CODING FORM FOR SRC INDEXING

REVISED 10/15/86

Microfiche No.	OTS0537602
New Doc I.D.	89-920004621
Old Doc I.D.	8EHQ-0892-5975
Date Produced	7/29/92
Date Recieved	8/03/92
TSCA section	8ECP
Submitting Organization	MILES CO
Contractor	BAYER AG
Document Title	INITIAL SUBMISSION: LETTER FROM MILES CO SUBMITTING TWO GERMAN SALMONELLA/MICROSOME TESTS FOR MUTAGENICITY WITH DESMODUR 44M AND DESMODUR 44 V 20
Chemical Category	DESMODUR 44M AND DESMODUR 44 V 20

8(e)

5975

CAP

(COMPLIANCE AUDIT PROGRAM)

TSCA CONFIDENTIAL BUSINESS INFORMATION

ORIGINAL - DCO (Jeff/Eric)

COPY # 1 - CBIC

COPY # 2 - Scott Sherlock

COMPANY SANITIZED

ORIGINAL - PINS

COPY # 1 - PINS

COPY # 2 - ECAD

CONTAINS NO CBI

ORIGINAL - PINS

COPY # 1 - PINS

COPY # 2 - ECAD (Dave Williams)

CONTAINS NO CBI

MILES

July 29, 1992

Miles Inc.
Mobay Road
Pittsburgh, PA 15205-9741
Phone: 412 777-2000

Document Processing Center (TS-790)
Office of Toxic Substances
Environmental Protection Agency
401 M Street, SW
Washington, DC 20460
Attention: Section 8(e) Coordinator
(CAP Agreement)

88920004621

92 AUG -3 PM 2:25

RE: 8E-CAP-0065

8EHQ-0892-5975 init

Dear Sir:

Miles Inc. is submitting a study under the TSCA Section 8(e) Compliance Audit Program (CAP Agreement 8E-CAP-0065).

The tested chemicals in the attached documents are Desmodur 44M and Desmodur 44 V 20 and can be represented by the CAS Registry Numbers 101-68-8 and 9016-87-9.

The titles of the accompanying documents are Salmonella/Mikrosomen-Test Zur Untersuchung Auf Punktmutagene Wirkung by B. Herbold, dated August 1, 1980 and Salmonella/Mikrosomen-Test Zur Untersuchung Auf Punktmutagene Wirkung by B. Herbold, dated July 17, 1980.

The results in this study that may be considered reportable according to the TSCA 8(e) Reporting Guide include positive findings in in-vitro mutagenicity tests supporting a positive finding of carcinogenicity in a chronic study.

These compounds have not been the subject of a previous TSCA Section 8(e) submission or premanufacture notification.

The information submitted in this report is not considered Confidential Business Information.

If you have any questions on this submission, please contact me.

Sincerely,

Donald W Lamb

Donald W. Lamb, Ph.D
Vice President
Product Safety and Regulatory Affairs
412-777-7431

547.LTR/vmk
Attachments
Certified Mail P 827 215 547

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	2
1. METHODEN	3
2. ERGEBNISSE	4
3. BEURTEILUNG	5
4. LITERATUR	
Anhang: Tabelle 1	

ZUSAMMENFASSUNG

1. Desmodur 44 M wurde im Salmonella/Mikrosomen-Test in Dosen bis 2500µg pro Platte an einer Salmonella typhimurium LT2-Mutante ergänzend mit Aceton als Lösungsmittel auf mutagene Wirkung geprüft. Hierbei handelte es sich um den histidin-auxotrophen Stamm TA 100.

2. Dosen bis zu 2500 µg pro Platte führten nicht zu bakterientoxischen Effekten. Die Gesamtkeimzahlen blieben unverändert. Eine Wachstumshemmung konnte nicht festgestellt werden. Mit der Dosis 2500 µg pro Platte kam es zu Substanzpräzipitationen.

3. Es fanden sich an Salmonella typhimurium TA 100 Hinweise auf eine mutagene Wirkung von Desmodur 44 M. Hierbei ließ sich eine biologisch relevante Erhöhung der Mutantenzahlen auf etwas mehr als das Doppelte der Negativ-Kontrolle feststellen. Die niedrigste effektive Dosis lag für Salmonella typhimurium TA 100 bei 20 µg pro Platte. Desmodur 44 M muß daher als schwach aber eindeutig mutagen im Salmonella/Mikrosomen-Test bezeichnet werden.

4. Die Positiv-Kontrollen Endoxan® und 2-Aminoanthrazen wirkten deutlich mutagen, wie aus dem biologisch relevanten Anstieg der Mutantenkolonien gegenüber der jeweiligen Negativ-Kontrolle ersichtlich ist.

1. METHODEN

Die Methodik entspricht bis auf die hier zusätzlich angegebener Punkte der im Bericht 9130 vom 9.5.1980.

1. Die Untersuchungen erfolgten nur mit S-9 Mix.

2. Die S-9 Fraktion stammte aus der Aufarbeitung vom 29.4.1980.

3. Als Lösungsmittel diente für Desmodur 44 M Aceton für 2-Aminoanthrazen DMSO sowie für Endoxan entmineralisiertes Wasser.

   Die Untersuchung erfolgte im Mai 1980 am Institut für Toxikologie. Alle Rohdaten befinden sich im Archiv dieses Instituts.

2. ERGEBNISSE

Die Mittelwerte der Platten pro Dosis sind aus der Tabelle 1 zu entnehmen.

Wie sich hieraus ersehen läßt, ergab sich kein Hinweis auf eine bakterientoxische Wirkung von Desmodur 44 M in Dosen bis 2500 µg pro Platte. Die Gesamtkeimzahlen erbrachten für diese Konzentrationen immer die gleichen Werte wie die Negativ-Kontrolle oder differierten nur unwesentlich und biologisch irrelevant. Eine Wachstumshemmung konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Mit 2500 µg pro Platte kam es jedoch zu Substanzpräzipitationen.

Mit Salmonella typhimurium TA 100 ließ sich eine dosisabhängige Erhöhung der Mutantenzahlen auf etwas mehr als das Doppelte der Negativ-Kontrolle feststellen.

Die niedrigste effektive Dosis lag hierbei für Salmonella typhimurium TA 100 bei 20 µg pro Platte (Tabelle 1).

Die Positiv-Kontrollen Endoxan® und 2-Aminoanthrazen erhöhten die Zahl der Mutanten weit über die Negativ-Kontrollen und zeigten somit die Sensitivität des Systems und die Aktivität des S-9 Mix, da sie zur mutagenen Wirkung weitgehend der metabolischen Aktivierung bedürfen.

3. BEURTEILUNG

DESMODUR 44 M führte im Salmonella/Mikrosomen-Test nach Verwendung von Dosen bis 2500 µg pro Platte nicht zu bakterientoxischen Effekten. Mit 2500 µg pro Platte kam es jedoch zu Substanzpräzipitationen.

Die Auswertung der einzelnen Dosisgruppen ergab hinsichtlich der für die Beurteilung wichtigen Parameter (Dosiseffekt, Verdoppelung) an Salmonella typhimurium TA 100 klare biologisch relevante Unterschiede zu der Negativ-Kontrolle, die als mutagene Effekte von Desmodur 44 M zu deuten sind. Somit wurde der Befund des Berichts 9130 auch mit Aceton als Lösungsmittel bestätigt.
Das Ausbleiben einer mutagenen Wirkung in Dosen über 100 µg pro Platte ist wohl auf eine Substrathemmung der Enzyme des S-9 Mix durch die Substanz zurückzuführen.

Die Positiv-Kontrollen erhöhten trotz der eingesetzten niedrigen Dosen die Mutantenzahlen klar über die Negativ-Kontrolle und zeigten dadurch die hohe Sensitivität des Systems.

Aufgrund dieser Sensitivität konnten im Salmonella/Mikrosomen-Test klare Hinweise auf schwache mutagene Effekte von Desmodur 44 M in bewertbaren Dosen bis 2500 µg pro Platte an Salmonella typhimurium TA 100 gefunden werden.

Prof.Dr.D.Lorke	Dr. B. Herbold	geprüft
Institutsleiter	Versuchsleiter	Inst. f. Toxikologie
		Archiv
		10.08.80

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 M

an Salmonella typhimurium TA 100

Tabelle 1

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
2500	109,5		276,0	1,03	
500	143,0		242,5	1,35	
100	259,8		230,1	2,45*	
20	223,5		306,6	2,11*	
4	126,0		242,6	1,19	
Negativ-Kontrolle 0	106,0	86,8	316,7	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	265,3	135,0	309,5	2,50*	1,57
Positiv-Kontrolle 2-Aminoanthrazen 10	2443,3	116,5	283,5	23,05*	1,35

* mutagener Effekt

BAYER AG
INSTITUT FÜR TOXIKOLOGIE

5600 Wuppertal 1 9.5.198

Bericht Nr. 9130

Exemplar Nr.: 3

(16) 0

DESMODUR 44M

(MDI)

BAYER AG

SALMONELLA/MIKROSOMEN-TEST ZUR UNTERSUCHUNG AUF PUNKTMUTAGENE WIRKUNG

BAYER AG

von

Dr. B. Herbold

BAYER AG

Die Vervielfältigung dieses Berichtes - auch auszugsweise - ist untersagt. Falls erforderlich, können weitere Exemplare vom Autor angefordert werden.

U

BAYER AG
INSTITUT FÜR TOXIKOLOGIE

5600 Wuppertal 1, 17.7.1980

Bericht Nr.: 9303

Exemplar Nr.: 3

(16) 0

Hes# 5573

DESMODUR 44 M

Ergänzung zum Bericht 9130 vom 9.5.1980

SALMONELLA/MIKROSOMEN-TEST ZUR UNTERSUCHUNG AUF PUNKTMUTAGENE WIRKUNG

von

Dr. B. Herbold

Die Vervielfältigung dieses Berichtes - auch auszugsweise - ist untersagt. Falls erforderlich, können weitere Exemplare vom Autor angefordert werden.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	2
1. EINLEITUNG	3
2. METHODEN	4
2.1 Substanzen	4
2.2 Indikatororganismen	4
2.3 S-9 Mix	5
2.4 Versuchsdurchführung	5
2.5 Bewertung der Ergebnisse	6
3. ERGEBNISSE	7
4. BEURTEILUNG	9
5. LITERATUR	10
Anhang: Tabellen 1-8	

ZUSAMMENFASSUNG

1. Desmodur 44M wurde im Salmonella/Mikrosomen-Test in Dosen bis 2500 µg pro Platte an vier Salmonella typhimurium LT2-Mutanten auf mutagene Wirkung geprüft. Hierbei handelt es sich um die histidin-auxotrophen Stämme TA 1535, TA 100, TA 1537 und TA 98.

2. Dosen bis zu 20 µg pro Platte führten nicht zu bakterientoxischen Effekten. Die Gesamtkeimzahlen blieben unverändert. Eine Wachstumshemmung konnte nicht festgestellt werden. Im darüber hinausgehenden Dosisbereich wirkte die Substanz sowohl ohne als auch mit S-9 Mix stammspezifisch bakterientoxisch, so daß dieser nur bedingt zur Bewertung herangezogen werden konnte. Mit der Dosis 2500 µg pro Platte kam es zu Substanzpräzipitationen.

3. Es fanden sich an Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98 Hinweise auf eine mutagene Wirkung von Desmodur 44M. Hierbei lief sich an Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98 eine biologisch relevante Erhöhung der Mutantenzahlen auf mehr als das Doppelte der jeweiligen Negativ-Kontrolle feststellen. Die niedrigste effektive reproduzierbare Dosis betrug hierbei für Salmonella typhimurium TA 100 20 µg pro Platte und für TA 98 100 µg pro Platte. Desmodur 44M muß daher als eindeutig mutagen im Salmonella/Mikrosomen-Test bezeichnet werden.

4. Die Positiv-Kontrollen Endoxan® und Trypaflavin wirkten ebenfalls deutlich mutagen, wie aus dem biologisch relevanten Anstieg der Mutantenkolonien gegenüber der jeweiligen Negativ-Kontrolle ersichtlich ist.

BAYER AG

1. EINLEITUNG

Die Mutagenitätsuntersuchungen an Desmodur 44M erfolgten mit dem Salmonella/Mikrosomen-Test nach Ames et al. (1973a, 1975), der besser unter dem Trivialnamen Ames-Test bekannt ist.

Bei Desmodur 44M handelt es sich um ein Produkt der Sparte PU, das auch unter der Bezeichnung MDI bekannt ist.

Der Salmonella/Mikrosomen Test stellt eine Methode zu Screening-Untersuchungen auf die punktmutagene Wirkung chemischer Agenzien in vitro dar. Der Nachweis solcher Effekte erfolt an auxotrophen Mutanten von Salmonella typhimurium. Hierzu wird die Rückmutationsrate zur Prototrophie in Negativ-Kontrollen und Behandlungsgruppen untersucht. Aus einer ausreichenden Erhöhung dieser Rate in den Behandlungsgruppen läßt sich dann auf eine mutagene Wirkung schließen.

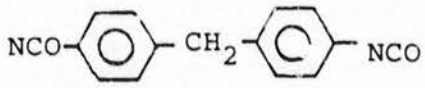
Der Säugerstoffwechsel, der in der chemischen Mutagenese von großer Bedeutung ist, wird hierbei durch die 9000 g-Fraktion von homogenisierten Säugerlebern simuliert. Zusammen mit Cofaktoren bildet diese den sog. S-9 Mix, der das eigentliche Stoffwechselmodell in diesem Versuch darstellt.

Die Methode selbst muß als sehr sensibel betrachtet werden (Herbold et al. 1976, 1978) und ist für schnelle Screening-Untersuchungen durchaus geeignet. Nach den vorliegenden Publikationen besteht eine hohe Korrelation zwischen mutagenen bzw. nichtmutagenen Befunden im Salmonella/Mikrosomen-Test und carcinogener respektive nichtcarcinogener Wirkung der untersuchten Substanz (McCann et al. 1975a, 1976; Purchase et al. 1976, 1978). Der Test stellt also auch ein gutes System zum Screening auf carcinogene Wirkung dar, wobei man seine Ergebnisse jedoch nicht überbewerten sollte, da diese hohe Korrelationsrate nicht für alle Substanzgruppen gelten dürfte (Ames, pers. Mitteilung).

2. METHODEN

2.1 Substanzen

a) Testsubstanz: Desmodur 44M, Pt. 101079, ein chemisch reiner Körper mit der Summenformel $C_{15}H_{10}O_2N_2$ und der Struktur



b) Positiv-Kontrollen:

1. Endoxan (Asta), Pt. 8343, ein verbreitetes Zytostatikum, dessen Wirkstoff Cyclophosphamid ein alkylierendes Agens und bekanntes Promutagen darstellt.

2. Trypaflavin (Roth), Pt. 0282995, der Wirkstoff des Panflavins und Rivanols, ein Frameshiftpromutagen.

2.2 Indikatororganismen

Als Indikatoren zum Punktmutagenitätsnachweis dienten Histidinmangelmutanten von Salmonella typhimurium LT2. Diese wurden speziell für den Salmonella/Mikrosomen-Test selektiert. Da sich Punktmutationen in zwei Grundklassen gliedern lassen - Basenpaarsubstitutionen und Frameshiftmutationen - kamen mehrere Stämme zur Verwendung, durch die beide Typen erfaßbar sind. Dies waren die von Ames et al. (1973b) selektierten Stämme Salmonella typhimurium TA 1535 und TA 1537, sowie die von McCann (1975b) entwickelten Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98. TA 1535 und TA 100 tragen hierbei die Basenpaarsubstitution his G 46, wobei TA 100 zusätzlich noch das Plasmid pKM 101 enthält. Dieser R-Faktor, der auch in TA 98 enthalten ist, codiert eine Ampicillinresistenz und soll die Sensitivität der Stämme erhöhen. TA 1537 und TA 98 tragen Frameshiftmarker. Bei TA 1537 ist dies die +1-Mutante his C 3076 und bei TA 98 der +2-Typ his D 3052.

Weiterhin besitzen alle Stämme noch zwei weitere Eigenschaften gemeinsam, durch die ihre Sensitivität erhöht werden soll. Einerseits sind sie deep rough, d.h. ihre Lipopolysaccharid-Seitenketten sind teilweise nicht vorhanden, so daß auch größere Moleküle in das Bakterium eindringen

und Mutationen erzeugen können. Andererseits ist ihre UV-repair so gestört, daß Schäden, wie sie auch durch UV-Licht ausgelöst werden (z.B. Thymindimere), nicht mehr behoben werden können und somit als Mutationen manifest werden.

Bakterienkulturen wurden nach den Vorschriften von Ames et al. (1973b) und McCann et al. (1975b) hergestellt und bei -80°C in 0,5 ml Portionen gelagert. Zur Benutzung wurde pro Stamm eine Portion aufgetaut und davon je 0,1 ml in ein Röhrchen mit 5ml 37°C warmer Nutrient Broth überführt.

2.3 S-9 Mix

Zur Verstoffwechselung diente S-9 Mix, der aus den Lebern von mindestens 6 adulten männlichen Sprague Dawley Ratten, ca. 200-300 g schwer, hergestellt wurde. Zur Enzyminduktion erhielten die Tiere 5 Tage vor der Aufarbeitung eine einzige intraperitoneale Injektion Aroclor 1254 in einer Dosis von 500 mg/kg Körpergewicht, gelöst in Erdnußöl. Die Tiere wurden entsprechend den Angaben von Ames et al. (1975) aufgearbeitet und die S-9 Fraktion bei -80°C in 10 ml-Portionen gelagert. Zur Verwendung wurden diese Portionen in Eiswasser langsam aufgetaut. Der S-9 Mix wurde frisch bereitet (Ames et al. 1973a), wobei die S-9 Fraktion aus der Aufarbeitung vom 17.3.1980 stammte und zu 30% im fertigen S-9 Mix enthalten war.

2.4 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Ames et al. (1973a, 1975). Zur Mutantenbestimmung wurden pro Substanz und Dosis je 4 Nährböden pro Stamm benutzt. Als Negativ-Kontrolle dienten ebensoviele Platten, wobei diese mit dem Lösungsmittel ohne Testsubstanz beschickt wurden.

Zur Gesamtkeimbestimmung dienten in allen Gruppen je 2 Platten.

Die benutzten Bakteriensuspensionen stammten aus 24-Stunden-Kulturen in Nutrient Broth, die bei 37°C bebrütet worden waren. Zur Gesamtkeimbestimmung diente hierbei eine Verdünnung der Stufe 10^{-6}.

Alle Gruppen wurden mit S-9 Mix versehen; zusätzlich wurden sie auch ohne S-9 Mix untersucht, um eventuelle Entgiftungen durch den Stoffwechsel zu erfassen.

Nachdem die Platten 48 Stunden bei 37°c inkubiert worden waren, wurden sie ausgezählt.

Es wurden folgende Dosen pro Platte im Hauptversuch untersucht:

	µg pro Platte	
1. Negativ-Kontrolle	0,0	
2. Desmodur 44M	2500,0	
3. Desmodur 44M	500,0	
4. Desmodur 44M	100,0	
5. Desmodur 44M	20,0	
6. Desmodur 44M	4,0	
7. Positiv-Kontrolle Endoxan	435,0*	(nur TA 1535 und TA 100)
8. Positiv-Kontrolle Trypaflavin	200,0	(nur TA 1537 und TA 98)

Die Dosen der Wiederholungsversuche lassen sich aus den Tabellen 5 bis 8 entnehmen.

Als Lösungsmittel diente für Desmodur 44M und Trypaflavin DMSO sowie für Endoxan entmineralisiertes Wasser.

Die Untersuchungen erfolgten von März bis April 1980 am Institut für Toxikologie. Alle Rohdaten befinden sich im Archiv dieses Instituts.

2.5 Bewertung der Ergebnisse

Als positiv gilt eine reproduzierbare dosisabhängige Erhöhung der Mutantenzahlen mindestens eines Stammes, wobei in etwa das Doppelte der Negativ-Kontrolle erreicht werden sollte.

---

* entspricht 300,0 µg Cyclophosphamid

3. ERGEBNISSE

Die Mittelwerte der Platten pro Dosis sind aus den Tabellen 1 bis 8 zu entnehmen.

Wie sich hieraus ersehen läßt, ergab sich kein Hinweis auf eine bakterientoxische Wirkung von Desmodur 44M in Dosen bis 20 µg pro Platte. Die Gesamtkeimzahlen erbrachten für diese Konzentrationen immer die gleichen Werte wie die Negativ-Kontrollen oder differierten nur unwesentlich und biologisch irrelevant. Eine Wachstumshemmung konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Höhere Dosen wirkten sowohl ohne als auch mit S-9 Mix stammspezifisch bakterientoxisch und waren daher für eine Beurteilung nur bedingt ausschlaggebend.

Mit 2500 µg pro Platte kam es jedoch zu Substanzpräzipitationen.

Mit zwei der vier verwendeten Stämme ließ sich eine dosisabhängige Erhöhung der Mutantenzahlen auf mehr als das Doppelte der jeweiligen Negativ-Kontrolle feststellen. Bei diesen Stämmen handelte es sich um Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98 (Tabellen 2 und 4).

Die Befunde an Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98 wurden durch die Wiederholungsversuche bestätigt (Tabellen 5 und 7).

Die niedrigste effektive und reproduzierbare Dosis lag hierbei für Salmonella typhimurium TA 100 bei 20 µg pro Platte (Tabellen 2 und 5) und für Salmonella typhimurium TA 98 bei 100 µg pro Platte (Tabellen 4 und 7). Positive Befunde ergaben sich nur mit S-9 Mix.

Da sich an TA 1537 unklare Phänomene ergaben, wurden die Untersuchungen mit diesem Stamm zweimal wiederholt (Tabellen 6 und 8). Diese Versuche erbrachten jedoch nur negative Resultate.

Die Positiv-Kontrollen Endoxan® und Trypaflavin erhöhten die Zahl der Mutanten ebenfalls weit über die Negativ-Kontrollen und zeigten somit die Sensitivität des Systems und die Aktivität des S-9 Mix, da sie zur mutagenen Wirkung weitgehend der metabolischen Aktivierung bedürfen.

BAYER AG
BAYER AG
BAYER AG
BAYER AG

4. BEURTEILUNG

Desmodur 44M führte im Salmonella/Mikrosomen-Test nach Verwendung von Dosen bis 2500 µg pro Platte ab 100 µg pro Platte sowohl mit als auch ohne S-9 Mix zu bakterientoxischen Effekten. Niedrigere Dosen führten nicht zu einer Verminderung des Titers oder des Backgroundwachstums. Mit 2500 µg pro Platte kam es jedoch zu Substanzpräzipitationen.

Die Auswertung der einzelnen Dosisgruppen ergab hinsichtlich der für die Beurteilung wichtigen Parameter (Dosiseffekt, Verdoppelung) an Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98 klare biologisch relevante Unterschiede zu den jeweiligen Negativ-Kontrollen, die als mutagene Effekte von Desmodur 44M zu deuten sind. Da hierbei die niedrigsten effektiven und reproduzierbaren Dosen im niedrigen Dosisbereich lagen und die mutagene Wirkung an Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98 zu beobachten war, muß Desmodur 44M als eindeutig mutagen im Salmonella/Mikrosomen-Test bezeichnet werden.

Die Positiv-Kontrollen erhöhten trotz der eingesetzten niedrigen Dosen die Mutantenzahlen ebenfalls klar über die Negativ-Kontrollen und zeigten dadurch die hohe Sensitivität des Systems.

Aufgrund dieser Sensitivität konnten im Salmonella/Mikrosomen-Test klare Hinweise auf mutagene Effekte von Desmodur 44M in bewertbaren Dosen bis 2500 µg pro Platte an Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98 gefunden werden.

Prof.Dr.D.Lorke	Dr. B. Herbold
Institutsleiter	Versuchsleiter

5. LITERATUR

1. Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki und F.D. Lee:
Carcinogens are mutagens: A simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.
Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 70, 2281-2285, 1973a

2. Ames, B.N., F.D. Lee und W.E. Durston:
An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens.
Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 70, 782-786, 1973b

3. Ames, B.N., J. McCann und E. Yamasaki:
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.
Mutation Res. 31, 347-364, 1975

4. Herbold, B., W. Buselmaier und G. Röhrborn:
Kritische Betrachtung zum Lebermikrosomen-Test, einem System zum Nachweis von Punktmutationen.
Arzneim.-Forsch. 26, 1705-1707, 1976

5. Herbold, B.:
Mutagenitätsuntersuchungen mit dem Lebermikrosomen-Test.
Biol. Zbl. 97, 137-152, 1978

6. McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki und B.N. Ames:
Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: I. Assay of 300 chemicals.
Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 72, 5135-5139, 1975a

7. McCann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori und B.N. Ames:
Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmides.
Proc. nat. Acad. Aci. (USA) 72, 979-983, 1975

8. McCann, J. und B.N. Ames:
Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion.
Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 73, 950-954, 1976

9. Purchase, I.F.H., E. Longstaff, J. Ashby, D. Anderson, P.A. Lefevre und F.R. Westwood:

Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use.

Nature (London) 264, 624-627, 1976

10. Purchase, I.F.H., E. Longstaff, J. Ashby, J.A. Styles, D. Anderson, P.A. Lefevre und F.R. Westwood:

An evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens.

Brit. J. Cancer 37, 873-959, 1978

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44M

an Salmonella typhimurium TA 1535

Tabelle 1

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
2500	0***	0***	140,6**	-	-
500	7,5	4,0	123,1**	1,07	0,57
100	8,7	5,5	191,4**	1,24	0,79
20	6,0	6,0	281,5	0,86	0,86
4	5,5	5,5	286,9	0,79	0,79
Negativ-Kontrolle 0	7,0	7,0	232,0	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	239,5	16,5	120,2**	34,21*	2,36*

* mutagener Effekt
** bakterientoxischer Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44M

an Salmonella typhimurium TA 100

Tabelle 2

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
2500	154,0	118,0	28,8	1,29	1,08
500	439,0	102,0	22,3	3,66*	0,93
100	635,5	119,3	19,0	5,30*	1,09
20	374,8	96,8	24,0	3,13	0,88
4	128,0	107,0	25,8	1,07	0,98
Negativ-Kontrolle 0	119,8	109,5	24,4	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	370,0	150,5	21,3	3,09*	1,37

* mutagener Effekt
** bakterientoxischer Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44M

an Salmonella typhimurium TA 1537

Tabelle 3

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
2500	0***	6,0***	178,4	-	0,75
500	8,0	5,5***	178,7	0,89	0,69
100	6,0	4,0	178,8	0,67	0,50
20	5,5	6,0	198,4	0,61	0,75
4	7,0	4,5	175,4	0,78	0,56
Negativ-Kontrolle 0	9,0	8,0	180,4	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Trypaflavin 200	355,5	140,5	197,2	39,50*	17,56*

* mutagener Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44M

an Salmonella typhimurium TA 98

Tabelle 4

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
2500	21,0***	8,8***	260,5	0,39	0,28
500	86,8***	27,5***	309,9	1,60	0,88
100	138,5	19,0	271,3	2,55*	0,61
20	79,0	24,5	297,6	1,45	0,78
4	35,0	17,0	283,2	0,64	0,54
Negativ-Kontrolle 0	54,3	31,3	398,9	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Trypaflavin 200	1660,5	21,5***	399,9	30,58*	0,69

* mutagener Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44M

an Salmonella typhimurium TA 100

1. Wiederholung

Tabelle 5

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
500	399,0		363,6	3,03*	
100	480,8		375,1	3,65*	
20	428,3		378,6	3,25*	
Negativ-Kontrolle 0	131,8	94,0	338,3	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	263,0	175,5	305,5	2,00*	1,87

* mutagener Effekt

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44M

an Salmonella typhimurium TA 1537

Tabelle 6

1. Wiederholung

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
2000	0***		30,0**	-	
1000	8,8***		251,6**	0,93	
500	9,5		299,2	1,00	
Negativ-Kontrolle 0	9,5	9,8	310,3	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	193,5	163,0	289,3	20,37*	16,63*

* mutagener Effekt
** bakterientoxischer Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44M

an Salmonella typhimurium TA 98

1. Wiederholung

Tabelle 7

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 MIx	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
500	84,0***		199,1**	2,08*	
100	119,3**		225,8**	2,96*	
20	120,8		372,4	3,00*	
Negativ-Kontrolle 0	40,3	30,0	312,6	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Trypaflavin 200	1111,0	13,0***	415,3	27,57*	0,43

* mutagener Effekt
** bakterientoxischer Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44M

an Salmonella typhimurium TA 1537

Tabelle 8

2. Wiederholung

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
2073,6	0***		1,1**	-	
1728	5,0***		11,9**	0,35	
1440	7,8***		99,8**	0,55	
1200	5,3***		157,5**	0,37	
1000	8,8***		180,0**	0,62	
Negativ-Kontrolle 0	14,3		257,3	1,00	
Positiv-Kontrolle Trypaflavin 200	306,0		350,2	21,40*	

* mutagener Effekt
** bakterientoxischer Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

BAYER AG
INSTITUT FÜR TOXIKOLOGIE

5600 Wuppertal 1, 1.8.1980

Bericht Nr.: 9341

Exemplar Nr.: 3

Referenz

HES 5574

Desmodur 44 V 20

MDI

16

BAYER AG

SALMONELLA/MIKROSOMEN-TEST ZUR UNTERSUCHUNG AUF PUNKTMUTAGENE WIRKUNG

BAYER AG

von

Dr. B. Herbold

BAYER AG

Die Vervielfältigung dieses Berichtes - auch auszugsweise - ist untersagt. Falls erforderlich, können weitere Exemplare vom Autor angefordert werden.

5463/9

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	2
1. EINLEITUNG	3
2. METHODEN	4
2.1 Substanzen	4
2.2 Indikatororganismen	4
2.3 S-9 Mix	5
2.4 Versuchsdurchführung	5
2.5 Bewertung der Ergebnisse	6
3. ERGEBNISSE	7
4. BEURTEILUNG	9
5. LITERATUR	11
Anhang: Tabellen 1-8	

BAYER AG
BAYER AG
BAYER AG
BAYER AG

ZUSAMMENFASSUNG

1. Desmodur 44 V 20 wurde im Salmonella/Mikrosomen-Test in Dosen bis 12500 µg pro Platte an vier Salmonella typhimurium LT2-Mutanten auf mutagene Wirkung geprüft. Hierbei handelte es sich um die histidin-auxotrophen Stämme TA 1535, TA 100, TA 1537 und TA 98.

2. Dosen bis zu 1000 µg pro Platte führten nicht zu bakterientoxischen Effekten. Die Gesamtkeimzahlen blieben unverändert. Eine Wachstumshemmung konnte nicht festgestellt werden. Im darüber hinausgehenden Dosisbereich wirkte die Substanz sowohl ohne als auch mit S-9 Mix nur schwach bakterientoxisch, so daß dieser nur bedingt bis 2500 µg pro Platte zur Bewertung herangezogen werden konnte. Ab der Dosis 2500 µg pro Platte kam es zu Substanzpräzipitationen, so daß die höchste Dosis nicht auswertbar war.

3. Es fanden sich an Salmonella typhimurium TA 100 Hinweise auf eine mutagene Wirkung von Desmodur 44 V 20. Hierbei ließ sich an Salmonella typhimurium TA 100 eine biologisch relevante Erhöhung der Mutantenzahlen auf mehr als das Doppelte der jeweiligen Negativ-Kontrolle feststellen. Die niedrigste effektive reproduzierbare Dosis betrug hierbei für Salmonella typhimurium TA 100 125 µg pro Platte. Desmodur 44 V 20 muß daher als schwach aber eindeutig mutagen im Salmonella/Mikrosomen-Test bezeichnet werden.

4. Die Positiv-Kontrollen Endoxan® und Trypaflavin wirkten deutlich mutagen, wie aus dem biologisch relevanten Anstieg der Mutantenkolonien gegenüber der jeweiligen Negativ-Kontrolle ersichtlich ist.

BAYER AG

1. EINLEITUNG

Die Mutagenitätsuntersuchungen an Desmodur 44 V 20 erfolgten mit dem Salmonella/Mikrosomen-Test nach Ames et al. (1973a, 1975), der besser unter dem Trivialnamen Ames-Test bekannt ist.

Bei Desmodur 44 V 20 handelt es sich um ein Produkt der Sparte PU, dessen Wirkstoff auch die Kurzbezeichnung MDI trägt.

Der Salmonella/Mikrosomen-Test stellt eine Methode zu Screening-Untersuchungen auf die punktmutagene Wirkung chemischer Agenzien in vitro dar. Der Nachweis solcher Effekte erfolgt an auxotrophen Mutanten von Salmonella typhimurium. Hierzu wird die Rückmutationsrate zur Prototrophie in Negativ-Kontrollen und Behandlungsgruppen untersucht. Aus einer ausreichenden Erhöhung dieser Rate in den Behandlungsgruppen läßt sich dann auf eine mutagene Wirkung schließen.

Der Säugerstoffwechsel, der in der chemischen Mutagenese von großer Bedeutung ist, wird hierbei durch die 9000 g-Fraktion von homogenisierten Säugerlebern simuliert. Zusammen mit Cofaktoren bildet diese den sog. S-9 Mix, der das eigentliche Stoffwechselmodell in diesem Versuch darstellt.

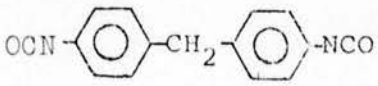
Die Methode selbst muß als sehr sensibel betrachtet werden (Herbold et al. 1976, 1978) und ist für schnelle Screening-Untersuchungen durchaus geeignet. Nach den vorliegenden Publikationen besteht eine hohe Korrelation zwischen mutagenen bzw. nichtmutagenen Befunden im Salmonella/Mikrosomen-Test und carcinogener respektive nichtcarcinogener Wirkung der untersuchten Substanz (McCann et al. 1975a, 1976; Purchase et al. 1976, 1978). Der Test stellt also auch ein gutes System zum Screening auf carcinogene Wirkung dar, wobei man seine Ergebnisse jedoch nicht überbewerten sollte, da diese hohe Korrelationsrate nicht für alle Substanzgruppen gelten dürfte (Ames, pers. Mitteilung).

5463/9

2. METHODEN

2.1 Substanzen

a) Testsubstanz: Desmodur 44 V 20, Pt. 101079, ein technisches Gemisch, dessen Hauptbestandteil die Summenformel $C_{15}H_{10}O_2N_2$ und die Struktur



besitzt.

b) Positiv-Kontrollen:

1. Endoxan (Asta), Pt. 8343, ein verbreitetes Zytostatikum, dessen Wirkstoff Cyclophosphamid ein alkylierendes Agens und bekanntes Promutagen darstellt.

2. Trypaflavin (Roth), Pt. 0282995, der Wirkstoff des Panflavins und Rivanols, ein Frameshiftpromutagen.

2.2 Indikatororganismen

Als Indikatoren zum Punktmutagenitätsnachweis dienten Histidinmangelmutanten von Salmonella typhimurium LT2. Diese wurden speziell für den Salmonella/Mikrosomen-Test selektiert. Da sich Punktmutationen in zwei Grundklassen gliedern lassen - Basenpaarsubstitutionen und Frameshiftmutationen - kamen mehrere Stämme zur Verwendung, durch die beide Typen erfaßbar sind. Dies waren die von Ames et al. (1973b) selektierten Stämme Salmonella typhimurium TA 1535 und TA 1537, sowie die von McCann (1975b) entwickelten Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98. TA 1535 und TA 100 tragen hierbei die Basenpaarsubstitution his G 46, wobei TA 100 zusätzlich noch das Plasmid pKM 101 enthält. Dieser R-Faktor, der auch in TA 98 enthalten ist, codiert eine Ampicillinresistenz und soll die Sensitivität der Stämme erhöhen. TA 1537 und TA 98 tragen Frameshiftmarker. Bei TA 1537 ist dies die +1-Mutante his C 3076 und bei TA 98 der +2-Typ his D 3052.

Weiterhin besitzen alle Stämme noch zwei weitere Eigenschaften gemeinsam, durch die ihre Sensitivität erhöht werden soll. Einerseits sind sie deep rough, d.h. ihre Lipopolysaccharid-Seitenketten sind teilweise nicht vorhanden, so daß auch größere Moleküle in das Bakterium eindringen

und Mutationen erzeugen können. Andererseits ist ihre UV-repair so gestört, daß Schäden, wie sie auch durch UV-Licht ausgelöst werden (z.B. Thymindimere), nicht mehr behoben werden können und somit als Mutationen manifest werden.

Bakterienkulturen wurden nach den Vorschriften von Ames et al. (1973b) und McCann et al. (1975b) hergestellt und bei -80°C in 0,5 ml Portionen gelagert. Zur Benutzung wurde pro Stamm eine Portion aufgetaut und davon je 0,1 ml in ein Röhrchen mit 5ml 37°C warmer Nutrient Broth überführt.

2.3 S-9 Mix

Zur Verstoffwechselung diente S-9 Mix, der aus den Lebern von mindestens 6 adulten männlichen Sprague Dawley Ratten, ca. 200-300 g schwer, hergestellt wurde. Zur Enzyminduktion erhielten die Tiere 5 Tage vor der Aufarbeitung eine einzige intraperitoneale Injektion Aroclor 1254 in einer Dosis von 500 mg/kg Körpergewicht, gelöst in Erdnußöl. Die Tiere wurden entsprechend den Angaben von Ames et al. (1975) aufgearbeitet und die S-9 Fraktion bei -80°C in 10 ml-Portionen gelagert. Zur Verwendung wurden diese Portionen in Eiswasser langsam aufgetaut. Der S-9 Mix wurde frisch bereitet (Ames et al. 1973a), wobei die S-9 Fraktion aus der Aufarbeitung vom 17.3.1980 stammte und zu 30% im fertigen S-9 Mix enthalten war.

2.4 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Ames et al. (1973a, 1975). Zur Mutantenbestimmung wurden pro Substanz und Dosis je 4 Nährböden pro Stamm benutzt. Als Negativ-Kontrolle dienten ebensoviele Platten, wobei diese mit dem Lösungsmittel ohne Testsubstanz beschickt wurden.

Zur Gesamtkeimbestimmung dienten in allen Gruppen je 2 Platten.

Die benutzten Bakteriensuspensionen stammten aus 24-Stunden-Kulturen in Nutrient Broth, die bei 37°C bebrütet worden waren. Zur Gesamtkeimbestimmung diente hierbei eine Verdünnung der Stufe 10^{-6}.

Alle Gruppen wurden mit S-9 Mix versehen; zusätzlich wurden sie auch ohne S-9 Mix untersucht, um eventuelle Entgiftungen durch den Stoffwechsel zu erfassen.

Nachdem die Platten 48 Stunden bei 37°C inkubiert worden waren, wurden sie ausgezählt.

Es wurden folgende Dosen pro Platte im Hauptversuch untersucht:

	µg pro Platte	
1. Negativ-Kontrolle	0,0	
2. Desmodur 44 V 20	12500,0	
3. Desmodur 44 V 20	2500,0	
4. Desmodur 44 V 20	500,0	
5. Desmodur 44 V 20	100,0	
6. Desmodur 44 V 20	20,0	
7. Positiv-Kontrolle Endoxan	435,0*	(nur TA 1535 und TA 100)
8. Positiv-Kontrolle Trypaflavin	200,0	(nur TA 1537 und TA 98)

Die Dosen der Wiederholungsversuche lassen sich aus den Tabellen 5 bis 8 entnehmen.

Als Lösungsmittel diente für Desmodur 44 V 20 und Trypaflavin DMSO sowie für Endoxan entmineralisiertes Wasser.

Die Untersuchungen erfolgten von März bis April 1980 am Institut für Toxikologie. Alle Rohdaten befinden sich im Archiv dieses Instituts.

2.5 Bewertung der Ergebnisse

Als positiv gilt eine reproduzierbare dosisabhängige Erhöhung der Mutantenzahlen mindestens eines Stammes, wobei in etwa das Doppelte der Negativ-Kontrolle erreicht werden sollte.

---

* entspricht 300,0 µg Cyclophosphamid

3. ERGEBNISSE

Die Mittelwerte der Platten pro Dosis sind aus den Tabellen 1 bis 8 zu entnehmen.

Wie sich hieraus ersehen läßt, ergab sich kein Hinweis auf eine bakterientoxische Wirkung von Desmodur 44 V 20 in Dosen bis 1000 µg pro Platte. Die Gesamtkeimzahlen erbrachten für diese Konzentrationen immer die gleichen Werte wie die Negativ-Kontrollen oder differierten nur unwesentlich und biologisch irrelevant. Eine Wachstumshemmung konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Höhere Dosen wirkten sowohl ohne als auch mit S-9 Mix nur schwach bakterientoxisch und waren daher für eine Beurteilung nur bedingt bis 2500 µg pro Platte ausschlaggebend.

Ab 2500 µg pro Platte kam es jedoch zu Substanzpräzipitationen, so daß die höchste Dosis nicht auswertbar war.

Mit zwei der vier verwendeten Stämme ließ sich eine Erhöhung der Mutantenzahlen auf mehr als das Doppelte der jeweiligen Negativ-Kontrolle feststellen. Bei diesen Stämmen handelte es sich um Salmonella typhimurium TA 100 und TA 98 (Tabellen 2 und 4).

Die Verdoppelung an Salmonella typhimurium TA 98 konnte nicht bestätigt werden (Tabellen 6 und 8) und ist somit als zufallsbedingt zu betrachten.

Die Befunde an Salmonella typhimurium TA 100 wurden durch den Wiederholungsversuch bestätigt (Tabelle 5).
Die niedrigste effektive und reproduzierbare Dosis lag hierbei für Salmonella typhimurium TA 100 bei 125 µg pro Platte (Tabelle 5).
Positive Befunde ergaben sich nur mit S-9 Mix.

Zusätzlich wurde noch ein Wiederholungsversuch ohne Lösungsmittel durchgeführt um eventuelle Reaktionsbeeinflussungen durch das Lösungsmittel zu überprüfen. Hierbei kam es entgegen den Untersuchungen mit DMSO bereits in niedrigsten Dosen zur Bildung von kugelartigen Figuren auf den Platten. Da sich diese Tröpfchen mit einer Polyharnstoffhaut überziehen, muß davon ausgegangen werden, daß die Substanz bei diesem Versuch nur in sehr geringen Mengen frei zur Verfügung stand.

Wie sich aus Tabelle 7 entnehmen läßt, ergab sich auch hier im subtoxischen Bereich eine leichte Erhöhung der Mutantenzahlen, die jedoch nicht mit den Wirkungen an TA 100 aus Tabelle 2 und 5 unter Verwendung von DMSO vergleichbar ist.

Die Positiv-Kontrollen Endoxan® und Trypaflavin erhöhten die Zahl der Mutanten weit über die Negativ-Kontrollen und zeigten somit die Sensitivität des Systems und die Aktivität des S-9 Mix, da sie zur mutagenen Wirkung weitgehend der metabolischen Aktivierung bedürfen.

BAYER AG

4. BEURTEILUNG

Desmodur 44 V 20 führte im Salmonella/Mikrosomen-Test nach Verwendung von Dosen bis 12500 µg pro Platte erst ab 2500 µg pro Platt sowohl mit als auch ohne S-9 Mix zu bakterientoxischen Effekten. Niedrigere Dosen führten nicht zu einer Verminderung des Titers oder des Backgroundwachstums. Ab 2500 µg pro Platte kam es jedoch zu Substanzpräzipitationen, so daß die höchste Dosis nicht auswertbar war.

Die Auswertung der einzelnen Dosisgruppen ergab hinsichtlich der für die Beurteilung wichtigen Parameter (Dosiseffekt, Verdoppelung) an Salmonella typhimurium TA 100 klare biologisch relevante Unterschiede zu den jeweiligen Negativ-Kontrollen, die als mutagene Effekte von Desmodur 44 V 20 zu deuten sind. Da hierbei die niedrigsten effektiven und reproduzierbaren Dosen im niedrigen Dosisbereich lagen, die mutagene Wirkung aber lediglich an Salmonella typhimurium TA 100 zu beobachten war, muß Desmodur 44 V 20 als schwach aber eindeutig mutagen im Salmonella/Mikrosomen-Test bezeichnet werden.

Die nur als extrem schwach mutagene bis nicht mutagene zu bezeichnenden Ergebnisse ohne DMSO lassen zwei Erklärungsmöglichkeiten offen:

1. Die Substanz bildete sofort nach Einbringen ins polare Milieu Tröpfchen, die sich mit einer Polyharnstoffhaut überziehen und so für den Versuch nicht mehr zur Verfügung standen. Eine solche Reaktion konnte mit DMSO nicht beobachtet werden.

2. Die bei dem Versuch mit Lösungsmittel zugegebene Menge DMSO könnte in der Lage sein, die Umsetzungsweise von Desmodur 44 V 20 zu beeinflussen, so daß ein anderer Stoffwechselweg eingeschlagen wird als dies ohne DMSO der Fall ist.

Welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, ist anhand der Ergebnisse nicht zu sagen.

Die Positiv-Kontrollen erhöhten trotz der eingesetzten niedrigen Dosen die Mutantenzahlen klar über die Negativ-Kontrollen und zeigten dadurch die hohe Sensitivität des Systems.
Aufgrund dieser Sensitivität konnten im Salmonella/Mikrosomen-Test klare Hinweise auf schwache mutagene Effekte von Desmodur 44 V 20 in bewertbaren Dosen bis 2500 µg pro Platte an Salmonella typhimurium TA 100 gefunden werden.

Prof.Dr.D. Lorke	Dr. B. Herbold
Institutsleiter	Versuchsleiter

geprüft
Inst. f. Toxikologie
Archiv
25.07.80

BAYER AG

5. LITTERATUR

1. Ames, B.N., W.E. Durston, D. Yamasaki und F.D. Lee:

   Carcinogens are mutagens: A simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.

   Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 70, 2281-2285, 1973a

2. Ames, B.N., F.D. Lee und W.E. Durston:

   An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens.

   Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 70, 782-786, 1973b

3. Ames, B.N., J. McCann und E. Yamasaki:

   Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.

   Mutation Res. 31, 347-364, 1975

4. Herbold, B., W. Buselmaier und G. Röhrborn:

   Kritische Betrachtung zum Lebermikrosomen-Test, einem System zum Nachweis von Punktmutationen.

   Arzneim.-Forsch. 26, 1705-1707, 1976

5. Herbold, B.:

   Mutagenitätsuntersuchungen mit dem Lebermikrosomen-Test.

   Biol. Zbl. 97, 137-152, 1978

6. McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki und B.N. Ames:

   Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: I. Assay of 300 chemicals.

   Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 72, 5135-5139, 1975a

7. McCann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori und B.N. Ames:

   Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmides.

   Proc. nat. Acad. Aci. (USA) 72, 979-983, 1975

8. McCann, J. und B.N. Ames:

   Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion.

   Proc. nat. Acad. Sci. (USA) 73, 950-954, 1976

9. Purchase, I.F.H., E. Longstaff, J. Ashby, D. Anderson, P.A. Lefevre und F.R. Westwood:

Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use.

Nature (London) 264, 624-627, 1976

10. Purchase, I.F.H., E. Longstaff, J. Ashby, J.A. Styles, D. Anderson, P.A. Lefevre und F.R. Westwood:

An evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens.

Brit. J. Cancer 37, 873-959, 1978

BAYER AG

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 V 20

an Salmonella typhimurium TA 1535

Tabelle 1

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
12500			nicht auswertbar		
2500	4,5***	5,0***	288,4	0,69	0,71
500	4,8	6,0	294,9	0,74	0,86
100	5,3	4,5	282,0	0,82	0,64
20	5,5	4,5	308,3	0,85	0,64
Negativ-Kontrolle 0	6,5	7,0	232,0	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	239,5	16,5	240,5	36.85*	2,36*

* mutagener Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 V 20

an Salmonella typhimurium TA 100

Tabelle 2

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
12500			nicht auswertbar		
2500	316,8***	130,5***	21,5	2,64*	1,19
500	541,0	131,5	20,1	4,52*	1,20
100	296,3	120,0	23,4	2,47*	1,10
20	124,5	95,5	22,4	1,04	0,87
Negativ-Kontrolle 0	119,8	109,5	24,4	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	370,0	150,5	21,3	3,09*	1,37

* mutagener Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 V 20

an Salmonella typhimurium TA 1537

Tabelle 3

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
12500			nicht auswertbar		
2500	4,8***	5,5***	190,2	0,53	0,69
500	10,3	4,3	192,6	1,14	0,54
100	5,3	2,8	197,4	0,59	0,35
20	6,3	3,8	200,9	0,70	0,48
Negativ-Kontrolle 0	9,0	8,0	180,4	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Trypaflavin 200	355,5	140,5	197,2	39,50*	17,56*

* mutagener Effekt
*** Backgroundwachstum

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 V 20

an Salmonella typhimurium TA 98

Tabelle 4

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
12500			nicht auswertbar		
2500	50,5***	18,0***	341,3	0,93	0,58
500	120,3	28,5	324,0	2,21 a)	0,91
100	63,3	21,5	295,7	1,16	0,69
20	42,0	26,0	280,2	0,77	0,83
Negativ-Kontrolle 0	54,3	31,3	389,9	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Trypaflavin 200	1660,5	21,5***	399,9	30,58*	0,69

* mutagener Effekt
*** Backgroundwachstum (5)
a) siehe Abschnitt Ergebnisse

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 V 20

an Salmonella typhimurium TA 100

Tabelle 5

1. Wiederholung

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
1000	153,8		191,9**	1,31	
500	144,5		281,9	1,23	
250	493,8		286,6	4,21*	
125	455,5		284,7	3,88*	
Negativ-Kontrolle 0	117,3	123,0	270,3	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	374,0	161,0	276,4	3,19*	1,31

* mutagener Effekt
** bakterientoxischer Effekt

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 V 20

an Salmonella typhimurium TA 98

Tabelle 6

1. Wiederholung

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
1000	29,5		247,9	0,56	
500	34,0		196,7	0,64	
250	81,8		203,4	1,54	
Negativ-Kontrolle 0	53,0	34,5	203,9	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Trypaflavin 200	803,8	9,0***	158,3	15,17*	0,26

* mutagener Effekt
*** Backgroundwachstum (5)

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 V 20

an Salmonella typhimurium TA 100

Tabelle 7

2. Wiederholung (pur ohne Lösungsmittel)

Dosis in µl pro Platte	Mutanten / Platte (M/P)		Gesamtkeimzahl pro ml	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle	
	+ S-9 Mix	- S-9 Mix	x 10^8	+ S-9 Mix	- S-9 Mix
32	78,5***		schwach toxisch	0,66	
16	117,5***		schwach toxisch	0,99	
8	170,3		untoxisch	1,43 a)	
Negativ-Kontrolle 0	119,0	107,0	untoxisch	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	293,0	115,0	untoxisch	2,46*	1,07
8	197,5		329,2	1,34 a)	
4	173,5		347,1	1,18	
2	171,3		333,3	1,16	
Negativ-Kontrolle 0	147,5	127,5	270,1	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Endoxan 435	285,0	140,5	263,2	1,93*	1,10

* mutagener Effekt *** Background-Wachstum (5) a) siehe Abschnitt Ergebnisse

Salmonella/Mikrosomen-Test mit Desmodur 44 V 20

an Salmonella typhimurium TA 98

Tabelle 8

2. Wiederholung

Dosis in µg pro Platte	Mutanten / Platte (M/P) + S-9 Mix	Mutanten / Platte (M/P) - S-9 Mix	Gesamtkeimzahl pro ml x 10^8	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle + S-9 Mix	M/P Behandlung / M/P Negativ-Kontrolle - S-9 Mix
1000	47,8		14,9	0,99	
500	47,8		13,5	0,99	
250	68,0		14,1	1,40	
125	57,0		15,9	1,18	
62,5	53,0		16,4	1,09	
Negativ-Kontrolle 0	48,5	8,8	17,9	1,00	1,00
Positiv-Kontrolle Trypaflavin 200	962,0	5,0	15,6	19,84*	0,57

* mutagener Effekt

DTIC DOCUMENT RECEIVED
92 AUG 31 AM 9:56

CERTIFICATE OF AUTHENTICITY

THIS IS TO CERTIFY that the microimages appearing on this microfiche are accurate and complete reproductions of the records of U.S. Environmental Protection Agency documents as delivered in the regular course of business for microfilming.

Data produced 2 15 93 Marcia Lubelin
(Month) (Day) (Year) Camera Operator

Place Syracuse New York
(City) (State)

AMTEK corp