm (25 mg/m^3), 15 minuten.

Literatuur

Alle vermelde literatuur is geraadpleegd. De met * gemerkte artikelen zijn aangehaald in het rapport.

De reviewartikelen zijn aangegeven met een R.

- *Abbé, N.J. van, T.J. Green, E. Jones, M. Richold and F.J.C. Roe (1982).
'Bacterial mutagenicity studies on chloroform in vitro'.
Food and Chemical Toxicology (20) 557-561.
- *Ahmadizadeh, M., C.H. Kuo, J.B. Hook (1981)
'Nephrotoxicity and hepatotoxicity of chloroform in mice: effect of deuterium substitution'.
Journal of Toxicology and Environmental Health (8) 105-111.
- *Ahmadizadeh, M., R. Echt, C.H. Kuo, J.B. Hook (1984).
'Sex and strain differences in mouse kidney: Bowman's capsule morphology and susceptibility to chloroform'.
Toxicology Letters (20) 161-171
- Angel, A., D.A. Gratton (1982)
'The effect of anaesthetic agents on cerebral cortical responses in the rat'
British Journal of Pharmacology (76) 541-549.
- Akio Sato, M.D, M.S. Tamie Nakajima (1979).
'A structure-activity relationship of some chlorinated hydrocarbons'.
Archives of Environmental Health (march/april) 69-75.
- Baden, J.M., V.F. Simmon (1980)
'Mutagenic effects of inhalational anesthetics'
Mutation Research (75) 169-189
- Baillie, M.B., J.H. Smith, J.F. Newton, J.B. Hook (1984)
'Mechanism of chloroform nephrotoxicity;
IV Phenobarbital potentiation of in vitro chloroform metabolism and toxicity in rabbit kidneys'.
Toxicology and Applied Pharmacology (74) 285-292.
- *Barlow, S.M., F.M. Sullivan (1982)
'Reproductive hazards of industrial chemicals. (An evaluation of animal and human data)'.
Academic Press, ISBN 0-12-078960-4, (12) 230-238
- *Bergman, K. (1979)
'Whole-body autoradiography and allied tracer techniques in distribution and elimination studies of some organic solvents'.
Scandinavian Journal of Work and Environmental Health (5, suppl.1) 130-143
- Bergman, K., I. Brandt, L.E. Appelgren, P. Slanina (1981)
'Structure-dependent, selective localization of chlorinated xenobiotics in the cerebellum and other brain structures'
Experientia (37) 1184-1185

- Bomski, H., A. Sobolewska, A. Strakowski (1967)
Toxische Schädigung der Leber durch Chloroform bei Chemiebetriebswerkern
Internationales Archiv für Gewerbepathologie und Gewerbehygiene (24)
127-134
- *Bowman, F.J., J.F. Borzelleca, A.E. Munson (1978).
'The toxicity of some halomethanes in Mice'.
Toxicology and applied pharmacology (44) 213-215.
- Branchflower, R.V., R.D. Schulick, J.W. George, L.R. Pohl (1983).
'Comparison of the effects of methyl-N-butyl ketone and phenobarbital on
rat liver cytochromes P-450 and the metabolism of chloroform to phosgene'.
Toxicology and Applied Pharmacology (74) 414-421.
- *Branchflower, R.V., O.S. Nunn, R.J. Highet, J.H. Smith, J.B. Hook,
L.R. Pohl (1984).
'Nephrotoxicity of chloroform: metabolism to phosgene by the mouse
kidney'.
Toxicology and Applied Pharmacology (72) 159-168.
- *Brondeau, M.T., P. Bonnet, J.P. Guenier, J. de Ceaurriz (1983).
'Short-term inhalation test for evaluating industrial hepatotoxicants in
rats'.
Toxicology Letters (19) 139-146.
- *Callen, D.F., C.R. Wolf, R.M. Philpot (1980).
'Cytochrome P-450 mediated genetic activity and cytotoxicity of seven
halogenated aliphatic hydrocarbons in *Saccharomyces cerevisiae*'.
Mutation Research (77) 55-63.
- *Cantor, K.P., R. Hoover, T.J. Mason, L.J. MacCabe (1978).
'Associations of cancer mortality with halomethanes in drinking water'.
Institute (61) 979-985.
- Capel, I.D., H.M. Dorrell, M. Jenner, M.H. Pinnock, D.C. Williams (1979).
'The effect of chloroform ingestion on the growth of some murine tumors'.
European Journal of Cancer (15) 1485-1490.
- *Capel, I.D., D.C. Williams (1979).
'The effect of chloroform ingestion on some hepatic carcinogen
metabolising enzymes in rats'.
IRCS Medical Science (7) 82.
- *Capel, I.D., M. Jenner, H.M. Dorrell, D.C. Williams (1980).
'The effect of chloroform inhalation on hepatic glucuronidation and
deglucuronidation mechanisms'.
Drug and Chemical Toxicology (3) 73-81.
- *Condie, L.W., C.L. Smallwood, R.D. Laurie (1983).
'Comparative renal and hepatotoxicity of halomethanes:
bromodichloromethane, bromoform, chloroform, dibromochloromethane and
methylene chloride'.
Drug and Chemical Toxicology (6) 563-578.

*Cornish, H.H., B.P. Ling, M.L. Barth (1973).

'Phenobarbital and Organic Solvent Toxicity'.

American Industrial Hygiene Association Journal (81) 487-492.

*Danni, P., O. Brossa, E. Burdino, P. Milillo, G. Ugazio (1981).

'Toxicity of halogenated hydrocarbons in pretreated rats. An experimental model for the study of integrated permissible limits of environmental poisons'.

International Archives of Occupational and Environmental Health (49) 165-176.

*R Davidson, I.W.F., D.D. Summer, J.C. Parker (1982).

'Chloroform: A review of its metabolism, teratogenic, mutagenic and carcinogenic potential'.

Drug and Chemical Toxicology (5) 1-87.

Dietz, F.K., R.H. Reitz, P.G. Watanale, P.J. Gehring (1981).

'Translation of pharmacokinetic/biochemical data into risk'.

Advances in Experimental Medicine and Biology (136) 1399-1424.

Dilley, J.V. (1977).

'Inhalation teratology studies of five chemicals in rats'.

Toxicology and Applied Pharmacology (41) 196.

Dolana, P. (1981).

'Exposure to carcinogenic chemicals and smoking increases urinary excretion of mutagens in humans'.

Journal of Toxicology and Environmental Health (8) 95-104.

Edling, C. (1980).

'Anesthetic gases as an occupational hazard, review'.

Scandinavian Journal of Work and Environmental Health (6) 85-93.

Filser, J.G., P. Jung, H.M. Bolt (1982).

'Increased acetone exhalation induced by metabolites of halogenated C₁ and C₂ compounds'.

Archives of Toxicology (49) 107-116.

*Fry, B.J., T. Taylor, D.E. Hathway (1972).

'Pulmonary elimination of chloroform and its metabolite in man'.

Archives internationales de Pharmacodynamie et de Therapie (196) 98-11.

*Gocke, E., M.-T. King, K. Eckhardt, D. Wild (1981).

'Mutagenicity of cosmetics ingredients licensed by the European Communities'.

Mutation Research (90) 91-109.

*Gomez, M.I., J.A. Castro (1980).

'Covalent binding of chloroform metabolites to nuclear proteins; no evidence for binding to nucleic acids'.

Cancer Letters (9) 213-218.

- *Groger, W.K.L., T.F. Grey (1979).
'Effect of chloroform on the activities of liver enzymes in rats'.
Toxicology (14) 23-38.
- *Harrison, G.G., V. Manca (1979).
'The effect of exposure to halogenated anaesthetics on liver glutathione levels in rats'.
South Africa Medical Journal (55) 555-557.
- Hemminki, K. (1980).
'Occupational chemicals tested for teratogenicity'.
International Archives of Occupational and Environmental Health (47) 191-217.
- Hertlein, F. III (1980).
'Monitoring Airborne contaminants in chemical laboratories'.
Analytical Techniques in Occupational Health Chemistry 215-230.
- *Heywood, R., R.J. Sortwell, P.R.B. Noel, A.E. Street, O.E. Prentice, F.J.C. Roe, P.F. Wadsworth, A.N. Worden (1979).
'Safety evaluation of toothpaste containing chloroform III. Long-term study in beagle dogs'.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology (2) 835-851.
- *Hogan, M.D., P. Chi, D.G. Hoel (1979).
'Association between chloroform levels in finished drinking water supplies and various site-specific cancer mortality rates'.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology (2) 873-887.
- Howard, A.G., R. Pizzie (1981).
'Sampling of chlorinated and brominated haloforms from humid atmospheres'.
Annals of Occupational Hygiene (24) 167-173.
- *IARC
Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans (1976).
'Anaesthetics' (11) 285-292 (1979).
'Some Halogenated hydrocarbons' (20) 401-427 (1982).
'Chloroform' (supplement 4) 87-88.
Lyon.
- Infante, P.F., P.B. Marlow (1980).
'Evidence for the carcinogenicity of selected halogenated hydrocarbons including ethylene dichloride.'
Banbury report (5) 287-305.
- *Izmerov, N.F. (ed) (1984).
'Methanes halogenated'.
Scientific reviews of Soviet literature on toxicity and hazards of chemicals (59) 20-29.

Jorgenson, T.A., C.J. Rushbrook, D.C.L. Jones (1982).

'Dose-response study of chloroform carcinogenesis in the mouse and rat: status report'.

Environmental Health Perspectives (46) 141-149.

Jorgenson, T.A., E.F. Meierhenry, C.J. Rushbrook, R.J. Bull
M. Robinson (1985)

Carcinogenicity of chloroform in drinking water to male Osborne-Mendel rats and female B6C3F1 mice.

Fundamental and applied toxicology (5) 760-769.

Karstadt, M., R. Bobal, I.J. Selikoff (1981).

'A survey of availability of epidemiologic data on humans exposed to animal carcinogens.'

Banbury report (9) 223-246.

Karstadt, M., R. Bobal (1982).

'Availability of epidemiologic data on humans exposed to animal carcinogens.'

II Chemical uses and production volume'.

Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis (2) 151-167.

Kay, K. (1976).

'Toxicologic and carcinogenic evaluation of chemicals used in graphic arts'.

Clinical Toxicology (9) 359-390.

Kirkland, D.J., K.L. Smith (1981).

'Failure of chloroform to induce chromosome damage or sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes and failure to induce reversion in Escherichia coli.'

Food and Cosmetics Toxicology (19) 651-656.

*Kool, H.J. (1983).

'Organic mutagens and drinking water in the Netherlands.'

Proefschrift Landbouwhogeschool Wageningen.

Kurzel, R.B., C.L. Cetrulo (1981).

'The effect of environmental pollutants on human reproduction including birth defects'.

Environmental Science and Technology (15) 626-640.

*Land, P.C., E.L. Owen, H.W. Linde (1981).

'Morphologic changes in mouse spermatozoa after exposure to inhalational anesthetics during early spermatogenesis'.

Anesthesiology (54) 53-56.

*Lavigne, J.G., P.M. Belanger, F. Dore, G. Labrecque (1983).

'Temporal variations in chloroform-induced hepatotoxicity in rats'.

Toxicology, (26) 267-273.

- *Lawrence, C.E., P.R. Taylor, B.J. Trock, A.A. Reilly (1984).
'Trihalomethanes in drinking water and human colorectal cancer.'
Journal of the National Cancer Institute (72) 563-568.
- *Mansuy, D., P. Beaune, T. Cresteil, M. Lange, J.-P. Leroux (1977).
'Evidence for phosgene formation during liver microsomal oxidation of chloroform'.
Biochemical and Biophysical Research Communications (79) 513-517.
- *R Mercier, M. (1977).
'Criteria (exposure/effect relationships) for organochlorine solvents'.
Commission of the European Communities, Health and Safety Directorate.
- *Monster, A.C. (1973).
'Biological sampling of halogenated hydrocarbon solvents'.
Workshop halogenated hydrocarbon solvents, Hamburg.
- *Monster, A.C., G. Steinbush, R.L. Zielhuis (1976).
'Biological monitoring in occupational health, halogenated hydrocarbons'.
Subgroup MAC-values, Committee occupational health, European Economic Community.
- Monster, A.C., R.L. Zielhuis (1983)
Trichloromethane(chloroform)
In: L. Alessio, A. Berlin, R. Roi, M. Boni (Eds)
Human biological monitoring of industrial chemicals series
Commission of the European Communities, Luxembourg
- Moore, D., L.F. Chasseaud, S.K. Majeed, D.E. Prentice, F.J.C. Roe, N.J. van Abbe (1980).
'Effect of dose and vehicle on early tissue damage and regenerative activity after chloroform administration'.
Toxicology Letters, special issue, p. 234.
- *Murray, F.J., B.A. Schwetz, J.G. McBride, R.E. Stapels (1979).
'Toxicity of inhaled chloroform in pregnant mice and their offspring'.
Toxicology and applied pharmacology (50) 515-522.
- *NCI (1976)
'Report on carcinogenesis bioassay of chloroform'.
- NIOSH (1974).
'Criteria for a recommended standard, occupational exposure to chloroform'
- NIOSH (1976).
'Revised recommended chloroform standard'.
Current Intelligence Bulletin.
- *NIOSH (1977).
'Manual of Analytic methods'.
Volume (3) S351.
Volume (1) 127.

- *Palmer, A.K., A.E. Street, F.J.C. Roe, A.N. Worden (1979).
'Safety evaluation of toothpaste containing chloroform: II long term studies in rats'.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology (2) 821-833.
- *Pereira, M.A., L.W. Chang (1982).
'Binding of chloroform to mouse and rat hemoglobin'.
Chemical Biological Interactions (39) 89-99.
- *Pereira, M.A., L.-H.C. Lin, J.M. Lippitt, S.L. Herren (1982).
'Trihalomethanes as initiators and promoters of carcinogenesis'.
Environmental Health Perspectives (46) 151-156.
- *Pereira, M.A., R.E. Savage, C.W. Guion, P.A. Wernsing (1984).
'Effects of chloroform on hepatic and renal DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity in mice and rats'.
Toxicology Letters (21) 357-364.
- *Pfaffenberger, C.D., A.J. Peoples (1982)
'Long-term variation study of blood plasma levels of chloroform and related purgeable compounds'.
Journal of Chromatography (239) 217-226.
- *Phoon, W.H., K.T. Goh, L.T. Lee, K.T. Tan, S.F. Kwoh (1983).
'Toxic jaundice from occupational exposure to chloroform'.
Medical Journal of Malaysia (38) 31-34.
- *Pohl, L.R., J.W. George, H. Satoh (1984).
'Strain and sex differences in chloroform induced nephrotoxicity, different rates of metabolism of chloroform to phosgene by the mouse kidney'.
Drug Metabolism and Disposition (12) 304-308.
- *Reitz, R.H., P.J. Gehring (1978).
'Carcinogenic risk estimation for chloroform: an alternative to EPA's procedures'.
Food and Cosmetics Toxicology (16) 511-514.
- *Reitz, R.H. T.R. Fox, J.F. Quast (1982).
'Mechanistic considerations for carcinogenic risk estimation: chloroform'.
Environmental Health Perspectives. (46) 163-168.
- *Reuber, M.D. (1979).
'Carcinogenicity of chloroform'.
Environmental Health Perspectives (31) 171-182.
- *Reynolds, F.S. (1977).
'Liver endoplasmic reticulum : target site of halocarbon metabolites'.
Advances in Experimental Medicine and Biology (84) 117-137.

- *Roe, F.J.C., A.K. Palmer, A.N. Worden (1979).
'Safety evaluation of toothpaste containing chloroform: I Long-term studies in mice'.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology (2) 799-819.
- Roe, F.J.C., N.J. van Abbé (1980).
'Effect of chloroform on the activities of liver enzymes in rats'.
Toxicology (16) 275-276.
- *Rook, J.J. (1978).
'Het ontstaan van trihalomethanen bij de behandeling van drinkwater met chloor'.
Wageningen.
- Rottenberg, H. (1983).
'Uncoupling of oxidatieve phosphorylation in rat liver mitochondria by general anesthetics'.
Biochemistry (80) 3313-3317.
- *Savage, R.E., C. Westrich, C. Guion, M.A. Pereira (1982).
'Chloroform induction of ornithine decarboxylase activity in rats'.
Environmental Health Perspectives (46) 157-162.
- *Schwetz, B.A., B.K.J. Leong, P.J. Gehring (1974).
'Embryo - and Fetotoxicity of inhaled chloroform in rats'.
Toxicology and Applied Pharmacology (28) 442-452.
- *Serres, F.J., J. Ashby (red) (1981).
'Progress in mutation research volume I, evaluation of short-term tests for carcinogens'.
Elsevier, North-Holland.
- *Simmon, V.F., K. Kauhanen, R.G. Tardiff (1977).
'Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water'.
Developments in Toxicology and Environmental Science (2) 249-258.
- *Sipes, I.G., A.J. Gandolfi (1980).
'In vivo comparative bioactivation of aliphatic halogenated hydrocarbons'.
Developments in Toxicology and Environmental Science (8) 501-506.
- *Smith, J.H., K. Maita, S.D. Sleight, J.B. Hook (1983).
'Mechanism of chloroform nephrotoxicity: I. Time course of chloroform toxicity in male and female mice'.
Toxicology and Applied Pharmacology (70) 467-479.
- *Smith, J.H., J.B. Hook (1983).
'Mechanism of chloroform nephrotoxicity: II. In vitro evidence for renal metabolism of chloroform in mice'.
Toxicology and Applied Pharmacology (70) 480-485.

Smith, J.H., J.B. Hook (1984).

'Mechanism of chloroform nephrotoxicity: III. Renal and hepatic microsomal metabolism of chloroform in mice'.

Toxicology and Applied Pharmacology (73) 511-524.

*Smith, J.H., K. Maita, S.D. Sleight, J.B. Hook (1984).

'Effect of sexhormone status on chloroform nephrotoxicity and renal mixed function oxidase in mice'.

Toxicology (30) 305-316.

Sotaniemi, E.A., Seppo Sutinen, Sirkka Sutinen, A.J. Arranto,

R.O. Pelkonen (1982).

'Liver injury in subjects occupationally exposed to chemicals in low doses'.

Acta Medica Scandinavica (212) 207-215.

Stevens, J.L., M.W. Anders (1981).

'Metabolism of haloforms to carbon monoxide IV: studies on the reaction mechanism in vivo'.

Chemical Biological Interactions (37) 365-374.

Stott, W.T., R.H. Reitz, A.M. Schuman, P.G. Watanabe (1981).

'Genetic and nongenetic events in neoplasia'.

Food and Cosmetics Toxicology (19) 567-576.

*Sturrock, J. (1977).

'Lack of mutagenic effect of halothane or chloroform on cultured cells using the azaguanine test system'.

British Journal of Anaesthesia (49) 207-210.

Taylor, G.J., R.T. Drew, E.M. Lores, T.A. Clemmer (1976).

'Cardiac depression by haloalkane propellants, solvents and inhalation anesthetics in rabbits'.

Toxicology and Applied Pharmacology (38) 379-387.

*Thompson, D.J., S.D. Warner, V.B. Robinson (1974).

'Teratology studies on orally administered chloroform in the rat and rabbit'.

Toxicology and Applied Pharmacology (29) 348-357.

*Torkelson, T.R., F. Oyen, V.K. Rowe (1976).

'The toxicity of chloroform as determined by single and repeated exposure of laboratory animals'.

American Industrial Hygiene Association Journal (37) 697-705.

Tumasonis, C.F., D.N. McMartin, B. Bush (1985).

'Lifetime toxicity of chloroform and bromodichloromethane when administered over a lifetime in rats.

Ecotoxicology and environmental safety (9) 233-240.

Tyson, C.A., K. Hawk-Prather, D.L. Story, D.H. Gould (1983).
'Correlations of in Vitro and in Vivo hepatotoxicity for five haloalkanes'.
Toxicology and Applied Pharmacology (70) 289-302.

*Uehleke, H., T. Werner, H. Greim, M. Krämer (1977).
'Metabolic activation of haloalkanes and tests in vitro for mutagenicity'.
Xenobiotica (7) 393-400.

Van Doorn, J.E. (1985)
Chloroform, van narcosemiddel tot gif.
Rapport 85/04
Coronel Laboratorium, Universiteit van Amsterdam.

Vaughan, R.W., I. Glenn Sipes, B.R. Brown jr. (1979).
'Minireview, role of biotransformation in the toxicity of inhalation anesthetics'.
Life Sciences (23) 2447-2462.

White, A.E., S. Takehisa, E.I. Eger, S. Wolff, W.C. Stevens (1979).
'Sister chromatid exchanges induced by inhaled anesthetics'.
Anesthesiology (50) 426-430.

WHO (1979).
'Toxicological evaluation of certain food additives'.
Food Additives Series (14) 24-27.

Winslow, S.G., H.B. Gerstner (1978).
'Health aspects of chloroform: a review'.
Drug and Chemical Toxicology (1) 259-275.

Wolf, C.R., D. Mansuy, W. Nastainczyk, G. Deutshmann, V. Ullrich (1977).
'The reduction of polyhalogenated.
methanes by liver microsomal Cytochrome P 450.'.
Molecular Pharmacology (13) 698-705.

Bijlage 1: Samenvatting effecten kortdurende blootstelling aan chloroform (M = mannelijk, V = vrouwelijk exemplaar)

Dier	Toediening	Dosis	Duur	Effect
rat	inhalatie	5000-6200 ppm	30, 90 en 180 min.	Verlaging leverglutathion (dosis-effect) bij met phenobarbital voorbehandelde dieren. Zonder phenobarbital geen effect.
rat	inhalatie	137-1075 ppm	4 uur	Bij 292 ppm en hoger significante verhoging van GLDH en SDH. GGT en GPI veranderden niet.
rat	inhalatie	200.000 ppm	3 minuten 2, 4, 6 of 8 maal	2 blootstellingen of meer: lever schade (lever- en plasma-glucoronidase verhoogd). bij 4 en 8: UPGA verhoogd. Na 6 en 8: P-450 verlaagd.
rat	inhalatie	292 ppm	6 u/d, 2 of 4 dagen	Lever schade: na 2 dagen: GLDH, GGT, SDH verhoogd na 4 dagen: ook GPI verhoogd.
rat muis	oraal oraal	1,05-3,8 g/kg —	éénmalig éénmalig	LD-50 = 2000 mg/kg (M) Swiss M, LD-50 = 1664 mg/kg V, LD-50 = 1919 mg/kg CBA M, LD-50 = 500-768 mg/kg V, LD-50 = 768-1200 mg/kg C57BL M, LD-50 = 250-500 mg/kg V, LD-50 = 500-768 mg/kg
rat muis	oraal oraal	500-4000 mg/kg —	éénmalig éénmalig	Sp.-Dawley M, LD-50 = 1970 mg/kg V, LD-50 = 2440 mg/kg ICR, M, LD-50 = 1120 mg/kg V, LD-50 = 1400 mg/kg
rat	oraal	0,5-50 mg/kg	1, 5 of 10 keer	Bij 1 keer laagste dosis (0,5 mg/kg) al effect op lever-enzymen (in totaal 24 leverenzymen bekeken).
rat	i.p.	148-446-743 mg/kg	éénmalig	Verhoging SGPT-gehalte (dosis-effect). Bij met phenobarbital voorbehandelde ratten effect groter.
rat/muis	i.p.	75 en 743 mg/kg	éénmalig	Met of zonder phenobarbital, 3 methyl-chloraantwezen en dimethylmaleaat geen binding CHCl ₃ aan lever RNA of DNA.
muis	i.p.	149-371-743- 1114-1485 mg/kg	éénmalig CHCl ₃ of CCl ₄	Verhoging SGPT en BUN. Verlaging PAH en TEA (dosis-effect). Effect CCl ₄ minder sterk dan CHCl ₃ .
rat	i.p.	750 mg/kg	éénmalig	Stijging ODC, V 2-4 maal gevoeliger M.
rat	i.p.	743 mg/kg	éénmalig om 9.00, 13.00, 17.00, 21.00 of 3.00 uur	Verhoging SGPT, SGOT en LDH het grootst na toediening om 21.00 uur.
muis	i.p. en s.c.	743-1485 mg/kg	éénmalig	M en V ICR-muis verhoging SGPT (dosis-effect) M ICR-muis nierschade (verhoging BUN, verlaging PAH en TEA). i.p. of s.c. geen verschil.
muis	i.p.	74,3-149-371 of 743 mg/kg	éénmalig	M DBA-muis meer nierschade dan M C57BL/6J (verhoging BUN, verlaging PAH en TEA). V DBA-muis geen nierschade. Alle typen/aesxe muizen lever schade (SGPT verhoging, dosis-effect). Toediening van testosteron verhoogt de nierschade (ook bij V DBA-muisen)

Bijlage 2: Samenvatting niet-carcinogene effecten na langdurige blootstelling aan chloroform bij proefdieren.

Dier	Toediening	Dosis	Duur	Effect
rat (n=10-12)	inhalatie	25-50-85 ppm	7 u/d, 6 maanden	25 ppm: M nier: toename relatief gewicht, zwelling tubulus epitheel. lever: necrose. V toename nier- en miltgewicht. 50 ppm: zie 25 ppm + V lever: degeneratie 85 ppm: zie 50 ppm + M pneumonitis.
konijn (n=2-3)	inhalatie	25-50-85 ppm	7 u/d, 6 maanden	25 ppm: M nier: nephritis V pneumonitis, lever: necrose en degeneratie, nier: nephritis 50 ppm: geen effect 85 ppm: M pneumonitis, lever: vacuolevorming en necrose V lever: degeneratie en necrose, nier: zwelling
cavia (n=8-12)	inhalatie	25-50-85 ppm	7 u/d, 6 maanden	25 ppm: M lever: degeneratie, nier: nephritis V lever: vacuolevorming 50 ppm: geen effect 85 ppm: V pneumonitis
hond (n=1)	inhalatie	25 ppm	7 u/d, 6 maanden	M: geen effect V: nier: vergroting kapselruimte, zwelling tubulus epitheel.
rat (n=50)	oraal (gavage)	M 90 en 180 mg/kg/d	78 weken	Beide doses: nierschade, interstitiele fibrose (M meer dan V).
		V 100 en 200 mg/kg/d		
muis (n=50)	oraal (gavage)	M 138-277 mg/kg/d V 238-477 mg/kg/d	78 weken	Bij 477 mg/kg/d, V muizen: thrombose van het hart (atrium)
muis (n=52)	oraal		80 weken	Op tumoren na geen significante verschillen ten opzichte van controle.
M, V C57BL	(gavage)	60 mg/kg/d		
M, V CBA		60 mg/kg/d		
M, V CF/1		60 mg/kg/d		
V ICI		60 mg/kg/d		
M ICI		17 of 60 mg/kg/d		
rat (n=25)	oraal	15 mg/kg/d	52 weken	Geen effect op tumoren na.
(n=50)	(gavage)	75 mg/kg/d 165 mg/kg/d 60 mg/kg/d	80 weken	Blootgestelde ratten overleefden beter dan de controle. Beide groepen hoge incidentie nierschade.
hond (n=8)	oraal (gavage)	15 of 30 mg/kg/d	7,5 jaar	Beide doses verhoging SGPT-gehalte.
rat M	via drink- water	0,15 of 15 mg/kg/d	14 dagen	Beide doses: verhoging DNA-binding en UDPGA-gehalte. 15 mg/kg: verlaging P-450-gehalte.
muis M	oraal (gavage)	37-74 of 148 mg/kg/d	14 dagen	148 mg/kg: verhoging SGPT en BUN 74 en 148 mg/kg: verlaging PAH.

Bijlage 3.

Blootstelling van Osborne-Mendel ratten (n=50) en B6C3F1 muizen (n=50) in de carcinogeniteitsstudie van NCI (1976) uitgevoerd door Hazleton Laboratories.

Dier	Geslacht	Dosis (mg/kg/dag)		
		begin (wk)	eind (wk)	gemiddeld (wk)
Rat	M	90	90	90 (78)
		180	180	180 (78)
	V	125 (22)	90 (56)	100 (78)
		250 (22)	180 (56)	200 (78)
Muis	M	100 (18)	150 (60)	138 (78)
		200 (18)	300 (60)	277 (78)
	V	200 (18)	250 (60)	238 (78)
		400 (18)	500 (60)	477 (78)

Bijlage 4: Samenvatting dierexperimentele carcinogeniteit na orale toediening volgens NCI (1976), Roe et al (1979), Palmer et al (1979), Heywood et al (1979) en Reuber (1979).

Dier	Toediening	Dosis	Duur	Effect
rat n=50	oraal met maisolie	gemiddeld M 90 of 180 mg/kg/d V 100 of 200 mg/kg/d	5 d/w 78 weken	na 111 weken NCI: sign. verhoging incidentie niertumoren M (beide doses) : sign. verhoging incidentie thyroïdumoren V (beide doses) Reuber: sign. verhoging incidentie levertumoren M (180 mg/kg) en V (beide doses) rest zie NCI
muis n=50	oraal met maisolie	gemiddeld M 138 of 277 mg/kg/d V 238 of 477 mg/kg/d	5 d/w 78 weken	na 92 weken NCI: sign. verhoging incidentie levertumoren M en V (beide doses) Reuber: idem, plus sign. verhoging incidentie tumoren in lymfevaten (M en V, beide doses)
muis C57BL CBA CF/1 ICI n=52	oraal met tandpasta	mg/kg/dag 60 60 60 M 17 of 60	6 d/w 80 weken	na 97-99 weken Roe: sign. verhoging incidentie niertumoren M ICI (60 mg/kg/dag, bij 17 mg/kg/dag niet Reuber: idem
rat n=50	oraal met tandpasta	60 mg/kg/d	6 d/w 80 weken	na 95 weken Palmer: geen verhoging incidentie tumoren Reuber: idem
hond n=8	oraal met tandpasta	15 of 30 mg/kg/d	6 d/w 7,5 jaar	20-24 weken na stoppen blootstelling Heywood: geen relatieve tumoren met blootstelling echter geen nier- en levertumoren Reuber: sign. toename totaal aantal gezwellen

Bijlage 5: Overzicht epidemiologische gegevens met betrekking tot blootstelling aan chloroform

onderzochte groep	controlegroep	blootstelling	verband/effect	opmerkingen
sterfgevallen anesthesisten 1930-1945 in VS n=?	andere artsen en anesthesisten na 1945	CHCl ₃ via werk	meer sterfte door maag- kanker dan bij controle- groepen (sign. verschil)	CHCl ₃ niet het enige anestheticum
13 mensen uit Singapore (één fabriek) okt. 1973-juli 1974	-	400 ppm via werk 1-5 maanden lang	optreden van geelzucht in verband gebracht met blootstelling aan CHCl ₃	bij 4 personen varieerde het CHCl ₃ -gehalte in bloed van 1-2,9 mg/l
18 mensen uit één fabriek (Singapore) mei 1980-okt. 1981	-	14,4-50,4 ppm CHCl ₃ via werk	optreden van geelzucht in verband gebracht met blootstelling aan CHCl ₃	bij 1 persoon CHCl ₃ - gehalte in bloed be- paald, niet aange- troffen
68 arbeiders uit een farmaceutische fabriek	Voormalig bloed- gestelden (39) en twee groepen van 23 resp. 165 pers. (plaatselijke be- volking)	1-4 jaar 10-1000 mg/m ³	leververvetting, toxische hepatitis	in alle gevallen vergrote lever

Bijlage 6: Samenvatting effecten van chloroform op reproductie en teratogeniteit voor enkele proefdieren

Dier	Toediening	Dosis	Duur	Effect
muis M	inhalatie	400 en 800 ppm	4 uur/dag 5 dagen	morfologische afwijkingen spermatozoiden bij beide doses
muis V	inhalatie	100 ppm	7 uur/dag tijdens zwangerschap dag 1-7 6-15 8-15	1-7 en 6-15: % muizen zwanger nam af Alle groepen: verminderde botvorming 8-15: toename gespleten gehemelte 1-7: toename resorpties 1-7 en 8-15: afname foetale gewicht 100 ppm: was toxisch voor het moederdier 30 ppm: vertraging botvorming schedel toename afwezige ribben
rat V	inhalatie	30, 100 of 300 ppm	7 uur/dag dag 6-15 zwangerschap	100 ppm: toename geperforeerde anus, afwezigheid staart, afwezige ribben, onderhuidse ophoping vocht, vertraagde botvorming borstbeen 300 ppm: afname aantal zwangerschappen, daardoor misvormingen niet meer significant
rat V	oraal	20, 50, 126 mg/kg/d	dag 6-15 zwangerschap	126 mg/kg: sign. afname foetale gewicht Deze dosis was toxisch voor het moederdier
koniijn V	oraal	20, 35 of 50 mg/kg/d	dag 6-18 zwangerschap	50 mg/kg: sign. afname foetale gewicht
rat V	oraal	100, 200 of 400 mg/kg/d	dag 6-15 zwangerschap	Alle doses toxisch voor moederdier, daardoor afwijkingen foeten mogelijk

Bijlage 7: Samenvatting genotoxiciteitstoetsen met chloroform

Testsysteem type		Dosis		Effect
prokaryoten	E.coli, rec ⁻ , WP2, WP67, CM871, W3110, P3478, WP2uvrA			+/- S9 niet mutageen alleen P3478 + S9 zwak mutageen
	S.Typhimurium, TA1535, TA1538, TA1537, TA98, TA100 en TA92	0 tot 10.000 µg/ plaat 5400 ppm (2,4,6 of 8 uur)		niet mutageen (+/- S9)
	longcellen chinese hamster	10.000 tot 25.000 ppm 24 uur		niet mutageen
	ovariumcellen chinese hamster	7100 ppm 1 uur		geen toename SCE
eukaryoten zoogdiercellen	menselijke lymphocyten +S9	50-100-200 en 400 µg/ml		- geen toename chromosoombreuken - geen toename SCE
	Hela cellen			positief
	ovariumcellen chinese hamster	0,01-0,1-1,0 10 µg/ml		geen toename SCE
	niercellen babyhamster			tegenstrijdig wel/geen transformaties
gisten	S.Cerevisiae D7 en D5 S.pombe 81 Sc Xv 185-14 C S.Cerevisiae J.D1, D7, T1, T2, D6, rad mutant, D4	2,5; 4,9 en 6,4 g/plaat		D7: toename mutaties D5: geen effect mutageen niet mutageen niet mutageen ?
Drosophila melanogaster	Berlin K, Basc	3 g/l (oraal)		geen toename mutaties
	Algemeen	2000 ppm		geen toename mutaties

ISSN 0166-8935/2.14.877/8705



Uitgave van het Directoraat-Generaal van de Arbeid van het Ministerie van Sociale Zaken en Werkgelegenheid, Balen van Andelplein 2, 2273 KH Voorburg