Bedeutung von In-vitro-Methoden zur Beurteilung der chronischen Toxizität und Karzinogenität von Nanomaterialien, Feinstäuben und Fasern

M. Roller



Forschung Projekt F 2043

M. Roller

Bedeutung von In-vitro-Methoden zur Beurteilung der chronischen Toxizität und Karzinogenität von Nanomaterialien, Feinstäuben und Fasern

Dortmund/Berlin/Dresden 2011

Diese Veröffentlichung ist der Abschlussbericht zum Projekt "Bestimmung der Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Methoden zur Beurteilung der chronischen Toxizität und Karzinogenität von Nanomaterialien, Feinstäuben und Fasern im Rahmen der regulatorischen Toxikologie (Literaturauswertung)" – Projekt F 2043 – im Auftrag der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei dem Autor.

Autor:	Dr. Markus Roller Beratungsbüro für Risikoabschätzung Doldenweg 14, 44229 Dortmund
Titelfoto:	Sabine Plitzko, Nico Dziurowitz Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
Umschlaggestaltung:	Rainer Klemm Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
Herausgeber:	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin Friedrich-Henkel-Weg 1 – 25, 44149 Dortmund Telefon 0231 9071-0 Fax 0231 9071-2454 poststelle@baua.bund.de www.baua.de
	Berlin: Nöldnerstr. 40 – 42, 10317 Berlin Telefon 030 51548-0 Fax 030 51548-4170
	Dresden: Proschhübelstr. 8, 01099 Dresden Telefon 0351 5639-50 Fax 0351 5639-5210
	Alle Rechte einschließlich der fotomechanischen Wiedergabe und des auszugsweisen Nachdrucks vorbehalten.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Kurzreferat		5
Abstract		6
1	Einleitung und Fragestellung	7
2	Material und Methoden	10
2.1	Datenmaterial	10
2.2	Allgemeine Betrachtungen zur Referenzinformation	12
2.3 2.3.1 2.3.2	Definition der Referenzinformation Vorbemerkung Definition der Testergebnisse und Wirkungsstärken	16 16
2.3.3	aus Inhalationsversuchen zur Karzinogenität Berechnungsweise von Wirkungsstärken (karzinogene Potenz)	16 20
3	Ergebnisse	23
3.1 3.1.1 3.1.2 3.1.3	Referenzinformationen Faserförmige Stäube Karzinogene Metalle Alveolengängige granuläre bio beständige Stäube ohne bekann	23 25 44
3.1.4	te signifikante spezifische Toxizität (GBS) und sonstige Stäube Zusammenfassung der qualitativen und quantitativen Bewertung der Karzinogenität von Stäuben und Rauchen	54 72
3.2 3 2 1	In-vitro-Versuche zur Gentoxizität/Zytotoxizität	90 90
3.2.1.1	Ergebnisse von In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität von faserförmigen Stäuben	90 90
3.2.1.2	Vergleich der Ergebnisse von In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität von faserförmigen Stäuben mit den Ergebnissen aus Karzinogenitätsversuchen an Ratten	133
3.2.1.3 3.2.1.4	In-vitro-Versuche zur Biobeständigkeit von faserförmigen Stäuben Zwischenfazit zur Prädiktivität von In-vitro-Gentoxizitätstests	142
3.2.2 3.2.3	von Stäuben (Schwerpunkt faserförmige Stäube) Karzinogene Metalle Alveolengängige granuläre bio-beständige Stäube ohne	150 157
3.2.3.1	Nanomaterialien und sonstige Stäube Ergebnisse von In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität der	165
3.2.3.2	Nanomaterialien und sonstigen Stäube Ergebnisse des Projektes <i>NanoCare</i>	165 229
3.2.3.3	zwischentazit zur Pradiktivität von In-vitro-Gentoxizitätstests für Nanomaterialien und sonstige Stäube	245

4	Notwendiger philosophischer Exkurs: Sensitivität und Spezifität statistischer Tests	269
4.1	Fragestellung: Was ist ein signifikanter Effekt?	269
4.2	Das Konzept proof by contradiction	271
4.3	Das Konzept <i>rule of inductive behaviour</i> (nach J. Neyman, E.S. Pearson)	276
4.4	Korrekturen für multiples Testen verringern die "Sensitivität" (Power) statistischer Tests	283
4.5	Kritik am statistischen Testen	290
4.6	Schlussbetrachtungen "Signifikanz"	292
5	Diskussion	296
5.1	Ergebnisse des vorgenommenen Vergleichs "in vitro versus in vivo"	296
5.2	Reprise: Referenzdaten zur Beurteilung von In-vitro-Tests - Vorsorgeprinzip, Forschungsbedarf	308
5.3	Welche Erkenntnisse über krebserzeugende Wirkungen von Nanomaterialien sind von zukünftigen epidemiologischen Studien zu erwarten?	311
5.4	Welche Aussagekraft über das Fehlen eines krebserzeugenden Potentials von Nanomaterialien ist in vorliegenden epidemiologischen Studien enthalten?	313
5.5 5.5.1	Planung von In-vivo-Studien Welche Karzinogenitätstests können durchgeführt werden, um genauere Informationen zur Expositions-Risikobeziehung für Nano-GBS zu erhalten?	320 320
5.5.2	Sonstige Fragestellungen	324
5.6	Welche In-vitro-Gentoxizitätstests mit Nanomaterialien können durchgeführt werden, um genauere Informationen zur Prädiktivität in Relation zu Karzinogenitätsversuchen zu erhalten?	325
5.7	Blick auf Nanomaterialien im Zusammenhang von In-vivo- und In-vitro-Informationen	327
5.7.1	Allgemeines	327
5.7.2	Position der Senatskommission zur Prüfung gesundheits- schädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) der Deutschen	
573	Forschungsgemeinschaft (DFG)	331
0.7.0	für Umweltfragen (SRU)	336
5.7.4	Schlussfolgerungen zu Nano-GBS	342
Literaturverz	reichnis	344
Abkürzungsv	verzeichnis	364

Bedeutung von In-vitro-Methoden zur Beurteilung der chronischen Toxizität und Karzinogenität von Nanomaterialien, Feinstäuben und Fasern

Kurzreferat

Der Schwerpunkt der durchgeführten Literaturauswertungen lag auf der Analyse der Aussagekraft von In-vitro-Gentoxizitätstests in Relation zur Karzinogenität atembarer faserförmiger und granulärer Stäube gemäß Epidemiologie und Langzeit-Tierversuchen. Zur Interpretation der Befunde waren auch einige sonstige Daten zur Toxizität der Stoffe zu berücksichtigen. Die Auswertung der In-vivo-Daten legte es nahe, die Stäube in drei Potenzklassen der karzinogenen Wirkungsstärke einzuteilen. Für nahezu alle Staubarten (z. B. Dieselruß, SiO₂ kristallin und amorph, TiO₂ fein und ultrafein, Industrieruß fein und ultrafein, Eisenoxid fein und ultrafein), die in In-vitro-Gentoxizitätstests an Säugetierzellen untersucht wurden, waren in manchen Tests dabei auch positive Ergebnisse ("Effekte") festzustellen. Insgesamt lag der Anteil positiver Befunde unter den In-vitro-Tests bei etwas mehr als der Hälfte. Für faserförmige Stäube wurden am konsistentesten positive Befunde erhalten (zirka 70 %). Jedoch ist über alle Stäube und Studien hinweg keine klare Korrelation der Wahrscheinlichkeit positiver In-vitro-Befunde mit den In-vivo-Potenzklassen zu finden. Die Auswertung von 179 Datensätzen zu "GBS, Nanomaterialien und sonstige Stäube" zeigt eher einen statistischen Zusammenhang mit der Art (öffentlich/privat) des Auftraggebers oder Labors als mit chemisch-physikalischen Partikeleigenschaften. Die Beurteilung von Sensitivität und Spezifität der In-vitro-Methoden hängt stark davon ab, wie man die In-vivo-Daten bewertet bzw. auf welche Referenzinformation man sich bezieht. Nahezu alle betrachteten Staubarten haben sich in mindestens einem In-vivo-Testsystem als karzinogen gezeigt, sofern sie untersucht wurden. Legt man diese Befunde als valide - d. h. als Referenz "in Wahrheit positiv" - zugrunde, dann entspricht der Anteil von rund 60 % positiven Ergebnissen innerhalb aller ausgewerteten In-vitro-Tests annähernd der "Sensitivität" der In-vitro-Methoden; das heißt, die Sensitivität liegt dann bei ungefähr 60 % (im Durchschnitt aller Testmodelle und Stoffarten). Die Spezifität lässt sich nicht sinnvoll ermitteln, weil keine geeigneten Invivo-Daten vorliegen, welche eine krebserzeugende Wirkung hinreichend sicher ausschließen. Für fast alle untersuchten Staubarten gibt es jedoch in der Literatur Zweifel an der Relevanz der vorhandenen In-vivo-Informationen für heutige Arbeitsplatzbedingungen. Solche Zweifel werden, z. B. wegen eines so genannten Overloads, für (Nano-)Materialien vom GBS-Typ besonders verbreitet geäußert. Zumindest im Sinne einer möglichen Wirkungsschwelle sind solche Zweifel aber auch für grundsätzlich als krebserzeugend anerkannte Stoffe wie Nickelverbindungen, Quarz, Dieselruß und Chrysotilasbest veröffentlicht. Vor diesem Hintergrund werden im vorliegenden Bericht die Bedeutung statistischer Signifikanz sowie Vorschläge für weiterführende Versuche diskutiert. In Anbetracht der Datenlage und der Schwere einer Krebserkrankung ist es verantwortungsbewusst, die vorliegenden Effektbefunde bei Ratten und bei historischen Expositionen in der Epidemiologie zum Maßstab des Handelns auch bei niedrigeren Expositionshöhen zu machen, in Form einer Dosis-Wirkungsbeziehung ohne Schwellenwert.

Schlagwörter: Sensitivität, Spezifität, in vitro, in vivo, Feinstaub, Nanomaterial

Relevance of in vitro methods for the evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity of nanomaterials, fine dust and fibers

Abstract

Literature data of epidemiologic studies, experimental in vivo studies and in vitro studies were surveyed. The analysis concentrated on the validation of the results of in vitro genotoxicity studies with inhalable fibrous and granular inorganic dusts against the results from epidemiologic and long-term animal studies. The in vivo data implied to form three classes of carcinogenic potency across the dust groups. There were also positive results ("effects") in some tests for nearly all types of dusts that were tested by in vitro genotoxicity tests with mammalian cells (e.g. diesel soot, SiO₂ crystalline and amorphous, TiO₂ fine and ultrafine, carbon black fine and ultrafine, iron oxide fine and ultrafine). Overall, more than one half of the in vitro tests showed positive results. Positive results were most consistently obtained with fibrous dusts (about 70 %). However, no clear correlation of the probability of a positive in vitro test with the in vivo potency classes is seen across all dusts and studies. Statistical analysis of 179 data sets of "GBP, nanomaterials and other dusts" shows a correlation with the type (public/private) of funding or laboratory rather than with physicochemical particle properties. Determination of sensitivity and specificity of the in vitro methods strongly depends on how the in vivo data are assessed, i.e., which reference information is used. Nearly all types of substances have shown to be carcinogenic in at least one in vivo system, as far as they were investigated. If these findings are considered as valid, i.e., if they are used as the reference "true positive", then the proportion of about 60 % positive in vitro results approximates the "sensitivity" of the in vitro methods; this means, sensitivity is about 60 % then (on average across all test models and substance types). Specificity cannot be estimated meaningfully because no adequate in vivo data are available which exclude a carcinogenic potential with sufficient certainty. However, for nearly all investigated dust types, some doubts have been published in the literature regarding the relevance of the in vivo data for current workplace conditions. Doubts associated, e.g., with claims of the so called overload phenomenon are particularly widespread for (nano-)materials of the GBP type. Some doubts, at least in the sense of a possible or practical threshold, have also been published for known carcinogens like nickel compounds, guartz, diesel soot and chrysotile asbestos. Against this background, the meaning of statistical significance is discussed extensively in this report. Furthermore, recommendations are given here for planning future carcinogenicity studies and in vitro genotoxicity tests. With regard to an overall evaluation based on the current state of knowledge, it is explained that the data on nano-GBP and mechanistic considerations are compatible with a dose-response relationship without threshold. Given the severity of a neoplastic disease, it is prudent to consider the findings in rats and the observed increased risks at former workplaces as a benchmark for acting at lower exposures.

Key words: sensitivity, specificity, in vitro, in vivo, fine dust, nanomaterial

1 Einleitung und Fragestellung

In den Jahren 2006 und 2007 wurde Nanotechnologie als eine bedeutende Zukunftstechnologie diskutiert. Im Hinblick auf den Gesundheitsschutz am Arbeitsplatz wurde so genannten Nanomaterialien, die zum Teil bereits seit Jahrzehnten auf dem Markt waren, besondere Beachtung geschenkt (Orthen et al., 2007). Die Bezeichnung Nanomaterialien ist dabei ein Sammelbegriff für chemisch ganz unterschiedliche Stoffe, wobei feste Bestandteile dieser Materialien zumindest in einer Dimension eine Ausdehnung von weniger als 100 Nanometern (nm) besitzen. Es können dort also Fasern mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm enthalten sein, oder auch mehr oder weniger isometrische (granuläre) Primärpartikel in Größen unterhalb 100 nm, die zu Aggregaten oder Agglomeraten zusammengeschlossen sein mögen. Es war zum Teil ebenfalls seit Jahrzehnten bekannt, dass Stäube aus Fasern oder granulären Partikeln, mit Durchmessern oberhalb und unterhalb von 100 nm nach Einatmen Krebs erzeugen können, beim Menschen - wie Asbest - oder bei Versuchstieren - wie Titandioxid. Im Rahmen der 2006 geplanten Forschungen zu einer näheren Charakterisierung der Gesundheitsrisiken von Nanomaterialien wurde der Blick vor allem auf In-vitro-Untersuchungen gerichtet, weil Langzeit-Tierversuche zeitaufwendig und kostenintensiv sind. Gleichzeitig war aber unklar, welche Aussagekraft positiven und negativen Testergebnissen aus In-vitro-Versuchen mit festen Partikeln tatsächlich zukommt. Die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin initiierte daher ein Forschungsprojekt zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Methoden zur Beurteilung der chronischen Toxizität und Karzinogenität von Nanomaterialien, Feinstäuben und Fasern im Rahmen der regulatorischen Toxikologie, über dessen Ergebnisse hier berichtet wird. In diesem Projekt sollten die Ergebnisse von In-vitro-Tests mit Referenzinformationen verglichen werden und so Aussagen zur Prädiktivität der Tests gemacht werden.

Hinsichtlich der chronischen Toxizität und Karzinogenität von Faserstäuben, Feinstäuben und Nanomaterialien liegt insgesamt eine unüberschaubare Fülle an epidemiologischen und experimentell-toxikologischen Daten vor. Bei Fasern bzw. Faserstäuben ist zunächst an Asbest zu denken. Andere Feinstäube können Stoffe wie Nickel-, Chrom- und Arsenverbindungen oder kristallines Siliziumdioxid (Quarz) enthalten. Für solche Stäube liegen epidemiologische Erkenntnisse vor, dass sie zu einer Erhöhung von Krebsrisiken beigetragen haben. Auch im Sinne der regulatorischen Toxikologie sind diese Stoffe institutionell als humankarzinogen anerkannt (bewertet bzw. "eingestuft"). Gleichzeitig wurden für fast alle diese Stoffe in Langzeit-Inhalationsversuchen mit Ratten bzw. Mäusen nachweislich Tumoren erzeugt. Die "Empfindlichkeit" der Tierversuche hat aber in einigen Fällen nicht ausgereicht, den vollen Umfang der krebserzeugenden Potenz beim Menschen zu erfassen; z. B. bei Asbest und bei Chrom(VI)-Verbindungen zeigen die Inhalationsversuche ein erheblich niedrigeres Risiko an als die epidemiologischen Daten (Wardenbach et al., 2005; Roller et al., 2006).

Dieselmotor-Emissionen bilden ebenfalls einen "Feinstaub", wobei die Rußpartikel als besonders klein gelten und die Primärpartikel im selben Größenbereich liegen wie manche beabsichtigt hergestellten Nanomaterialien aus Ruß oder anderen Stoffen. Auch für Dieselmotor-Emissionen an Arbeitsplätzen und für Umwelt-Feinstaub, der Dieselpartikel enthält, gibt es epidemiologische Daten, die für ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko sprechen. Diese Daten haben aber einerseits in Deutschland bisher nicht für eine institutionelle Anerkennung als "humankarzinogen" (K1) ausgereicht. Andererseits spricht - wenn man denn die beobachteten Risikoerhöhungen ursächlich den Dieselpartikeln zuschreibt - auch hier die Epidemiologie für ein höheres Risiko als die Inhalationsversuche an Ratten dies tun, in denen Dieselpartikel sich qualitativ eindeutig als tumorerzeugend gezeigt haben (Roller, 2005, 2008; Roller und Pott, 2006). Weiter kompliziert wird die Beurteilung dadurch, dass in der wissenschaftlichen Diskussion zwar grundsätzlich die tumorerzeugende Wirkung von Dieselpartikeln - ebenso wie von anderen schwerlöslichen Partikeln, z. B. Nanopartikeln aus synthetischem Ruß und Titandioxid - bei Ratten anerkannt wird, dass aber die Relevanz für den Menschen, vor allem im Bereich realistischer Expositionen, teilweise bezweifelt wird. Dies mag ein Grund dafür sein, dass nach der TRGS 906 nicht Dieselmotor-Emissionen als Stoff als krebserzeugend eingestuft sind, sondern "*Tätigkeiten oder Verfahren, bei denen Beschäftigte in Bereichen arbeiten, in denen Dieselmotoremissionen freigesetzt werden*".

Ein weiterer Gesichtspunkt betrifft vor allem künstliche Mineralfasern (KMF). Für keinen Typus von KMF liegt bisher epidemiologische Evidenz für Karzinogenität vor. Für den Typus der glasigen Keramikfasern (Aluminiumsilikatwollen) wurde im Inhalationsversuch eindeutig ein tumorerzeugender Effekt in den Lungen von Ratten gefunden. In der Literatur wurde dieser Befund jedoch als unspezifischer bzw. durch granuläre Staubbestandteile verursachter Überladungseffekt abgewertet (Brown et al., 2005). Für andere international gebräuchliche KMF, insbesondere die so genannten Mineralwolle-Dämmstoffe, wurden trotz erheblichen Aufwands in Inhalationsversuchen an Ratten keine klaren Tumornachweise erhalten. Daneben ist eine Fülle experimenteller Daten nach intraperitonealer Verabreichung von Faserstäuben vorhanden, die für eine große Zahl von KMF eindeutig die Induktion des besonders bösartigen Tumortyps des malignen Mesothelioms belegen. In diesem Modell konnte die Wirkungsstärke der KMF auch gut zur Wirkungsstärke von Asbest in Beziehung gesetzt werden. Die Regulation von KMF für den Arbeitsschutz in Deutschland stützt sich daher auf die Strukturanalogie von KMF zu Asbest und auf die Erkenntnisse über unterschiedliche Wirkungsstärken im Intraperitonealmodell (TRGS 905). Bei dieser Lösung ist die bis zu einem Faktor von 1.000 höhere karzinogene Potenz von inhaliertem Asbest beim Menschen im Vergleich mit Ratten berücksichtigt (Wardenbach et al., 2005).

Für all die genannten Stoffe liegen grundsätzlich auch Informationen über chronische Toxizität auf die Lunge in Tiermodellen vor (z. B. Entzündung, Fibrose) und es liegen auch Daten aus in-vitro-Untersuchungen vor. Bisher wurden diese Daten bei der Stoffbeurteilung in der regulatorischen Toxikologie ergänzend zu Informationen aus der Epidemiologie und aus Langzeit-Tierversuchen herangezogen. Die Einstufung eines Stoffes als giftig, erbgutverändernd, reproduktionstoxisch oder krebserzeugend allein anhand von In-vitro-Daten - d. h. ohne Informationen aus epidemiologischen Studien oder aus Tierversuchen - ist gemäß den Regularien der Europäischen Union nicht vorgesehen (Richtlinie 67/548/EWG, Verordnung (EG) Nr. 1272/2008). Langzeit-Tierversuche sind - wie der Name sagt - zeitaufwendig, sie sind kostspielig und erfordern eine besondere Infrastruktur von Forschungseinrichtungen. Daher wird zunehmend auch die Verwendung von In-vitro-Daten für die Beurteilung der toxischen und krebserzeugenden Eigenschaften von Stoffen thematisiert.

Der "Extremfall" wäre die Anerkennung eines Stoffs als krebserzeugend allein aufgrund von Strukturanalogien, In-vivo-Kurzzeit-Versuchen und/oder In-vitro-Daten. So hat z. B. Roller (2000) im Rahmen eines umfangreichen Gutachtens festgestellt, dass bezüglich der Frage einer Karzinogenität bei Microcystinen und Nodularinen (Cyanobakterien-Toxine) die besondere Situation vorliege, dass kein Langzeit-Karzinogenitätsversuch durchgeführt wurde, dass jedoch eine relativ große Zahl sonstiger relevanter Informationen vorhanden ist. Auf der Grundlage zahlreicher toxikologischer Daten und Informationen zum Wirkungsmechanismus einschließlich eines positiven Ames- und Mikrokern-Tests und der Entstehung präneoplastischer Leberveränderungen nach relativ kurzen Beobachtungszeiten könne daher der Standpunkt vertreten werden, dass Microcystine und Nodularine als krebserzeugend für den Menschen angesehen werden sollten. Die Empfehlungen wurden in dieser Form allerdings nie in die regulatorische Praxis umgesetzt. Ein Beispiel für eine Kategorie-1-Einstufung aufgrund von Strukturanalogie ist das relativ seltene und kommerziell nicht genutzte Mineral des faserförmigen Aktinolith, für das keine epidemiologischen Daten vorliegen, das jedoch von der Asbest-Nomenklatur miterfasst und daher zusammen mit allen Asbestarten als ausgewiesenes Humankarzinogen anerkannt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Datenmaterial

Das Projekt bestand in Literaturrecherchen und -auswertungen. Anhand einer Literaturrecherche auf der Basis der vorhandenen Literatur und mit Hilfe der Internetdatenbank PubMed wurden relevante Publikationen zu anorganischen Partikeln und Stäuben ermittelt. Dabei wurden auch die auszuwertenden Informationen im Hinblick auf die Versuchsmodelle (in vitro, in vivo), auf die toxikologischen Endpunkte und die zu berücksichtigenden Stoffe konkretisiert. Für die Ermittlung von Sensitivität und Spezifität der In-vitro-Modelle ist es erforderlich, dass für die jeweils gleichen Stoffe sowohl In-vitro-Daten als auch Referenzinformationen vorliegen (Einstufungen, epidemiologische Daten, In-vivo-Versuche). Für einige der neueren Nanomaterialien gibt es allerdings keine geeigneten In-vivo-Daten. Wegen der Aktualität des Nano-Themas wurden aber hier bei einigen Publikationen auch Ergebnisse von Stäuben in die Ergebnistabellen aufgenommen, wenn keine vergleichbaren In-vivo-Daten gefunden werden konnten. Das erscheint richtig, um ein angemessenes Gesamtbild zu zeichnen. In Einzelfällen kann es durchaus schwierig sein, Stoffidentitäten unterschiedlicher Studien festzulegen. Die Definition der Stoffidentität ist bei anorganischen Stäuben grundsätzlich weniger eindeutig als bei synthetisierten organischen Verbindungen.

Bei anorganischen Stäuben spielen neben der Definition des chemischen Materials. aus dem die Partikel bestehen, auch variable physikalisch/chemische Partikeleigenschaften eine Rolle. Hinsichtlich der Endpunkte liegt der Schwerpunkt der Analysen auf Karzinogenität und Gentoxizität, wobei begleitend auch auf andere toxikologische Endpunkte (z. B. In-vitro-Zytotoxizitätstests) geachtet wird. Die Endpunkte wurden insbesondere mit Blick auf den Atemtrakt ausgewählt. Es wurde keine gezielte Recherche nach In-vivo-Daten im Hinblick auf mögliche Toxizität auf Organe wie Haut, Nieren, Magen und Darm durchgeführt. Mit Blick auf die physikalisch/chemischen Partikeleigenschaften sind auch die Ergebnisse zellfreier Prüfsysteme von Interesse. mit denen Parameter wie z. B. Biobeständigkeit, Dichte, Partikelgröße (Primärpartikeldurchmesser, Faserlänge, Faserdurchmesser), Oberflächenausdehnung (spezifische Oberfläche), Oberflächenladung (Zeta-Potential), Partikelzahl pro Massenein-(spezifischer Partikelgehalt, spezifischer Fasergehalt), Agglomerations-/ heit Aggregationsgrad oder Radikalbildung im zellfreien System untersucht werden.

Nachfolgend sind Stoffe genannt, zu denen toxikologische Information recherchiert wurde. Der gemeinsame Oberbegriff, der diesen Stoffen gemeinsam ist, lässt sich folgendermaßen formulieren: **anorganische Partikel bzw. Stäube**. Der Begriff der Partikel ist dabei weit ausgelegt, er schließt sowohl isometrische Partikel (granuläre Stäube) als auch langgestreckte Partikel (faserförmige Stäube) ein. Im Titel dieses Berichts ist von "**Nanomaterialien, Feinstäuben und Fasern**" die Rede. Dabei ist zu ergänzen, dass Partikel bzw. Stäube aus organischem Material wie z. B. Vitamin-Nanomaterialien hier nicht betrachtet werden. Organische Stoffe können aber als Verunreinigungen oder Beschichtungen bei den hier betrachteten Partikeln enthalten sein. Der Begriff der **Nanomaterialien** ist hier sehr weit gefasst, er bezieht sich hier insbesondere auf **isometrische und langgestreckte Partikel** mit einer Ausdehnung

("Durchmesser") in mindestens einer Dimension von nicht mehr als 100 nm sowie auf deren Aggregate und Agglomerate.

Nachfolgend sind die Stoffe in Gruppen eingeteilt. Dabei ist die bisher vorliegende Information zur Karzinogenität dieser Stoffe als Gliederungskriterium verwendet. Bei diesem Gliederungsprinzip spielt die Eigenschaft der Partikelgröße und mithin eine etwaige Bezeichnung als "Nanomaterial" nicht die primäre Rolle. Mehrere der nachfolgend genannten Stoffgruppen können Stoffe in Form von Nanomaterial einschließen. "Nanomaterial" ist aber *per se* kein toxikologisches Einteilungskriterium, da die jeweiligen Stoffe sowohl bekannte sehr toxische Bestandteile enthalten können (z. B. Arsen, Cadmium) als auch aus Verbindungen ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität bestehen können (z. B. Ruß, Titandioxid). Die folgende Einteilung dient nicht nur als gewisse formale Ordnungsstruktur, sondern die Einteilung berücksichtigt auch die Wirkungsweise beziehungsweise das karzinogene Agens und hat somit eine Bedeutung im Hinblick auf das Dosismaß, anhand dessen gegebenenfalls besondere quantitative Angaben zur Wirkungsstärke gemacht werden können (z. B. Staubvolumen bei GBS, Metallgehalt bei karzinogenen Metallverbindungen, Faserzahl bei Asbest und künstlichen Mineralfasern).

Im Hinblick auf die nachfolgende Stoff-Aufzählung sei auch der Gesichtspunkt der Biobeständigkeit bzw. Löslichkeit erläutert. Die hier betrachteten Stoffe sind in aller Regel nicht wasserlöslich in einem Grade wie z. B. NaCl. Eine "gewisse Biobeständigkeit" ist gemeinsames Merkmal der Stoffe und Voraussetzung dafür, dass der partikuläre Zustand eine Rolle bei der Toxizität im Gewebe spielen kann. Über alle Stoffe hinweg betrachtet kann sich der Grad der Biobeständigkeit aber durchaus unterscheiden. Zwei Beispiele aus dem Bereich der faserförmigen Stäube sind zum einen der beständige Asbest Krokydolith, für den Halbwertszeiten in der menschlichen Lunge im Bereich von Jahren angegeben werden, und zum anderen die modernen Glasfaser-Dämmwollen, für deren Prototyp B01 eine Dauer von weniger als einem Tag ermittelt wurde, innerhalb dessen sich eine Faser dieses Materials mit einem Durchmesser von 1 µm in vitro auflösen kann. Es kann in Einzelfällen sehr schwierig oder unmöglich sein, genaue Angaben zur Biobeständigkeit eines Materials zu machen, die Biobeständigkeit eignet sich hier deshalb auch nicht als Gliederungsprinzip für die Stoffe. Die Bedeutung der Biobeständigkeit für die Pathogenität einer Partikelsorte kann unterschiedlich sein. Im Falle der faserförmigen Stäube wird eine geringere Biobeständigkeit zum rascheren Verschwinden des schädigenden Agens im Körper beitragen und sich günstig auf die biologischen Eigenschaften auswirken. Im Falle mancher Metallverbindungen kann eine entsprechende Löslichkeit zur Freisetzung schädlicher Metallionen führen und die Toxizität des Materials gegenüber einer weniger gut löslichen Variante erhöhen. Nachfolgend sind Stoffgruppen als Gliederungsstruktur mit Beispielstoffen aufgeführt.

Faserförmige Stäube

Asbeste (Krokydolith, Tremolit, Amosit, Anthophyllit, Aktinolith, Chrysotil) Erionit

Künstliche Mineralfasern (KMF)

kristalline Keramikfasern ("Whisker": z. B. Siliziumkarbid, Kaliumtitanat) glasige Fasern (versch. Typen: lang, kurz, beständig, wenig beständig) "Nanostrukturen" (Nanofasern, Nanoröhren, z. B.: SWCNTs, MWCNTs)

Karzinogene Metalle

Feinstäube und Nanomaterialien, die aus erwiesenermaßen krebserzeugenden Metallen bestehen oder diese bzw. ihre Verbindungen in wesentlichem Umfang enthalten, z. B. (in Klammern: MAK-K-Kategorien):

Arsen (1), Beryllium (1), Cadmium (1), Chrom (2), Cobalt (2), Nickel (1), Vanadium (2)

GBS und sonstige Partikel,

d. h.:

GBS

Feinstäube und Nanomaterialien, die aus biobeständigen Materialien ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität bestehen (*alveolengängige granuläre biobeständige Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität* = aGBSobsst = GBS, im Sinne von Pott und Roller, 2005), z. B.

Industrieruße, Titandioxid, Zirkoniumdioxid, Kohlenstäube, Dieselrußpartikel

Beschichtete GBS

Nanopartikel mit Beschichtung durch organische bzw. andere (toxische) Verbindungen

Quarz

Feinstäube und Nanomaterialien aus kristallinem Siliziumdioxid (Quarz, Cristobalit)

Sonstige

Sonstige Feinstäube und Nanomaterialien, die aus Materialien mit unklarer oder variabler Zusammensetzung, mit fraglicher Biobeständigkeit bzw. mit Anhaltspunkten für spezifische Toxizität bestehen, z. B.

Umweltstäube (PM₁₀, PM_{2,5}) Zinkoxid Aluminiumverbindungen

Eisenverbindungen amorphes Siliziumdioxid

2.2 Allgemeine Betrachtungen zur Referenzinformation

In dem Projekt sollten Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Methoden ermittelt werden. Im gegebenen Zusammenhang der regulatorischen Toxikologie ist die Sensitivität die Fähigkeit eines Tests, Stoffe mit einer "gefährlichen" (*hazardous*) Eigenschaft vollständig herauszufiltern; sie ist hier zu definieren als das Verhältnis der Stoffe mit <u>positivem</u> Testergebnis, d. h. <u>mit adversem (schädlichen)</u> Effekt, zu den tatsächlich "gefährlichen". Die Spezifität ist die Fähigkeit, ausschließlich Stoffe mit einer "gefährlichen" Eigenschaft zu erfassen; sie ist zu definieren als das Verhältnis der Stoffe mit <u>negativem</u> Testergebnis, d. h. <u>ohne</u> adversen (schädlichen) Effekt, zu den "nichtgefährlichen". Man kann hier auch sagen: Sensitivität ist der Prozentsatz der in vitro positiv getesteten Stoffe unter den tatsächlich - bzw. gemäß Referenzinformation gefährlichen Stoffen, Spezifität ist der Prozentsatz der in vitro negativ getesteten Stoffe unter den tatsächlich - bzw. gemäß Referenzinformation - nicht-gefährlichen Stoffen. Man verwendet gelegentlich auch das Maß der Konkordanz als Kombination aus Sensitivität und Spezifität. Konkordanz ist definitionsgemäß der Anteil der richtig klassifizierten Stoffe an allen geprüften Stoffen.

Um diese Definitionen auf die gegebene Fragestellung anwenden zu können, muss mehreren Bedingungen genügt sein. In jedem Falle müssen konkrete Erfahrungen mit konkreten Stoffen vorliegen, d. h. es müssen aussagefähige Datensätze für bestimmte Stoffe vorliegen, die ein auswertbares Ergebnis eines In-vitro-Versuchs enthalten. Gleichzeitig muss genau für diese Stoffe eine "Referenzinformation" über die "Gefährlichkeit" vorliegen. Um die Anzahl der falsch-positiven und falsch-negativen herauszufiltern, muss definiert sein, was "gefährlich" ist.

Ein Stoff könnte dann als "gefährlich" gelten, wenn er ein entsprechendes positives Ergebnis in einer inhalativen In-vivo-Studie ergeben hat. Oberste Priorität haben aber, soweit vorhanden, aussagekräftige Erfahrungen am Menschen.

Inhalative In-vivo-Studien an Nagetieren sind relativ häufig ihrerseits nicht sensitiv genug, um das Risiko des Menschen richtig abzuschätzen bzw. um den Umfang der Gefährdung des Menschen richtig beurteilen zu können. Ein besonderes Beispiel hierfür sind die Faserstäube aus den bis Mitte der 1990er Jahre gebräuchlichen Mineralwolle-Dämmstoffen. Für mehrere solche Fasertypen wurden aufwendige Inhalationsversuche, zum Teil mit mehreren Dosisstufen, an Ratten durchgeführt. In keiner Dosisgruppe wurde verglichen mit der mitgeführten Reinluft-Kontrolle eine statistisch signifikante Erhöhung der Zahl von Tieren mit Lungentumor gefunden. Für die Fasern liegen auch keine aussagekräftigen Erfahrungen am Menschen vor. Dennoch wurden Herstellung und Verwendung dieser Mineralwollen in Deutschland wegen Karzinogenität (und wegen der Verfügbarkeit alternativer, weniger gefährlichen Stoffe) verboten (GefStoffV § 18 in Verbindung mit Anhang IV Nr. 22; § 26). Grundlage dafür waren die Strukturanalogie zu Asbest und Erkenntnisse nach intraperitonealer Injektion der Stäube bei Ratten. Ein In-vitro-Test für eine solche Faser mit einem positiven Ergebnis würde also einerseits die Gefährdung (Hazard) des Menschen im Sinne der geltenden Regulation richtig vorhersagen, gleichzeitig wäre er andererseits im Vergleich mit inhalativen In-vivo-Daten "falsch-positiv". Ein negatives In-vitro-Ergebnis würde die Gefährdung des Menschen fälschlich nicht anzeigen, wäre aber in Bezug auf die inhalativen in vivo Daten "korrekt-negativ". Angaben zur Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Daten in Bezug auf Inhalationsversuche hätten sicherlich in Bezug auf relevante Prädiktivität für die regulatorische Toxikologie eine "Schieflage". Aus diesem Grund wurden z. B. bei Riebe-Imre et al. (1994) Ergebnisse aus Invitro-Transformationstests mit Faser- und Feinstäuben mit Daten genau derselben Stäube im Intraperitonealtest bei Ratten verglichen.

Ein entsprechender Gesichtspunkt - nur mit anderen Vorzeichen - ergibt sich für das Beispiel der glasigen Keramikfasern und auch der Nanopartikel aus amorphem Kohlenstoff (Ruß) und aus Titandioxid, eventuell auch für Dieselrußpartikel. Für diese Stäube liegen eindeutig positive Tumornachweise aus inhalativen In-vivo-Studien vor, gleichzeitig werden diese Ergebnisse in einer Vielzahl von Publikationen als irrelevante Überladungseffekte kritisiert und sind institutionell bisher nur teilweise anerkannt. Negative Ergebnisse aus In-vitro-Studien mit diesen Stoffen wären also formal zunächst "falsch-negativ". Positive Ergebnisse wären zwar formal korrekt-positiv, könnten jedoch von den Autoren der "Überladungsthese" als "falsch-positiv" kritisiert werden, wenn man voraussetzt, dass der Wirkungsmechanismus für die entsprechenden Rattentumoren in Form einer irrelevanten Überladung erwiesen sei.

diese Kritik wurde auch bei der Veranstaltung zur Und genau Nano-Forschungsstrategie "Umwelt- und Gesundheitsschutz" am 30. November 2006 im Bundesumweltministerium Bonn vorgebracht; sie fand sich in dem über das Internet zugänglichen Protokoll der Veranstaltung unter den "Ergebnissen" des Workshops "Blickwinkel der Wissenschaft" folgendermaßen wieder: "In-vitro-Tests: begrenzte Aussagefähigkeit, Risk-Assessment nicht möglich. In-vivo-Tests: Zur Verifizierung sind notwendig (chronische Wirkung, Cancerogenese). Problem: Tierversuche oft keine Aussagekraft für Wirkung bei Menschen". Es werden dort also In-vivo-Versuche zur "Verifizierung" von In-vitro-Tests gefordert, gleichzeitig wird aber die Aussage der In-vivo-Tests in Frage gestellt, indem behauptet wird, Tierversuche hätten oft keine Aussagekraft für den Menschen. Aus dem Zusammenhang bei der Veranstaltung war dabei klar, dass nicht gemeint war, hinter einem fehlenden Toxizitätsnachweis in einem Tierversuch könnten sich gleichwohl Risiken für den Menschen verbergen; vielmehr war gemeint, ein klarer Toxizitätsnachweis in einem Tierversuch sei nicht unbedingt Anlass zur Besorgnis. Diese Einschätzung ist aufgrund der bisher im Bereich der regulatorischen Toxikologie akzeptierten - und wissenschaftlich begründeten - Stellung der Ergebnisse von Tierversuchen nicht so recht verständlich. Es scheint sich dabei aber nicht um versehentliche, missverständliche Formulierungen zu handeln, sondern in eine ähnliche Diskussionsrichtung weisen auch Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften.

So schreiben Krug et al. (2007) in einem Übersichtsartikel zu synthetischen Nanopartikeln am Arbeitsplatz und in der Umwelt Folgendes (Fettdruck hinzugefügt): "In neueren Übersichtsartikeln über Testmethoden zur Nanotoxikologie wird empfohlen, die mögliche toxische Wirkung von Nanopartikeln zunächst in vitro mit relevanten Targetzellen zu untersuchen (Nel et al 2006; Oberdörster er al. 2005). Danach können toxikologische Tests an komplexeren Zellkulturen, in ökotoxikologisch relevanten Spezies und schließlich in Tierexperimenten untersucht werden. In Tierversuchen können zwar umfassende Untersuchungen zu allen Aufnahmewegen, den Wirkungen auf Organebene sowie zu systemischen Effekten durchgeführt werden, es ist jedoch allgemein akzeptiert, dass Tierversuche in Bezug auf die Wirkung beim Menschen nur begrenzt aussagefähig sind (Abbott 2005). Sie sind außerdem sehr kostenintensiv und aufgrund neuester Europäischer Gesetzgebung besteht die Verpflichtung, Tierversuche zu reduzieren. In-vitro-Testmethoden sollen daher verstärkt eingesetzt werden, um für neue chemische Substanzen oder Substanzformen. wie Nanopartikeln, die z. B. in pharmazeutischen oder kosmetischen Produkten auf den Markt kommen, abzuklären, welche möglichen Wirkungen und Endpunkte im Tierversuch validiert werden müssen".

Diese Ausführungen lassen den Toxikologen zunächst etwas ratlos zurück: Es wird von Krug et al. (2007) empfohlen, vor einer Validierung der In-vitro-Modelle Substanzprüfungen in vitro durchzuführen, um damit herauszufinden, welche Wirkungen und Endpunkte im Tierversuch "validiert" werden müssen. Gleichzeitig wird aber ausgesagt, Tierversuche seien in Bezug auf Wirkungen beim Menschen nur begrenzt aussagefähig. Aufgrund des für diese Aussage angeführten Literaturzitats "Abbott 2005" ist zu vermuten, dass Krug et al. (2007) Tierversuche für sehr wenig aussagefähig halten. Denn in dem Artikel von Abbott (2005), einem *News Feature* in der besonders renommierten Zeitschrift Nature, wird im Satzspiegel durch großen Fettdruck folgende Aussage hervorgehoben: "To test a chemical for its potential to cause cancer takes five years and involves 400 rats. More than 50% of the results are positive. of which 90 % are false positives". Im Untertitel des Artikels heißt es: "Commercial and political pressures are pushing for a halt to the use of animals in toxicology tests in Europe. This change will also mean a move towards better science ...". Im Text findet sich auch folgende Meinung: "But the toxicology tests on which regulators rely to gather this information are stuck in a time warp, and are largely based on wasteful and often poorly predictive animal experiments". Weiterhin wird dort der Leiter eines Zentrums für alternative Methoden mit der Einschätzung zitiert, "The toxicity tests that have been used for decades are "simply bad science"." Er drückt seine Hoffnung aus, durch neue Verfahren habe die Toxikologie die Gelegenheit "to turn itself at last into a respectable science". Damit wird mehrfach ausgesagt, dass die Toxikologie derzeit keine "respektable" (sondern schlechte) Wissenschaft sei. Zunächst ist dabei festzustellen, dass die Quote von 90 % falsch positiven Karzinogenitätstests weder in dem Artikel von Abbott (2005) belegt wird noch anhand der dort zitierten Literatur (Gold et al., 2005) noch anhand anderer Literatur von mir nachvollzogen werden konnte. Weiterhin bestätigt die neue EG-Verordnung Nr. 1272/2008 die bisher bestehenden Kriterien für classification and labelling von Chemikalien in der EU ganz klar insofern, dass Einstufung und Kennzeichnung vor allem auf Ergebnisse aus Tierversuchen gestützt sind. Die pauschalen Aussagen bei Abbott (2005) erscheinen so abwegig, dass man eigentlich nicht meint, sich damit auseinandersetzen zu sollen. Weil es sich jedoch um eine Veröffentlichung in einem so angesehenen Magazin wie Nature handelt und weil bereits Auswirkungen der dort ausgedrückten Grundhaltung im Bereich der regulatorischen Toxikologie von Nanomaterialien erkennbar sind (s.o.), spielten diese Gesichtspunkte bei der Planung und Interpretation der Auswertungen eine Rolle (siehe Kapitel 5 "Diskussion").

An dieser Stelle sei zunächst nur darauf hingewiesen, dass eine absolute Aussagesicherheit, ob ein Stoff "gefährlich" ist - beziehungsweise wie stark gesundheitsschädigend er ist - beziehungsweise welche besonderen toxikologischen Gefährlichkeitsmerkmale (z. B. "krebserzeugend") zutreffen -, nur sehr schwer zu erzielen ist. Im Falle der Lungenkrebs erzeugenden Eigenschaft ist eine absolute Aussagesicherheit oft sogar unmöglich. Im Rahmen der regulatorischen Toxikologie und der einschlägigen Bestimmungen, z. B. der EU-Richtlinie 67/548/EWG und ihrer jungen "Nachfolgerin", der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008, ist eine absolute Aussagesicherheit auch nicht verlangt. Dort werden vielmehr anhand bestimmter Definitionen und wissenschaftlicher Kriterien Beurteilungen vorgenommen und - im Hinblick auf den Schutz der menschlichen Gesundheit - daraus Handlungsempfehlungen oder verbindliche Regelungen abgeleitet. Monforton (2006) hat die Problematik im Titel eines Artikels über die Bewertung von Dieselmotoremissionen folgendermaßen zusammengefasst: "Weight of the evidence or wait for the evidence?" (der Artikel befasst sich mit der in den USA durch Industrie-Einflüsse immer wieder verzögerten Anerkennung des Krebsrisikos durch Dieselmotoremissionen an Arbeitsplätzen).

Vor dem beschriebenen Hintergrund sei darauf hingewiesen, dass es das Datenmaterial nur sehr bedingt zugelassen hat, am Ende des Projektes in einer mathematisch-formalen Art und Weise Angaben zu "Sensitivität" und "Spezifität" der In-vitro-Methoden zu machen (siehe Abschnitte 3.2.1.2, 3.2.3.3 und 5.1 sowie "Kurzreferat"). Zu Beginn des Projektes waren aber die Methoden festzulegen, die - bei geeignetem Datenmaterial - eine solche formale Ermittlung von "Sensitivität" und "Spezifität" ermöglichen würden. Dieser methodische Ansatz ist nachfolgend beschrieben. Im Kern wurde folgender Weg beschritten: Die Ergebnisse der In-vitro-Versuche wurden qualitativ und/oder (semi-) quantitativ mit Referenzinformation verglichen. Als Referenzinformation wurden mehrere Quellen benutzt: Zum einen wurden die Ergebnisse von Inhalationsversuchen benutzt, so wie sie sind. D. h., dabei wurde versucht, die Prädiktivität von In-vitro-Versuchen in Relation zu Inhalationsversuchen zu ermitteln. Diese muss nicht notwendigerweise identisch sein mit der Prädiktivität im Hinblick auf die Gefährdung des Menschen. Zum zweiten wurden weitere Daten benutzt: epidemiologische Daten, soweit möglich, und die Ergebnisse aus anderen In-vivo-Tiermodellen wie intratrachealer Instillation und intraperitonealer Injektion. Am Ende wurde geprüft, inwieweit sich daraus ein möglichst widerspruchsfreies Gesamtbild zusammenfügen lässt.

2.3 Definition der Referenzinformation

2.3.1 Vorbemerkung

Die Auswertung nach Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Daten erfordert Konventionen und Definitionen über die Referenzinformation (s. 2.2). Dazu sind mehrere Detailfestlegungen erforderlich. Am Arbeitsplatz steht eine Gefährdung infolge inhalativer Aufnahme von Gefahrstoffen im Vordergrund und ist Gegenstand der vorliegenden Betrachtungen. Für die Beurteilung der Gefährdung des Menschen durch inhalative Aufnahme von Stäuben wurde unter den experimentellen Testsystemen der Inhalationsversuch an Ratten als route of choice oder als Gold-Standard bezeichnet (McClellan et al., 1992; Rossiter, 1994). Die vorliegende Auswertung musste daher in jedem Falle eine Analyse in Bezug auf die Ergebnisse aus Langzeit-Inhalationsversuchen an Ratten enthalten. Zusätzlich wurden Versuche mit intratrachealer und intraperitonealer Applikation bei Ratten und selbstverständlich auch epidemiologische Ergebnisse herangezogen. Die "Basis-Auswertung" für die Prädiktivität von In-vitro-Daten für karzinogene Wirkungen sollte hier die Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse in Bezug auf die Ergebnisse aus Langzeit-Inhalationsversuchen an Ratten sein. Dazu war festzulegen, was ein "positiver" und was ein "negativer" Inhalationstest ist bzw. wie die Wirkungsstärke ermittelt wird.

2.3.2 Definition der Testergebnisse und Wirkungsstärken aus Inhalationsversuchen zur Karzinogenität

Die erste Entscheidung zu Inhalationsversuchen, die zu treffen ist, bezieht sich auf die Tierspezies. Es ist üblich, die empfindlichste Spezies besonders zur Bewertung heranzuziehen (AGS, 2008), und es ist nicht üblich, anhand von negativen Befunden in *einer* Spezies positive Befunde in einer anderen Spezies "auszulöschen". Bei der Art der hier untersuchten Stoffe haben sich Ratten in der Regel als am empfindlichsten erwiesen, diese Daten wurden in aller Regel auch bei institutionellen Bewertungen grundsätzlich anerkannt (z. B. Baan, 2007; Greim und Ziegler-Skylakakis, 2007; Hartwig, 2009). Es ist daher nicht sinnvoll, die Inhalationsversuche mit *allen* Tierarten auszuwerten. Hamster haben sich gegenüber mehreren anerkannten Humankarzinogenen als besonders unempfindlich erwiesen, die Ergebnisse sind insofern klar

"falsch negativ"; verschiedene Mäusestämme haben unterschiedliche Empfindlichkeiten gezeigt (Mauderly, 1997; Roller et al., 2006). Mäuse haben zum Teil - im Ergebnis ähnlich "falsch negativ" wie Hamster - bei Partikelarten, die beim Menschen als Lungenkrebs erzeugend gelten, negative Kanzerogenitätstests für die Lunge ergeben. Dies gilt z. B. für die Nickelverbindungen (Nickeloxid, Nickelsubsulfid, Nickelsulfat) der Studien von NTP (1996a,b,c; Review bei Roller et al., 2006), Radon zusammen mit Trägerstaub aus Uranerz (C57BI/6J-Mäuse bei Groch et al., 1997; Review bei Roller et al., 2006) sowie für Quarz und Amphibolasbest (Review bei Mauderly, 1997). Zum Teil sind die Ergebnisse bei Mäusen wegen hoher Spontanraten schwer interpretierbar; so sind z. B. die Ergebnisse mit Chrom(VI)-Verbindungen von Nettesheim et al. (1971) und Adachi et al. (1986, 1987) und mit Cadmiumverbindungen von Heinrich et al. (1989) letztlich unklar. Dies ist bei Roller et al. (2006) erläutert. Auch mit Dieselruß gibt es bei verschiedenen Mäusestämmen positive und negative Ergebnisse, in Reviews werden die Ergebnisse mit Dieselruß bei Mäusen tendenziell als "negativ" bewertet (Hesterberg et al., 2005), Mauderly (1997) hat in seiner Table 4 bei diesel exhaust unter mouse ein "±" eingetragen. Bei Vanadiumpentoxid haben sich Mäuse als empfindlicher als Ratten gezeigt, und diese Daten wurden auch von IARC (2006) bevorzugt zur Einstufung herangezogen. Deshalb sind hier zu Vanadiumpentoxid auch die Daten von Mäusen aufgeführt. In der Regel werden hier aber die Daten von Langzeit-Versuchen an Ratten zugrunde gelegt (die Aussagekraft der Daten an Ratten wird im Kapitel "Diskussion" im Zusammenhang mit epidemiologischen und In-vitro-Daten eingehend erörtert).

Die Definition "positiver" und "negativer" Inhalationstest-Ergebnisse ist nicht trivial. Es gibt mehrere Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist es, die Interpretation der jeweiligen Studienautoren zu übernehmen. Von den Autoren wurden aber unterschiedliche Beurteilungskriterien benutzt. Eine andere Möglichkeit ist es, formal ein einheitliches Beurteilungsverfahren festzulegen, nach dem alle Studien beurteilt werden. Weiterhin ist es grundsätzlich möglich, jede Studie individuell unter Nutzung aller verfügbaren Information zu bewerten. Und schließlich gibt es die Möglichkeit, anstatt einer qualitativen Beurteilung nach positiv/negativ aus jeder Studie - auch aus formal "negativen" - eine Maßzahl der Wirkungsstärke zu berechnen. Dabei ist zu erwarten, dass sich bei formal negativen Studien ein niedriger Wert für die Maßzahl der Wirkungsstärke ergibt. Im Rahmen der vorliegenden Auswertungen wurde versucht, zweien dieser Strategien zu folgen. Zum einen sollte formal ein einheitliches Beurteilungsverfahren festgelegt werden, nach dem alle Studien beurteilt wurden. Dieses Verfahren sollte möglichst nahe an einem Konsens sein, der auch in Gremien der regulatorischen Toxikologie im Arbeitsschutz akzeptiert würde. Zum zweiten sollten Maßzahlen der Wirkungsstärke - unabhängig von einem statistischen Signifikanztest - berechnet werden. Bei der Wahl und Definition eines formalen Beurteilungsverfahrens sind mindestens die folgenden Entscheidungen zu treffen:

- Festlegung der Fragestellung (einseitig/zweiseitig)
- Festlegung des Signifikanzniveaus
- Wahl des statistischen Tests (Gruppenvergleich, Trendtest, Berücksichtigung von Überlebenszeiten)
- Definition des Endpunktes (Tumortypen)
- Definition der Versuchsgruppen (Geschlechter getrennt oder kombiniert, mitlaufende Kontrollgruppe oder kombinierte Kontrollen)

Alle diese Bedingungen können ein Testergebnis beeinflussen, Änderungen dieser Festlegungen können aus einem positiven Ergebnis ein negatives machen und umgekehrt. Einige der genannten Stichpunkte bieten eine Vielzahl von Definitionsmöglichkeiten, so dass sich in Kombination aller Punkte sehr viele Varianten ergeben können, aus denen letztlich im Sinne einer Konvention eine Variante auszuwählen ist, wenn ein einheitliches formales Kriterium für alle Inhalationsversuche gesucht ist.

Bei Karzinogenitätstests handelt es sich in aller Regel - und bei Prüfungen von Stäuben an Ratten in allen Fällen - um eine einseitige Fragestellung. Das heißt, es kann überhaupt nur die Frage geprüft werden, ob die Exposition das Tumorrisiko der Ratten erhöht. Die Prüfung der Frage, ob eventuell das Tumorrisiko infolge der Exposition gesenkt wird, ist wegen des relativ niedrigen spontanen Lungentumorrisikos der Ratten und der relativ kleinen Gruppengrößen von vornherein gar nicht möglich (eine Tumorhäufigkeit von 2 / 100 in der Kontrollgruppe kann in einer Testgruppe von 100 Tieren nicht statistisch signifikant erniedrigt sein: 0 / 100 ist von 2 / 100 nicht signifikant verschieden). Daher ist ein zweiseitiger statistischer Test nicht angezeigt.

In den vergangenen Jahren hat in der Toxikologie die Frage des multiplen Testens zunehmend Berücksichtigung gefunden. Das heißt, vor allem beim Beurteilen stetiger Größen (Körpergewicht, Enzymaktivitäten u. a.) werden häufig so genannte Posthoc-Tests verwandt, wenn mehrere Dosisgruppen gegen eine einzige Kontrollgruppe geprüft werden. Im Ergebnis bedeutet die Verwendung eines solchen Tests eine Verringerung des Signifikanzniveaus bei den einzelnen Dosisgruppen in Relation z. B. zu Student's t-Test. Manche Untersucher verwenden daher anstatt eines Post-hoc-Tests nach wie vor Student's t-Test, legen aber ein niedrigeres Signifikanzniveau als 5 % fest, z. B. 1 % oder 0.1 %. Bei Karzinogenitätsversuchen erfolgt in der Regel ebenfalls "multiples" Testen, hierbei ist es aber allgemein üblich, gleichwohl einen einfachen Test wie Fisher's Exact Test mit einem Signifikanzniveau von 5 % zu verwenden; dabei erfolgt keine Korrektur des Signifikanzniveaus trotz multiplen Testens. Ich halte dies auch für gerechtfertigt (im übrigen auch bei stetigen Größen, eine Begründung ist in Abschnitt 4.4 gegeben, eine nähere Betrachtung hier aber zunächst nicht notwendig, da bei Karzinogenitätsversuchen Fisher's Exact Test auf dem 5 %-Niveau akzeptiert ist). Daher liegt es nahe, für Karzinogenitätsprüfungen Fisher's Exact Test bei einseitiger Fragestellung und einem Signifikanzniveau von 5 % zu verwenden.

In den neueren NTP-Studien werden Poly-k-Tests verwendet, mit deren Hilfe unterschiedliche Überlebenswahrscheinlichkeiten in den verschiedenen Gruppen berücksichtigt werden sollen. Die Informationen über die Lebenszeiten aller einzelnen Tiere können aber in Zeitschriftenveröffentlichungen nicht genannt werden; daher eignet sich ein solcher Test nicht für die Literaturauswertung.

Die Auswahl der Tumortypen für den statistischen Test ist ein schwieriger Punkt. Bei Ratten werden insbesondere folgende histologische Typen von Lungentumoren beschrieben: Adenom, Adenokarzinom, Epitheliom, Plattenepithelkarzinom. Aus der Zusammenschau aller Ergebnisse ergibt sich kein Anhalt, dass ein bestimmter histologischer Typus von Lungentumoren nicht durch Partikelbelastung in der Rattenlunge induziert werden könnte. In den NTP-Studien sind bronchioloalveoläre Adenome und Adenokarzinome die häufigsten Tumortypen. In anderen Untersuchungen sind auch plattenepitheliale Tumoren als eindeutig substanzbedingt erkannt worden (Heinrich et al., 1995; Nikula et al., 1995; Mohr et al., 2006).

Die Frage kann in Einzelfällen durchaus von Bedeutung sein, ob man nur maligne Tumoren testet und auch ob man nur bronchioloalveoläre Tumoren (benigne plus maligne) testet. So traten z. B. in der NTP-Studie mit Nickeloxid bei den weiblichen Ratten als höchste Tumorhäufigkeit 6 Tiere mit primärem Lungentumor auf (Adenome und Karzinome kombiniert), in der Kontrollgruppe trat ein Tumortier auf; der Unterschied 6 / 53 versus 1 / 53 ist nicht signifikant (Kriterium für "Signifikanz": Fisher's Exact Test, einseitig, p < 0.05). Betrachtet man allerdings nur die malignen Tumoren und vernachlässigt die Adenome, dann folgt ein Vergleich von 5 / 53 versus 0 / 53 (ein Adenom, aber kein Karzinom in der Kontrollgruppe), der signifikant ist. Bei den männlichen Ratten derselben Studie ist es umgekehrt. Betrachtet man dort nur die malignen Tumoren, dann ergibt sich maximal eine Tumorhäufigkeit von 3 / 53, die im Vergleich zu 0 / 54 in der Kontrolle nicht signifikant ist. Kombiniert man dort Adenome und Adenokarzinome, erhält man 6 / 53 versus 0 / 54 mit Signifikanz. Berücksichtigt man aber alle primären Lungentumoren, d. h. die Kombination aller benignen und malignen Typen, dann geht die Signifikanz wieder verloren, weil in der Kontrollgruppe ein Plattenepithelkarzinom gefunden wurde; die Häufigkeit 6 / 53 versus 1 / 54 ist nicht signifikant. Es lässt sich nun trefflich darüber streiten, welche Vorgehensweise "richtig" ist. Ein im Sinne der Vorsorge "konservativer" Ansatz wäre es, dann nicht mehr von einem "negativen" Test auszugehen, wenn auch nur einer dieser statistischen Vergleiche Signifikanz signalisiert. Gegen die Bewertung eines solchen Versuchs als "positiv" mag sich aber aus der Sicht des Statistikers einer bestimmten Schule einwenden lassen, dass eine klare Fragestellung vor Versuchsbeginn festgelegt werden sollte und dass nicht nachträglich mit verschiedenen Tests und Vergleichen solange herumprobiert werden darf, bis sich irgendwo ein p-Wert kleiner als 0,05 ergibt; durch ein solches "multiples" Testen würde das tatsächliche Signifikanzniveau verändert (dies ist aber ein eigenes philosophisches Problem, siehe Kapitel 4).

Eine wesentliche Bedingung ist es ferner, ob die Versuchsgruppen nur mit der mitlaufenden Kontrollgruppe verglichen werden oder ob auch mehrere Kontrollgruppen zusammengefasst bzw. historische Kontrollen einbezogen werden. Während z. B. NTP (2002) die Studie mit Vanadiumpentoxid an Ratten trotz fehlender statistischer Signifikanz mit Hinweis auf historische Kontrollen als positiv bewertet hat, wurde es bei der "Negativ-Bewertung" der Inhalationsversuche mit Mineralwollen in den RCC-Laboratorien in den 1990er Jahren scharf abgelehnt, Kontrollgruppen in der statistischen Analyse zusammenzufassen (*"unfounded statistical analyses*", Rossiter und Chase, 1995).

Die Überlegungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Nach der Erfahrung des Autors in Arbeitsgruppen der regulatorischen Toxikologie im Arbeitsschutz scheint es weitgehend akzeptiert, das Ergebnis eines inhalativen Karzinogenitätstests mit Stäuben an Ratten unter statistischen Gesichtspunkten dann als "positiv" zu betrachten, wenn Fisher's Exact Test bei einseitiger Fragestellung im Vergleich zur mitlaufenden Kontrolle einen p-Wert kleiner als 0,05 ergibt und dabei folgende Definition von Endpunkt und Versuchsgruppe vorgenommen wurde: Kombination aller Tiere eines Geschlechts und einer Expositionsstufe mit mindestens einem histologisch eindeutig als primär diagnostizierten Lungentumor gleich welchen Typs. Das heißt, als statistisch-formales Kriterium zur Definition eines "positiven" inhalativen Karzinogenitätstests werden männliche und weibliche Tiere einer Expositionsgruppe jeweils getrennt gegen die mitlaufende Kontrolle getestet. Sofern nur Angaben über die Tierzahlen in Kombination der Geschlechter vorliegen, werden diese verwendet. Diese Definition wird hier als statistisch-formales Kriterium für einen Vergleich mit In-vitro-Daten verwendet. Für eine Stoffbewertung insgesamt ist selbstverständlich jeweils die gesamte Datenlage unter Berücksichtigung aller vernünftigen sachlogischen Aspekte zu betrachten.

In einem zweiten Ansatz werden hier Maßzahlen der Wirkungsstärke aus In-vivo-Daten angegeben. Für die Charakterisierung der karzinogenen Potenz über alle Inhalationsversuche mit festen Aerosolen (Stäube und Rauche) hinweg werden die Tumorhäufigkeiten auf die "normierte" Expositionskonzentration in der Einheit mg/m³ als Dosismaß bezogen. Für einzelne Stoffgruppen ist dies ganz sicher <u>nicht</u> das am besten adäquate Dosismaß: Unter Faserstäuben ist die Faserzahl als Dosismaß eingeführt (wobei allerdings international in der wissenschaftlichen Literatur keine Einigkeit über die Faserdefinition besteht), für die so genannten GBS hat sich das retinierte Staubvolumen als wichtiges Dosismaß gezeigt, bei karzinogenen Metallen sollte der Gehalt des jeweiligen Metallions angegeben werden. Ein Vergleich über alle diese einzelnen Stoffgruppen hinweg ist aber nur anhand eines Dosismaßes möglich, das allen gemeinsam ist.

2.3.3 Berechnungsweise von Wirkungsstärken (karzinogene Potenz)

Für quantitative Vergleiche ist es erforderlich. Maßzahlen der Wirkungsstärke zu berechnen. Im Hinblick auf krebserzeugende Wirkung wird die Wirkungsstärke auch als "karzinogene Potenz" bezeichnet. Eine einfache Maßzahl der karzinogenen Potenz ist der Quotient aus dem Prozentsatz tumortragender Tiere in einer Versuchsgruppe und der Dosis je Tier dieser Versuchsgruppe. Wenn also z. B. in einem Versuch mit intraperitonealer Injektion eine Dosis von 1 mg verabreicht wurde und es sind 10 % Tiere mit Tumor aufgetreten, dann lässt sich für diese Gruppe die karzinogene Potenz charakterisieren als 10 % / 1 mg = 10 % pro mg. Wenn eine andere Versuchsgruppe eine Dosis von nur 0.5 mg erhalten hat und es sind gleichwohl 10 % Tiere mit Tumor aufgetreten, dann errechnet sich diese karzinogene Potenz als 10 % / 0,5 mg = 20 % pro mg. Obwohl in beiden Gruppen dieselbe Tumorhäufigkeit aufgetreten ist, besteht Grund zu der Annahme, dass im zweiten Fall die karzinogene Potenz der Substanz größer war, weil eine niedrigere Dosis die Tumoren verursacht hat. Diese Denkweise bzw. Berechnungsweise erscheint mir naheliegend und einleuchtend und bedarf "eigentlich" keiner näheren Erläuterung. Wegen der insgesamt recht komplexen Diskussion in der modernen regulatorischen Toxikologie, in der mehrere Verfahren der Potenzberechnung, der Analyse von Dosis-Wirkungsbeziehungen und der Berechnung von Tumorrisikozahlen eine Rolle spielen, sei in diesem Abschnitt für Interessierte die genannte einfache Berechnungsweise erläutert und von anderen Verfahren abgegrenzt.

Der Quotient aus dem Prozentsatz tumortragender Tiere in einer Versuchsgruppe und der Dosis je Tier dieser Versuchsgruppe wird hier als einfache Maßzahl der karzinogenen Potenz auf der Informationsbasis dieser einen Versuchsgruppe berechnet. Mit diesem Quotienten ist grundsätzlich keine Aussage über den Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung bzw. Expositions-Risikobeziehung und über das Risiko bei einer anderen Dosis verbunden. Über diesen Charakter dieser Maßzahl muss man sich auch deshalb im Klaren sein, weil dabei rechnerisch leicht Werte von größer als 100 auftreten können. Es sei z. B. nach intraperitonealer Injektion von 0,1 mg Staub ein Prozentsatz von 20 % Tieren mit Tumor aufgetreten (die Tumorhäufigkeit unter sehr vielen Kontrolltieren sei Null oder kleiner als 1 %). Der Quotient aus Tumorhäufigkeit und Dosis beträgt dabei 20 % / 0,1 mg = 200 % pro mg. Bei oberflächlicher Betrachtung kann jetzt der Eindruck entstehen, hier gehe es um einen Prozentsatz von 200 %. Dieser Eindruck ist falsch, tatsächlich ist die Einheit des Quotienten nicht "Prozent", sondern "Prozent/mg" (ebenso wie die Einheit der Geschwindigkeit nicht in "km", sondern in "km/h" angegeben werden kann). Die Maßzahl 200 %/mg sagt aus. dass hier ein Stoff vorliegt, der mit einer größeren Wirkungsstärke als z. B. 50 %/mg wirksam war, sie sagt aber nicht aus, dass eine Dosis von 1 mg zu einer Tumorhäufigkeit von 200 % führen wird. Dies wäre eine Extrapolation, für die diese Potenz-Maßzahl nicht vorgesehen ist (die Ermittlung einer Geschwindigkeit von 200 km/h an einer einzelnen Mess-Stelle sagt nicht notwendigerweise aus, dass jemand innerhalb der nächsten Stunde genau 200 km zurücklegen wird).

Der Quotient aus dem Prozentsatz tumortragender Tiere in einer Versuchsgruppe und der Dosis je Tier dieser Versuchsgruppe ist hier nicht vorgesehen, um das Tumorrisiko für beliebige Dosiswerte zu berechnen. Es handelt sich nicht um quantitative Risikoabschätzungen oder um eine Ableitung von Expositions-Risikobeziehungen im Sinne des Leitfadens des AGS (2008). Für bestimmte Formen der Risikoableitung sieht der Leitfaden des AGS (2008) einen so genannten Point of Departure (POD) in Höhe eines Risikos von 10 % vor. Der Dosis- bzw. Expositionswert, der mit diesem Risiko verbunden ist, wird als BMD10 bezeichnet (Benchmark Dose, 10 % Risiko). Die BMD10 kann auch als Potenzmaß aufgefasst werden. Der Leitfaden zielt aber nicht auf die Ableitung eines Potenzmaßes in Form einer BMD10, sondern die BMD10 ist dort nur ein Schritt mit dem Ziel der Charakterisierung einer Expositions-Risikobeziehung über einen Bereich von einem Risiko von 4 zu 100.000 bis zu einem Risiko von 4 zu 1.000. Dabei muss zunächst eine Berechnungsmethode für die Bestimmung des POD (z. B. BMD10 oder T25) festgelegt werden, dabei stehen mehrere Rechenmodelle wie Multistage-, Gamma-Multihit- und Probitmodell zur Auswahl. Es muss dann ferner die Extrapolationsweise ausgehend vom POD (z. B. BMD10 oder T25) zu den Ziel-Risikowerten von z. B. 4 zu 100.000 gewählt werden. Auch hierfür sieht der Leitfaden verschiedene Optionen vor.

Als Maßzahl für die karzinogene Potenz könnte im vorliegenden Bericht ebenfalls die BMD10 oder ein ähnliches Maß berechnet werden, also ein Maß, das vordergründig Assoziationen zu dem Leitfaden des AGS (2008) schafft. Dies setzt aber zumindest voraus, dass eine Annahme über den Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung bzw. Expositions-Risikobeziehung getroffen wird. Es sei z. B. nach intraperitonealer Injektion von 1 mg Staub eine Tumorhäufigkeit von 50 % aufgetreten. Eine zweite Dosisgruppe für diesen Staub liege nicht vor. Das einfache Potenzmaß lautet: 50 % / 1 mg = 50 % pro mg. Zur Berechnung einer BMD10 ist ebenfalls diese Berechnung notwendig: 50 % / 1 mg = 50 % pro mg. Die Berechnungen enden aber bei der BMD10-Methode nicht an dieser Stelle, sondern der Wert 50 % pro mg ist nicht nur als Potenzmaß definiert, sondern es muss zusätzlich entschieden werden, ob er als Steigungsmaß einer linearen Dosis-Risikobeziehung zwischen 10 % und 50 % zu rechtfertigen ist. Falls dies bejaht wird, ergibt sich die BMD10 als 10 % / 50 % pro mg =

0,2 mg. Falls aber für einen Staub Daten von mehr als 1 Dosisgruppe vorliegen, z. B. von 3 Dosisgruppen, dann ist zur Berechnung der BMD10 eine nähere Analyse des Dosis-Risikoverlaufs notwendig. Es ergibt sich dann eine Mehrzahl von Entscheidungsfragen. Es muss dann z. B. entschieden werden, ob zur weiteren Berechnung dem Multistage-, dem Gamma-Multihit- oder dem Probitmodell der Vorzug gegeben wird. Falls sich z. B. für die drei Asbestarten Krokydolith, Amosit und Aktinolith jeweils die beste Anpassung für ein anderes der drei genannten Rechenmodelle ergäbe, wäre zu entscheiden, ob hier tatsächlich die formale Anpassungsgüte zum Kriterium der Modellauswahl gemacht wird (jeweils ein anderes Modell für jeden der drei Asbeste) oder ob es nicht eher plausibel ist, dass die drei Asbeste letztlich nach derselben Wirkungsweise karzinogen sind, dass daher auch für alle drei Asbeste dasselbe mathematische Dosis-Risikomodell anzunehmen ist und Unterschiede in der Anpassungsgüte nur auf der unvermeidbaren zufälligen Streuung biologischer Daten beruhen. Solche Fragen gehen weit über den Rahmen der aktuellen Untersuchung hinaus. Ihre (arbiträre) Beantwortung würde auch nicht zu einer größeren wissenschaftlichen Sicherheit bzw. "Unangreifbarkeit" der Ergebnisse beitragen, da sich erfahrungsgemäß stets auch Argumente für alternative Entscheidungen in solchen Detailfragen der Verfahrensweise finden.

Ziel des Leitfadens des AGS (2008) ist die Ableitung von Expositions-Risikobeziehungen für einzelne Stoffe oder Stoffgruppen im Hinblick auf die Grenzwertsetzung für diesen Stoff, unter Einbeziehung aller relevanten toxikologischen Information, also sowohl von In-vivo- als auch von In-vitro-Daten, zu diesem Stoff. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist ein anderes: Es geht unter anderem um einen Vergleich der mit einzelnen Versuchsgruppen einerseits in vivo und andererseits in vitro vorgefundenen Wirkungsstärke für viele Stoffe. Die Kriterien des Leitfadens zu mathematischen Berechnungsweisen sind daher auf die hier vorgesehenen Auswertungen nicht unmittelbar anwendbar. Das hier angewandte Verfahren der Berechnung eines einfachen Potenzmaßes als Quotienten aus dem Prozentsatz tumortragender Tiere in einer Versuchsgruppe und der Dosis je Tier dieser Versuchsgruppe steht nicht im Widerspruch zu dem Leitfaden; es hat eine Entsprechung in der dort vorgesehenen T25-Methode, es geht jedoch weniger weit als die T25-Methode des Leitfadens. Im Unterschied zu der T25-Methode des Leitfadens impliziert es zunächst nicht eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung (es ist lediglich ein Quotient). Vor dem Hintergrund mancher Diskussionen im Rahmen der regulatorischen Toxikologie mag das hier verwendete Dosismaß beim erfahrenen Leser eine lineare Extrapolationsrechnung nahelegen, dies ist aber nicht intendiert. Eine solche lineare Extrapolation mag in einzelnen Fällen durchaus angemessen sein, sie wird aber durch die bloße Angabe eines Risiko/Dosis-Quotienten hier weder vorweggenommen noch ausgeschlossen. Mit der Angabe eines BMD10- oder T25-Wertes wäre viel eher die Aussage einer linearen Dosis-Wirkungsbeziehung verbunden, weil dabei zwangsläufig eine (lineare) Extrapolationsstrecke vom experimentell festgestellten Prozentsatz zu dem Prozentwert von 10 oder 25 % enthalten ist. Abschließend hierzu noch folgende Erläuterung: Weil die Dosis-Risikobeziehungen über den gesamten Dosisbereich nie streng-linear sind (sondern entweder guantal-linear, sublinear oder superlinear) ergeben sich für verschiedene Dosiswerte eines Stoffes in der Regel unterschiedliche Werte für den Risiko/Dosis-Quotienten. Weil die Dosis-Wirkungsbeziehung zu höheren Dosiswerten stets abflacht, sind die Risiko/Dosis-Quotienten für die höheren Dosiswerte tendenziell niedriger; aussagestärker sind in der Regel die Werte des Risiko/Dosis-Quotienten, die bei den niedrigeren Dosen berechnet wurden (Roller et al., 1992).

3 Ergebnisse

3.1 Referenzinformationen

In den folgenden Abschnitten sind In-vivo-Daten zu Stäuben und Rauchen dargestellt, die als Bezugsinformation zum Vergleich mit In-vitro-Ergebnissen dienen können. Dabei ist die Darstellung nach drei "Familien" von Stoffen geordnet: 1. Faserförmige Stäube; 2. Karzinogene Metalle; 3. Alveolengängige granuläre biobeständige Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität (GBS), Nanomaterialien und sonstige Stäube. Ultrafeine Partikel oder Nanomaterialien können grundsätzlich jeder der 3 genannten Gliederungsgruppen angehören, "Nanomaterialien" sind aber speziell bei der 3. Gruppe zusammen mit "GBS" eingeordnet, weil dort auch die Daten der gezielt recherchierten neueren Publikationen betroffen sind und weil relativ viele der "Nanomaterialien" als "Nano-GBS" anzusehen sind. Die Begriffe "Nanopartikel" und "Nanomaterial" sind hier weit gefasst (siehe auch Abschnitt 2.1). Sie schließen sowohl isometrische als auch langgestreckte (Nanorods, Nanotubes) Partikel ein. Zweifellos würden im allgemeinen Verständnis des Begriffs "Partikel" auch "Fasern" mit einem Durchmesser von z. B. 0,5 Mikrometer und einer Länge von z. B. 20 Mikrometer als "Partikel" bezeichnet werden. So gab es z. B. in den 90er Jahren auch Bestrebungen in den USA, für mikroskopisch kleine, langgestreckte Teilchen anstatt des ansonsten für diese Teilchen gebräuchlichen Begriffs der fibers oder fibres den Begriff der respirable fibrous particles einzuführen (Vu et al., 1996). Dementsprechend können "Fasern" mit einem Durchmesser von z. B. 70 Nanometer und einer Länge von z. B. 15 Mikrometer als "Nanopartikel" bezeichnet werden. Nanorods und atembare Teile von Nanotubes fallen - unabhängig von technischen DIN- oder ISO-Definitionen - sowohl im allgemeinen Wortsinn als auch mit Blick auf die Toxikologie somit unter den Oberbegriff von Nanopartikeln. Ferner sind die Aggregate und Agglomerate ultrafeiner Primärteilchen hier in den Begriffen Nanopartikel und Nanomaterial eingeschlossen, weil es im Einzelfall sehr schwierig sein kann, den Aggregations- oder Agglomerationsgrad des Materials anzugeben, insbesondere was die Beständigkeit der Aggregation/Agglomeration im Körper bzw. biologischen Gewebe betrifft.

Es gibt auch Asbestfasern mit Durchmessern kleiner als 100 nm; diese Fasern wurden zwar nicht vom Menschen "synthetisiert", rein physikalisch erfüllen sie aber die Definition von "Nanomaterial". Pulver aus reinem Nickelmetall oder aus Nickeloxid können sowohl in Partikelgrößen über und unter 100 nm hergestellt werden; in jedem Falle ist dabei im Organismus eine karzinogene Wirkung freigesetzter Nickelionen zu erwarten, wenn man akzeptiert, dass Nickelionen ein karzinogenes Potential beim Menschen besitzen. Auch GBS können in unterschiedlichen Partikelgrößenverteilungen unbeabsichtigt entstehen oder beabsichtigt hergestellt werden, wobei bei GBS in allen Fällen eben keine bekannte signifikante substanzspezifische Toxizität zu erwarten ist. Als übergeordnetes Gliederungsprinzip werden daher hier solche biologisch relevanten Eigenschaften wie Partikelform (faserförmig versus granulär) und spezifische (chemische) Toxizität verwendet. Eine gegebenenfalls besondere Wirkungsstärke von ultrafeinen Teilchen oder Nanopartikeln ist zunächst innerhalb der Gruppen zu erfassen, sie kann abschließend zusammenfassend diskutiert werden.

Im beschriebenen Sinne relevante Informationen zur Toxizität und Karzinogenität generell von Stäuben und Rauchen liegen aus Inhalationsversuchen mit Ratten sowie aus Versuchen mit intratrachealer Instillation bei Ratten vor. Ferner ist zu erwähnen, dass GBS - im Gegensatz zu faserförmigen Stäuben und zu karzinogenen Metallen - nach intraperitonealer Injektion nicht zweifelsfrei zu erhöhten Tumorhäufigkeiten geführt haben (Daten in Tab. 3.4). Auch haben GBS - ebenso wie andere Aerosole (Nickelverbindungen, Cadmiumverbindungen, Quarz, Radon plus Uranerz) - bei Mäusen insgesamt zu nicht-positiven oder zweideutigen Tumorergebnissen geführt. Auf diese Ergebnisse wird hier nicht näher eingegangen (s. Abschnitt 2.3.2). Diese Daten sind in einer Gesamtbewertung der gesundheitsschädigenden Eigenschaften von GBS im Rahmen der regulatorischen Toxikologie zu diskutieren. Sie stellen aber für den vorgesehenen Vergleich mit In-vitro-Daten keine sinnvoll auswertbare Information dar. Daher wird hier nach demjenigen Grundsatz vorgegangen, der seit Jahrzehnten in der regulatorischen Toxikologie im Gebrauch ist: Zur Beurteilung einer möglichen Gefährdung des Menschen wird das empfindlichste Tiermodell besonders berücksichtigt. Sofern nicht zweifelsfrei klar ist, dass die in einem bestimmten Tiermodell beobachteten Tumoren einen für den Menschen irrelevanten speziesspezifischen Effekt darstellen, sind die bei einer Tierart beobachteten Tumoren als Gefahrenhinweis für den Menschen zu betrachten, auch dann wenn sich bei einer anderen Tierart diese Tumoren nicht oder in geringerer Häufigkeit zeigten. Anders ausgedrückt: Die in einer Tierart nachgewiesene Karzinogenität kann nicht durch das Fehlen eines solchen Nachweises in einer anderen Spezies ausgelöscht werden. Im übrigen wird die Aussagekraft der Daten aus Epidemiologie, Langzeit-Tierversuchen und In-vitro-Studien im Kapitel "Diskussion" im Zusammenhang erörtert.

3.1.1 Faserförmige Stäube

In den späten 1980er und frühen 1990er Jahren nahm die Diskussion um Karzinogenität von künstlichen Mineralfasern (allgemeiner: respirable fibrous particles) relativ breiten Raum in der regulatorischen Toxikologie ein. Zu jener Zeit lagen bereits mehrere Inhalationsversuche mit künstlichen Mineralfasern und strukturell verwandten Staubarten, insbesondere Asbest, vor. Die Versuche wurden aber hinsichtlich ihres Designs, insbesondere der Aerosolgenerierung und -charakterisierung kritisiert. Mit finanziellen Mitteln der betroffenen Industrien wurde daher in den Labors der Research and Consulting Company (RCC) in Genf eine besonders aufwendige Reihe von Inhalationsversuchen durchgeführt, die als Stand der Technik gelten und in einem Teil der Literatur als Gold Standard bezeichnet wurden. Die Daten dieser Versuche sind hier in Tab. 3.1 zusammengefasst. Auf die Wiedergabe des Großteils der älteren, seinerzeit kritisierten, Versuche mit Asbesten wird hier verzichtet. Mit diesen Daten befasste sich seinerzeit ein eigenes umfangreiches Projekt der damaligen Bundesanstalt für Arbeitsschutz (BAU, Dortmund), auf dessen Abschlussbericht hier verwiesen wird (Pott und Roller, 1993). Tab. 3.2 enthält weitere Daten späterer Versuche der Arbeitsgruppe von Davis, wobei zum Vergleich beispielhaft einige Daten früherer Versuche mit aufgenommen sind. Dort sind auch die Daten eines Versuchs mit Kaliumoktatitanatfasern aufgenommen, weil solche Hochleistungskeramikfasern (so genannte Whiskers) später auch in In-vitro-Versuchen geprüft wurden.

Besondere wirtschaftliche Bedeutung haben so genannte Mineralwollen (= Dämmwollen = Isolierwollen), die im Hausbau zu Isolierungszwecken verwendet werden. Die Faserarten MMVF 10, 11, 21 und 22 der Tab. 3.1 wurden seinerzeit als "typisch" für Stäube aus Glaswollen (glass wool), Steinwolle (rock wool) und Schlackenwolle (slag wool) von der produzierenden Industrie ausgewählt; die Aerosole wurden mit dem Ziel der Simulation arbeitsplatztypischer Fasergrößenverteilungen generiert. Alle diese Faserarten haben gemeinsam, dass die Partikel aus glasigem Material bestehen und die mittlere Faserdicke bei ungefähr 1 µm liegt. Die als Glas-, Steinund Schlackenwolle bezeichneten Materialien unterscheiden sich in der Wahl des Ausgangsmaterials: Bei Glaswolle werden Mischungen aus in der Glasindustrie üblichen Rohstoffen verwendet, bei Steinwolle wird natürliches Gestein, bei Schlackenwolle Hochofenschlacke verwendet. Die Endprodukte können dabei, auch hinsichtlich ihrer Elementzusammensetzung, sehr ähnlich sein. Die in Tab. 3.1 als RCF 1, 2, 3 und 4 bezeichneten Faserarten gehören chemisch/physikalisch grundsätzlich in dieselbe Substanzgruppe, auch dabei handelt es sich um glasige Materialien mit mittleren Faserdicken von rund 1 um. Sie unterscheiden sich jedoch von den übrigen Glaswollen durch einen besonders hohen Aluminiumgehalt und einer besonders hohen Temperatur- und Bio-Beständigkeit. RCF ist die Abkürzung für refractory ceramic fibers; zu Deutsch auch kurz als "Keramikfasern" bezeichnet, wobei aber auf die Unterscheidung zu kristallinen Keramikfasern (Whiskers) zu achten ist. Man kann RCF auch als Aluminiumsilikatwollen bezeichnen. RCF und die anderen MMVF (man made vitreous fibers) der Tab. 3.1 wurden von verschiedenen Firmen hergestellt.

Exposition, Faserzahl in der getrockneten Lunge, Tumorhäufigkeit (Lunge, Mesotheliom) und Fibrosegrad nach Inhalation von Faserstaub. Versuchstiere: Männliche Goldhamster, männliche F344/N-Ratten. Alle Versuche liefen in den RCC-Laboratorien, Genf (Zusammenstellung wie bei Pott et al., 1995; Tabelle über zwei Seiten; Fußnoten beginnend auf zweiter Seite der Tabelle) Tab. 3.1

Fasertyp	Expositi	on ^a	Abmes., N	/ledian [µm]	Faserz./µc	3 Lu.trg. ^{b,d}		Tier	zahl		Tumor-	Fibrose-
(Material)	Staubmasse [mg/m³]	Fasern ^b per mL	Länge ^c	Durchm. ^c	52 Wo	104 Wo	expon. ^e	Tum. d Aden.	. Lunge Karz.	Meso- theliom	häuf. ^f %	grad ^g ; 24 Mon.
(1) Hamster (McConne	ell et al., 1995); I	aufzeit Mitt	te 1988 - M	litte 1990 (He	sterberg, 16	<u> 3</u> 91)						-
Reinluftkontrolle	I	:	:	:			106	0	0	0	0	1,0
RCF 1 (Kaolin) ⁿ	29,2	215 ^{1,J}	16,4 ^{1,J}	0,79.1	192.	159.	102	0	0	42	41,2 *	4,0
Chrysotil	10,79	3000 ^{1,J}	0,89 ^{1,J}	0,07 ^{1,J}	1550 ^{1,J}	1650 ^{1,J,I}	49	0	0	0	0	5,0
(2) Ratten (Mast et al.,	, 1995a); Laufze	it Mitte 1988	8 - Ende 19	190 (Hesterbe	irg, 1991)							
Reinluftkontrolle	I		-		-	-	130	2	0	0	1,5	1,0
Chrysotil	10,1	10600 ^K	0,9 ^K .	0,08 ^K	2390 ^K	2810 ^K	69	7	9	1	20,3 *	4,0
RCF 1 (Kaolin)	29,1	187 ¹	16,8 ^J	0,85	272	275	123	8	8	2	14,6 *	4,0
RCF 2 (AI-Zr-Si)	28,9	220	13,0	0,89	402	693.	121	4	5	3	10,7 *	4,0
RCF 3 (AI-Si)	29,2	182 ¹	18,6 ^J	0,88	212	176	121	10	6	2	15,7 *	4,3
RCF 4 (Kaolin a.s.)	30,1	153	9,6 ^J	1,24 ^J	148	348	118	2	2	1	4,2	3,8
(3) Ratten (Mast et al.,	, 1995b); Laufze	it Mitte 1989	9 - Ende 19	91 (Hesterbe	irg, 1991)							
Reinluftkontrolle	I						129	1	0	0	0,8	1,0
RCF 1 (Kaolin)	3,0	26.	13,4 []]	0,84	29,3	43'.	123	2	0	0	1,6	3,2
RCF 1 (Kaolin)	8,8	75'.	14,4 []]	0,84	91,4	156	127	4	1	1	4,7	4,0
RCF 1 (Kaolin)	16,5	120	13,8 ^J	0,87 ^J	122	221	124	1	1	0	1,6	4,2
(4) Ratten (Hesterberg) et al., 1993); Lí	aufzeit Herb	ist 1989 - F	rühjahr 1992	(Hesterber	g, 1991)						
Reinluftkontrolle	I	ı	I	1			123	3	L	0	3,3	1,0
Glas MMVF 10	3				19.	24 []] .	117	0	0	0	0	2,2
Glas MMVF 10	16			•	87 ^J .	185 []]	118	1	0	0	0,8	2,7
Glas MMVF 10	29,1	232	12,5 ¹	1,33 ^J	171 ^J	288	119	9	1	0	5,9	3,0
Glas MMVF 11	3				29 [.]	48 ^J .	118	3	1	0	3,4	2,5
Glas MMVF 11	16				183.	235	120	9	3	0	7,5	2,7
Glas MMVF 11	28,9	246	13,3	0,68 ^J	277	503	112	3	0	0	2,7	2,5

Exposition, Faserzahl in der getrockneten Lunge, Tumorhäufigkeit (Lunge, Mesotheliom) und Fibrosegrad nach Inhalation von Faserstaub (Fortsetzung) Tab. 3.1

Fasertyp	Expositi	on ^a	Abmes., N	/dedian [µm]	Faserz./µc	a Lu.trg. ^{b,d}		Tier	zahl		Tumor-	Fibrose-
(Material)	Staubmasse	Fasern ^b	2000	0	C 1010		9	Tum. d.	Lunge	Meso-	häuf. ^f	grad ^g ;
	[mg/m ³]	per mL	Larige		011 20	104 000	expoll.	Aden.	Karz.	theliom	%	24 Mon.
(5) Ratten (McConnel	l et al., 1994); La	ufzeit Herb	st 1990 - Fr	-ühjahr 1993	(Hesterberg	I, 1991).						
Reinluftkontrolle	1				5,7!	0,6	126	2	0	0	1,6	1,0
Krokydolith	10	1610	3,8 ¹ .	0,30	1850 ^{I,m}	759 ^{1,n}	106	10 ^q	2 ^d	1	14,2 *	4,0 ^Γ
Stein MMVF 21	3	34 ¹ .	12,6 ¹	0,96	55'.	56'.	114	4	1	0	4,4	2,2
Stein MMVF 21	16	150	15,5 ¹	0,92 ¹	210	217	115	4	1	0	4,4	4,0
Stein MMVF 21	30	243	•	1,10	319	242	114	4	1	0	4,4	4,0
Schlacke MMVF 22	3	30'.	12,1	0,82 ¹	23 ¹ .	44.	116	٢	1	0	1,7	2,0
Schlacke MMVF 22	16	131	13,1	0,84 []]	144	97 ¹ .	115	0	0	0	0	2,2
Schlacke MMVF 22	30	213	15,5 ¹	0,85 ^J	225	177	115	2	1	0	2,6	2,8
a		10 101 101										

Exposition: 6 h/d, 5 d/Wo ; Ratten 104 Wo. (Krokydolith 44 Wo.); Hamster 78 Wo.

^b WHO-Faserdefinition

Fasergrößen; zur Methode der Fasergrößenmessung vgl. Fußnoten i, j, k (ist mehr als eine dieser Fußnoten angegeben, geht die Messmethode aus der Literatur nicht eindeutig hervor) с σ

Messung nach 12- und 24monatiger Exposition ohne Erholungszeit mit Ausnahme von Krokydolith (s. Fußnoten m, n), MMVF 21 (Fußnote p) und Hamstern Fußnote I)

Anzahl der Tiere mit mindestens 52 wöchiger (Ratten) bzw. 40 wöchiger Expositionszeit (Hamster)

näufigkeit wurde von einem Tumortyp je Tier ausgegangen. Aus der Literatur geht dagegen nicht hervor, ob die angegebenen Tumorzahlen auch der Zahl der Tiere mit Tumor entsprechen oder ob bei einigen Tieren mehr als ein Tumortyp diagnostiziert wurde. Das Sternchensymbol * zeigt statistische Signifikanz an (p Ratten mit Lungenadenom werden bei der Berechnung der Tumorhäufigkeit mit den bösartigen Tumoren zusammengefasst. Bei der Berechnung der Tumor-< 0,05)

Einteilung des Grads der Veränderungen: 1: Keine Läsion; 2 und 3: Zelluläre Veränderungen; 4 bis 8: Fibrosegrade von minimal bis sehr schwer

RCF = Abkürzung für refractory ceramic fibres

പെ

Lichtmikroskopie (unterschätzt die Konzentration von Asbestfasern wesentlich)

Rasterelektronenmikroskopie

×

Transmissionselektronenmikroskopie

nach 18 Mon. Exposition ohne Erholungszeit

Nach 10 Mon. Ende der Exposition, Faserkonzentration nach 2 Mon. Erholung

- Nach 10 Mon. Ende der Exposition, Faserkonzentration nach 14 Mon. Erholung
- Exposition 12 Mon., Faserkonzentration nach 12 monatiger Erholung Persönl. Mitteilung von Dr. McConnell vom 04.07.95 zitiert in Pott et al. (1995): Bei einem Tier wurde ein Adenom und ein Karzinom diagnostiziert.
 - Nach 10 Mon. Ende der Exposition, Fibrosegrad nach 0, 2, 8 und 14 Mo. Erholungszeit

Ergebnisse von weiteren Langzeit-Inhalationsversuchen an Ratten mit Asbest, Erionit und künstlichen Mineralfasern. Tab. 3.2

Faserstaub	Ko	nzentration	Expositio	nsdauer	Tumorhäufiç	jkeit ^a	1. Autor
(Material)	["m/ɓm]	Fasern L > 5 µm [10 ⁶ /m ³]	ow/h	Monate	z (ш) u	%	
Chrysotil Kanada "lang"	10	5510/1930 ^b	7 × 5	12	22 (2) / 40 W	55,0 *	
Chrysotil Kanada "kurz"	10	1170/330 ^b	7 × 5	12	7 (0) / 40 W	17,5 (*)	
Amosit "lang"	10	2060/1110 ^b	7 × 5	12	13 (2) / 40 W	32,5 *	
Amosit "kurz"	10	70/12 ^b	7 × 5	12	0 (0) / 42 W	0	
Erionit	10			12	27(27) / 28 F	96,4 *	Wagner 1985
SiC-Fasern (dünn)	n.a.	984 PCOM	7 x 5	12	16 (10) / 42 W	38,1 *	Davis 1996
Glasfasern 104E (dünn)	n.a.	1022 PCOM	7 x 5	12	11 (2) / 43 W	25,6 *	Cullen 2000
Glasf. 100/475 (dünn)	n.a.	1119 PCOM	7 x 5	12	4 (0) / 38 W	10,5	Cu.00, Da.96
Amosit	n.a.	981 PCOM	2 X 2	12	17 (2) / 42 W	40,5 *	Cu.00, Da.96
Kontrolle					2 (0) / 38 W	5,3	Cullen 2000
Kaliumoktatitanatfasern, Fy-	62	2910	6 X 5	З	1 (0) / 21 SD	4,8	
bex, U = 0,2 µm	68	2940	6 X 5	З	0 (0) / 21 SD	0,0	
	82	13490	6 X 5	З	3 (0) / 25 SD	12,0 *	
	371	41760	6 X 5	З	1 (0) / 19 SD	5,3	Lee 1981,
Kaliumtitanat PKT	23	2000	6 X 5	З	0 (0) / 20 SD	0,0	1984
Glasfaser, D = 1,2 µm	424	730	9 X 9	8	2 (0) / 19 SD	10,5	
Amosit UICC, D = 0,4 µm	300	3090	9 X 9	3	3 (0) / 16 SD	18,8 *	
Kontrolle					0 (0) / 42 SD	0,0	

- n = Tiere mit Lungentumor oder Mesotheliom (m = davon Tiere mit Mesotheliom); z = Zahl der untersuchten Tiere F = Fischer-Ratten; SD = Sprague-Dawley-Ratten; W = Wistar-Ratten Das Sternchensymbol * zeigt statistische Signifikanz an (p < 0,05). Faserzahl betrifft Fasern mit Längen > 10 µm und Durchmessern < 1 µm im Aerosol PCOM = Phasenkontrastmikroskopie

g

- م

Substanz	Anz.	Masse	Instillierte	Anzah	Ratten	% Ratten	Potenz ^a
	Instill.	pro Inst.	Masse, gesamt [mg]	m.Tum.	unters.	m. Tum.	[% pro mg]
		Po	tt et al. (199 ²	1a)			
Glasfasern M-104/475	10	0,5	5	1	55	1,8	0,36
Glasfasern M-104/475	20	0,5	10	5	38	13,2	1,32
Rock wool	10	0,5	5	0	59	0,0	0,00
Rock wool	20	0,5	10	0	40	0,0	0,00
Tremolit	5	0,5	2,5	1	38	2,6	1,05
Tremolit	20	0,5	10	3	37	8,1	0,81
Erionit	5	0,5	2,5	1	39	2,6	1,03
Erionit	15	0,5	7,5	2	40	5,0	0,67
Siliziumkarbid-Whiskers	10	0,5	5	9	37	24,3	4,86
Siliziumkarbid-Whiskers	20	0,5	10	12	39	30,8	3,08
		Po	ott et al. (198	7)			
Krokydolith, Südafrika	20	0,5	10	15	35	42,9	4,29
Glasfasern 104/475	20	0,5	10	5	34	14,7	1,47
NaCl-Lösung	20	0	0	0	40	0,0	

Tab. 3.3Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intratrachealer Instillation
von Asbest, Erionit und künstlichen Mineralfasern bei Wistar-Ratten.

^a Erläuterung siehe Abschnitt 2.3.3

Tab. 3.2 enthält Daten von Versuchen mit Glasfasern (104E, 104/475), die wie die Glaswollen als glasiges Material aus Rohstoffen der Glasindustrie hergestellt wurden. Sie unterscheiden sich von den MMVF-Stäuben durch einen kleineren mittleren Durchmesser der Fasern im Aerosol. Die technische Verwendung solcher Materialien ist anders als bei Glaswollen, sie wurden auch als *special-purpose glass fibers* oder Mikroglasfasern bezeichnet. Die chemische Zusammensetzung von Glaswollen und *special-purpose glass fibers* kann wiederum sehr ähnlich sein. Die als SiC (Silizium-karbid) und als Kaliumoktatitanatfasern in Tab. 3.2 ausgewiesenen Fasern können als Keramikfasern bezeichnet werden, dieses Material ist jedoch nicht glasig, sondern kristallin. Die SiC-Fasern sind relativ dünn, ähneln in dieser Hinsicht eher den *special-purpose glass fibers*, und werden wegen der kristallinen Struktur auch *Whiskers* genannt.

Statistische Signifikanz einer Erhöhung der Tumorhäufigkeit im Vergleich mit der mitlaufenden Kontrollgruppe ist in den Tabellen 3.1 und 3.2 mit dem *-Symbol bei dem Prozentsatz angezeigt. Folgende Faserarten führten in diesem Sinne zu statistisch signifikanten Ergebnissen: alle geprüften Asbestarten, Erionit, Siliziumkarbid-Whiskers*, dünne Glasfasern (special-purpose glass fibers) sowie Keramikfasern RCF. Dagegen führte keine der MMVF in diesem Sinne zu einem "positiven" Testergebnis. Die Unterschiede zwischen positiven und negativen Testergebnissen erscheinen mit Ausnahme der RCF plausibel bei Betrachtung der eingesetzten Faseranzahl-Konzentrationen erklärbar. Bei allen Staubarten mit relativ dünnen Fasern lag die Faserkonzentration in mindestens einer Versuchsgruppe bei 1.000 Fasern pro mL Luft oder höher. Dann war der Test - bei einer Expositionsdauer von mindestens einem Jahr - regelmäßig positiv. Dabei ist es gleichgültig, ob es sich um kristallines Material (Asbest, Erionit, SiC) oder glasiges Material (special-purpose glass fibers) handelt. Bei den MMVF lag die Faserkonzentration in keiner Versuchsgruppe höher als 250 Fasern/mL. Falls sonst keine Informationen zur Karzinogenität von faserförmigen Stäuben vorliegen würden, dann könnte dieses Ergebnis auf mindestens drei alternative (sich gegenseitig ausschließende) Arten interpretiert werden: 1. MMVF haben dieselbe karzinogene Potenz wie Asbest, aber aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens der üblichen Inhalationsversuche liegt die Tumorhäufigkeit bei einer Faserkonzentration von weniger als 250 F/mL unterhalb der Nachweisgrenze. 2. MMVF haben im Inhalationstest bei Ratten eine höhere karzinogene Potenz als Asbest, dies drückt sich darin aus, dass statistische Trendtests trotz der vergleichsweise niedrigen Exposition "positive" Ergebnisse signalisieren (Infante et al., 1994; Pott et al., 1995; Roller und Pott, 1998). 3. MMVF besitzen kein relevantes karzinogenes Potential.

Die Autoren der Versuche mit MMVF gemäß Tab. 3.1, die als Mitarbeiter oder Berater der MMVF-produzierenden Industrie tätig waren, interpretierten die Ergebnisse der Inhalationsversuche bei RCC als valide "negativ", d. h. im Sinne der o.g. 3. Möglichkeit. Dabei wurden die Versuche als "best model for assessing potential risk to man" oder als Gold Standard bezeichnet (McClellan et al., 1992; Hesterberg et al., 1993). Die Versuche mit RCF wurden später von Autoren, die als Mitarbeiter oder Berater der RCF-produzierenden Industrie tätig waren, nicht als Gold Standard bezeichnet, sondern das statistisch signifikante, "positive" Ergebnis mit RCF wurde als Folge eines unspezifischen Überladungsphänomens bei den Ratten interpretiert (Brown et al., 2005). In der Tat sind die Tumorhäufigkeiten in den Versuchen mit RCF 1. 2 und 3 überraschend hoch und in Relation zu den anderen Ergebnissen durch die Höhe der Faserkonzentration nicht zu erklären. Anstatt eines Überladungseffektes könnte aber auch eine höhere karzinogene Potenz der relativ dicken RCF-Fasern, eventuell in Verbindung mit einer im Vergleich zu MMVF höheren Beständigkeit, eine Rolle spielen. Dies ist bei Roller und Wardenbach (2003) diskutiert. Meines Erachtens ist die Höhe der Tumorhäufigkeiten in den Inhalationsversuchen mit RCF bei Ratten (sowie überraschenderweise auch bei Hamstern) wissenschaftlich bis

^{*} Schwierig zu bewerten sind die Ergebnisse von Lee et al. (1981) sowie Lee und Reinhardt (1984) mit Kaliumoktatitanatfasern ("Hochleistungskeramikfasern" wie die SiC-Fasern). In dem Versuch waren die Tiergruppen klein, die Expositionsdauer und auch die Beobachtungsdauer (18-24 Mon.) waren relativ kurz. Drei Tiere mit Tumor unter 25 untersuchten Tieren sind im Vergleich mit 0 / 42 statistisch signifikant, aber gerade an der Grenze (p = 0,048), und bei der höheren Exposition findet sich keine höhere Tumorhäufigkeit (gleichzeitig ist in dieser Versuchsreihe aber auch die Tumorhäufigkeit mit dem Amphibolasbest Amosit relativ niedrig).

heute nicht geklärt. Die Veröffentlichungen von Brown et al. (2005) und weitere Aktivitäten der Autoren aber haben dazu geführt, dass die Inhalationsergebnisse mit RCF bei der Ableitung einer Expositions-Risikobeziehung für künstliche Mineralfasern gemäß Bekanntmachung für Gefahrstoffe 910 in den Gremien des Ausschusses für Gefahrstoffe nicht benutzt wurden (Begründungspapier für den Ausschuss für Gefahrstoffe "Expositions-Risiko-Beziehung für Künstliche Mineralfasern", 2008, unveröffentlicht).

Der Grundgedanke bei Brown et al. (2005) ist insofern zutreffend, als in der Lunge von Ratten nicht nur faserförmige Partikel, sondern auch granuläre bio-beständige Partikel im Prinzip jeder Art zu Tumoren führen. Es ist daher im Einzelfall stets fraglich, welchen Anteil beständiger granulärer Staub als "Verunreinigung" eines Faser-staubs an der Lungentumorentstehung nach Faserexposition von Rattenlungen trägt. Dies gilt auch für die Ergebnisse nach intratrachealer Instillation. Die Daten nach intratrachealer Instillation in Tab. 3.3 werden hier als ergänzende Information zur Ermittlung der Rangfolge der auf die Staubmasse bezogenen karzinogenen Potenz in der Rattenlunge - auch im Vergleich mit GBS - mitgeführt. Die Tabellen 3.5 und 3.6 zeigen Daten und die Ergebnisse, die im Arbeitskreis Fasern/Staub für die karzinogene Potenz bezogen auf die Faserzahl anhand von Versuchen mit intraperitonealer Injektion ermittelt und als relative karzinogene Potenz für die Erstellung von Expositions-Risikobeziehungen benutzt wurden (Begründungspapier für den Ausschuss für Gefahrstoffe "Expositions-Risiko-Beziehung für Künstliche Mineralfasern", 2008, unveröffentlicht).

Die Verabreichungsarten der intratrachealen Instillation, der intraperitonealen Injektion und auch der intrapleuralen Implantation werden gelegentlich als "unphysiologische Applikation" bezeichnet, weil der Mensch in der Regel über diese Pfade nicht exponiert ist (die Problematik der Asbestverunreinigung in Lösungen zur Peritonealdialyse, die vor Jahren Gegenstand einer Diskussion mit dem damaligen Bundesgesundheitsamt war, betrifft nicht die Exposition am Arbeitsplatz). Eine nüchterne Betrachtung der Zusammenhänge zeigt aber, dass der Umstand, dass der Mensch im Alltag über diese Pfade nicht exponiert ist, einem Erkenntnisgewinn über das karzinogene Potential und auch über karzinogene Potenzen im Verhältnis zu Referenzsubstanzen (wie z. B. Asbest) nicht entgegensteht (siehe z. B. Pott und Roller, 1994). Außerdem ist klar, dass die vorhandenen In-vitro-Daten (mit "unphysiologischer" Exposition einzelner Zellen) gar nicht betrachtet werden müssen, wenn man bereits In-vivo-Ergebnisse, die sich nicht exakt auf dieselbe Expositionsweise wie beim Menschen beziehen, als nicht aussagefähig bewertet. Im Falle der faserförmigen Stäube haben z. B. umfangreiche Versuche von Stanton et al. (1981) mit intrapleuraler Implantation und noch umfangreichere Daten nach intraperitonealer Injektion wesentlich zu der Schlussfolgerung geführt, dass die karzinogene Potenz faserförmiger Stäube nicht von der Kristallinität oder Herkunft oder vom technischen Verwendungszweck des Materials abhängt, sondern vor allem von der Länge und Bio-Beständigkeit der Fasern. Es würde hier zu weit führen, sämtliche derartigen Befunde im Einzelnen aufzuführen (Übersicht bei Pott und Roller, 1993). Beispielhaft und als Bezugsgröße für einige Vergleiche mit In-vitro-Ergebnissen sind in den Tab. 3.4-3.6 Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Pott mit dem Intraperitonealtest aufgeführt. Diese Daten sind besonders für Vergleiche geeignet, weil dort eine sehr große Zahl verschiedener Stäube - faserförmig und granulär - nach einem relativ einheitlichen Versuchsdesign (z. B. mindestens zweieinhalb Jahre Versuchsdauer) geprüft wurde.

Tab. 3.4Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
von Asbest und anderen faserförmigen sowie granulären Stäuben bei
Ratten (Arbeitsgruppe von Pott; Tabelle über mehrere Seiten).

Substanz	Parti-	Dosis	Tumorhäu	ıfigkeit	Potenz ^c
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^b	%	[%/mg]
Pott et al. (1976)					
Attapulgit (Palygorskit)	f	75	26/34	76,5	1,02
Chrysotil A UICC	f	2	6/37	16,2	8,10
Chrysotil A UICC	f	6,25	27/35	77,1	12,34
Chrysotil A UICC	f	25	25/31	80,6	3,22
Chrysotil A UICC	f	100	18/33	54,5	0,55
Chrysotil A UICC gemahlen	f	100	12/37	32,4	0,32
Gipsfasern	f	100	2/35	5,7	0,06
Glasfasern MN104	f	2	20/73	27,4	13,70
Glasfasern MN104	f	10	41/77	53,2	5,32
Glasfasern MN104	f	50	55/77	71,4	1,43
Glasfasern MN112	f	20	14/37	37,8	1,89
Glasfasern S+S106	f	2	1/34	2,9	1,45
Glasfasern S+S106	f	10	4/36	11,1	1,11
Glasfasern S+S106	f	100	23/32	71,9	0,72
Nemalith	f	100	25/34	73,5	0,74
Aktinolith	g	100	0/39	0,0	0,00
Biotit	g	100	0/37	0,0	0,00
Hämatit	g	100	0/38	0,0	0,00
Hämatit	g	100	0/34	0,0	0,00
Korund	g	50	3/37	8,1	0,16
Pectolite	g	100	1/40	2,5	0,03
Sanidine	g	100	1/39	2,6	0,03
Talkum	g	100	1/36	2,8	0,03
NaCI-Lösung	0	0	0/72	0,0	
Pott et al. (1984)					
Amosit	f	2	0/43	0,0	0,00
Amosit	f	10	8/44	18,2	1,82
Chrysotil Can., UICC	f	0,4	9/44	20,5	51,13
Chrysotil Can., UICC	f	2	26/44	59,1	29,55

Substanz	Parti-	Dosis	Tumorhäu	ufigkeit	Potenz ^c
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^b	%	[%/mg]
Pott et al. (1984, Fortsetzung)			-		
Chrysotil Can., UICC	f	10	35/44	79,6	7,96
Glasfasern JM 100	f	2	2/44	4,6	2,28
Glasfasern JM 104, 1 h gemahlen	f	10	27/37	73,0	7,30
Glasfasern JM 104, 2 h gem.	f	2	14/44	32,0	16,00
Glasfasern JM 104, 2 h gem.	f	10	29/44	66,0	6,60
Glasfasern JM 104, 4 h gem.	f	10	19/39	48,7	4,87
Glasfasern JM100	f	2	2/44	5,0	2,50
Krokydolith UICC, verändert	f	10	15/43	34,88	3,49
Schlackefasern	f	5	2/41	5,0	1,00
Steinfasern Basalt	f	5	4/45	9,0	1,80
Korund	g	2	1/45	2,0	1,00
TiO ₂	g	5	0/50	0,0	0,00
Pott et al. (1987)					
Aktinolith, FRG	f	0,3	23/29	79,3	264,37
Aktinolith, FRG	f	0,5	54/59	91,5	183,06
Aktinolith, FRG	f	2,5	30/45	66,7	26,67
Anthophyllith, UICC	f	2	4/37	10,8	5,41
Anthophyllith, UICC	f	10	17/39	43,6	4,36
Chrysotil Calidria	f	0,5	2/32	6,3	12,50
Chrysotil UICC/A	f	6,00	26/34	77,1	12,85
Chrysotil UICC/A	f	25,00	25/31	80,6	3,22
Chrysotil HCI-behandelt	f	25,00	0/40	0,0	0,00
Chrysotil UICC/B	f	1	27/32	84,4	84,38
Chrysotil UICC/B + PVNO	f	1	24/30	80,0	80,00
Eisenoxidhydrat gamma	f	135	21/111	18,9	0,14
Erionit, Oregon	f	0,5	15/31	48,4	96,80
Erionit, Oregon	f	2	28/31	90,3	45,15
Erionit, Türkei	f	1,25	38/53	71,7	57,36
Erionit, Türkei	f	5	34/48	70,8	14,17
Erionit, Türkei	f	5	43/53	81,1	16,23

Tab. 3.4Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
(Fortsetzung).
Substanz	Parti-	Dosis	Tumorhäufigkeit		Potenz ^c
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^b	%	[%/mg]
Pott et al. (1987, Fortsetzung)					
Erionit, Türkei	f	20	37/53	69,8	3,49
Glasfasern 100/L&V	f	2	26/54	48,1	24,05
Glasfasern 100/Pen	f	2	21/54	38,9	19,45
Glasfasern 100/Pen	f	10	24/53	45,3	4,53
Glasfasern 104/1974, Ch. 1	f	5	20/45	44,4	8,89
Glasfasern 104/1974, Ch. 1	f	5	44/54 SD	81,5	16,30
Glasfasern 104/1974 Ch. 2	f	10	18/33 m	54,6	5,46
Glasfasern 104/1974 Ch. 2	f	10	13/26	50,0	5,00
Glasfasern 104/475	f	0,5	5/30	16,7	33,34
Glasfasern 104/475	f	2	8/31	25,8	12,91
Glasfasern 106	f	10	2/39	5,1	0,51
Glasfasern ES 3, Laparatomie	f	50	3/48	6,3	0,13
Glasfasern ES 3, Laparatomie	f	250	4/46	8,7	0,03
Glasfasern ES 5	f	10	2/50	4,0	0,40
Glasfasern ES 5	f	40	5/46	10,9	0,27
Glasfasern ES 5, Laparatomie	f	250	2/28	7,1	0,03
Glasfasern ES7	f	40	1/47	2,1	0,05
Glasfasern HCI-behandelt 24 h	f	2	16/32	50,0	25,00
Glasfasern HCI-behand. 24 h	f	5	4/54	7,4	1,48
Glasfasern HCI-behand. 24 h	f	5	2/45	4,4	0,88
Glasfasern HCI-behand. 2 h	f	5	32/54	59,3	11,86
Glasfasern NaOH-behand. 24 h	f	5	46/53	86,8	17,36
Glasfasern NaOH-behand. 24 h	f	5	27/46	58,7	11,74
Glasfasern NaOH-behand. 2 h	f	5	42/54	77,8	15,56
Krokydolith Südafrika	f	0,5	18/32	56,3	112,50
Krokydolith Südafrika	f	2	28/32	87,5	43,75
Nemalith	f	2	28/37	75,7	37,84
Nemalith	f	10	32/40	80,0	8,00
Nemalith	f	40	43/48	89,6	2,24
p-Aramid (Faserstaub)	f	10	4/31	12,9	1,29

Tab. 3.4	Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
	(Fortsetzung).

Substanz	Parti-	Dosis	Dosis Tumorhäu		Potenz ^c
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^b	%	[%/mg]
Pott et al. (1987, Fortsetzung)	<u>.</u>		- -		
Schlackefasern	f	40	2/96	2,1	0,05
Schlackefasern	f	40	6/99	6,1	0,15
Steinfasern Rockwool, Schweden	f	75	45/63	71,4	0,95
Steinf. Rockwool S., Feinfraktion	f	10	6/45	13,3	1,33
Aktinolith (mainly granular)	g	40	2/48	4,2	0,11
Brucit (mainly granular)	g	40	0/49	0,0	0,00
Chrysotil UICC/B gemahlen	g	50	1/41	2,4	0,05
Glasstaub körnig	g	40	2/45	4,4	0,11
Glasstaub körnig	g	50	4/48	8,3	0,17
Glasstaub körnig	g	250	4/48	8,3	0,03
Korund	g	10	3/35	8,6	0,86
Korund	g	90	4/115	3,5	0,04
Quarz DQ12	g	10	2/34	5,9	0,59
Quarz DQ12	g	40	9/41	22,0	0,55
TiO ₂	g	5	2/52	3,8	0,76
TiO ₂	g	5	0/47	0,0	0,00
TiO ₂	g	10	0/32	0,0	0,00
TiO ₂	g	90	6/113	5,3	0,06
Vulkanasche St. Helens	g	40	3/54	5,6	0,14
NaCI-Lösung	0	0	0/70	0,0	
NaCI-Lösung	0	0	2/45	4,4	
NaCI-Lösung	0	0	2/32	6,3	
NaCI-Lösung	0	0	3/54	5,6	
NaCI-Lösung	0	0	0/48	0,0	
Pott et al. (1989)					
Aktinolith, FRG	f	0,01	8/35	22,9	2286,00
Aktinolith, FRG	f	0,05	15/36	41,7	833,40
Aktinolith, FRG	f	0,25	20/36	55,6	222,24
Chrysotil Can. UICC	f	0,05	12/36	33,3	666,60
Chrysotil Can. UICC	f	0,25	23/34	67,7	270,60

Tab. 3.4Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
(Fortsetzung).

Substanz	Parti-	Dosis	Tumorhäu	Fumorhäufigkeit	
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^b	%	[%/mg]
Pott et al. (1989, Fortsetzung)					
Chrysotil Can. UICC	f	1	30/36	83,3	83,33
Eisenoxidhydrat alpha	f	250	2/51	4,0	0,02
Eisenoxidhydrat gamma	f	250	8/49	16,0	0,06
Glasfasern 104/475	f	5	34/53	64,2	12,83
Keramikfasern Al-sil. "Fiberfrax"	f	45	33/47	70,2	1,56
Keramikfasern Manville	f	75	12/54	22,2	0,30
p-Aramid (Faserstaub)	f	20	3/53	6,0	0,30
Polypropylenfasern gemahlen	f	50	2/51	3,9	0,08
Steinfasern Basalt G+H	f	75	30/53	56,6	0,75
Wollastonit India	f	100	0/54	0,0	0,00
Holzstaub (Buche)	g	250	0/52	0,0	0,00
Polyvinylchlorid	g	500	5/51	10,0	0,02
TiO ₂	g	100	2/53	4,0	0,04
NaCI-Lösung	0	0	2/102	2,0	
Pott et al. (1990)					
Attapulgit, Caceres	f	10	12/30	40,0	4,00
Attapulgit, Georgia	f	60	4/112	3,6	0,06
Attapulgit, Lebrija	f	60	4/115	3,5	0,06
Attapulgit, Mormoiron	f	60	4/114	3,5	0,06
Chrysotil Calidria (1)	f	1	3/34	8,8	8,82
Sepiolith, Finnland	f	10	24/36	67,0	6,70
Sepiolith, Vicalvaro	f	80	2/32	6,0	0,08
Pott et al. (1991a)					
Ca-Na-Metaphosphatfasern	f	50	3/17	17,7	0,35
Ca-Na-Metaphosphatfasern	f	250	4/16	25,0	0,10
Gipsfasern A 30	f	250	1/24	4,2	0,02
Gipsfasern H 30	f	250	0/12	0,0	0,00
Glasfasern B-1K	f	60	3/46	6,5	0,11
Glasfasern B-1K	f	150	1/32	3,1	0,02

Tab. 3.4Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
(Fortsetzung).

Substanz	Parti-	Dosis	Tumorhäu	Potenz ^c	
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^b	%	[%/mg]
Pott et al. (1991a, Fortsetzung)					
Glasfasern B-1L	f	20	1/48	2,1	0,10
Glasfasern B-1L	f	60	5/46	10,9	0,18
Glasfasern B-1M	f	20	1/48	2,1	0,10
Glasfasern B-1M	f	60	1/46	2,2	0,04
Glasfasern B-1ML	f	100	1/39	2,6	0,03
Glasfasern B-2K	f	6,7	0/48	0,0	0,00
Glasfasern B-2K	f	20	0/46	0,0	0,00
Glasfasern B-2L	f	6,7	0/45	0,0	0,00
Glasfasern B-2L	f	20	2/44	4,6	0,23
Glasfasern B-2L	f	100	1/35	2,9	0,03
Glasfasern B-3K	f	6,7	10/48	20,8	3,11
Glasfasern B-3K	f	20	30/47	63,8	3,19
Glasfasern B-3L	f	6,7	19/48	39,6	5,91
Glasfasern B-3L	f	20	31/47	66,0	3,30
Glasfasern M-475	f	2	8/48	16,7	8,34
Kaliumtitanatwhisker	f	0,5	1/34	2,9	5,88
Kaliumtitanatwhisker	f	2	11/36	30,6	15,28
Keramikfasern Al-sil., "Fiberfrax" I	f	12	15/35	42,9	3,57
Keramikf. Al-sil., "Fiberfrax" II	f	12	17/36	47,2	3,94
Keramikf. Al-sil., "Fiberfrax" II	f	40	29/36	80,6	2,01
Keramikfasern Al-sil., Manville 5	f	40	6/36	16,7	0,42
Kohlenstoffasern Sigrafil	f	50	0/25	0,0	0,00
Kohlenstoffasern Sigrafil	f	250	0/20	0,0	0,00
Mg-oxid-sulphatfasern	f	50	1/21	4,8	0,10
Mg-oxid-sulphatfasern	f	150	0/10	0,0	0,00
Schlackefasern	f	150	2/28	7,1	0,05
Sepiolith Vicalvaro	f	50	0/23	0,0	0,00
Sepiolith Vicalvaro	f	250	2/21	9,5	0,04
Siliziumkarbidwhisker	f	0,05	2/16	12,5	250,00
Siliziumkarbidwhisker	f	0,25	5/23	21,7	86,96

Tab. 3.4Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
(Fortsetzung).

Substanz	Parti-	Dosis	Tumorhäufigkeit		Potenz ^c
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^ь	%	[%/mg]
Pott et al. (1991a, Fortsetzung)			-		
Siliziumkarbidwhisker	f	1,25	13/21	61,9	49,52
Siliziumkarbidwhisker	f	6,25	23/30	76,7	12,27
Siliziumkarbidwhisker	f	25	36/37	97,3	3,89
Siliziumkarbidwhisker	f	250	1/22	4,5	0,02
Steinfasern Basalt	f	25	1/38	2,6	0,11
Steinfasern Basalt	f	150	15/21	71,4	0,48
Aktivkohle gemahlen	g	50	0/22	0,0	0,00
Aktivkohle gemahlen	g	250	1/25	4,0	0,02
Chlorit	g	50	1/42	2,4	0,05
Dieselruß LKW	g	20	3/31	9,7	0,49
Dieselruß LKW	g	80	0/34	0,0	0,00
Eisen(III)oxid (Hämatit)	g	40	1/36	2,8	0,07
Eisen(III)oxid (Hämatit)	g	160	0/33	0,0	0,00
Magnetit	g	40	0/36	0,0	0,00
Magnetit	g	160	2/34	5,9	0,04
Ruß Corax L Nr. 22	g	80	1/35	2,9	0,04
TiO ₂	g	20	0/47	0,0	0,00
NaCI-Lösung	0	0	0/34	0,0	
NaCI-Lösung	0	0	2/50	4,0	
Roller et al. (1996, 1997)					
Glasfasern B-01-0,9	f	125	0/39	0,0	0,00
Glasfasern B-01-0,9	f	250	3/37	8,1	0,03
Glasfasern B-01-0,9	f	500	2/36	5,6	0,01
Glasfasern B-01-0,9	f	500	10/48 m	20,8	0,04
Glasfasern B-01-0,9	f	1000	33/50 m	66,0	0,07
Glasfasern B-09-0,6	f	100	2/40	5,0	0,05
Glasfasern B-09-0,6	f	300	4/39	10,3	0,03
Glasfasern B-09-2,0	f	150	8/39	20,5	0,14
Glasfasern B-09-2,0	f	450	22/40	55,0	0,12
Glasfasern B-20-0.6	f	3.5	11/40	27.5	7.86

Tab. 3.4	Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
	(Fortsetzung).

Substanz	Parti-	Dosis	Dosis Tumorhäu		Potenz ^c
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^b	%	[%/mg]
Roller et al. (1996, 1997, Fortsetzu	ng)		-		
Glasfasern B-20-0,6	f	8,5	19/40	47,5	5,59
Glasfasern B-20-0,6	f	25	31/40	77,5	3,10
Glasfasern B-20-0,6	f	75	27/31	87,1	1,16
Glasfasern B-20-2,0	f	6	2/32	6,3	1,04
Glasfasern B-20-2,0	f	6	15/36 m	41,7	6,95
Glasfasern B-20-2,0	f	18	7/32	21,9	1,22
Glasfasern B-20-2,0	f	18	12/34 m	35,3	1,96
Glasfasern B-20-2,0	f	60	21/35 m	60,0	1,00
Glasfasern M-753-104	f	17	30/40	75,0	4,41
Glasfasern M-753-104	f	50	36/40	90,0	1,80
Glasfasern MMVF-11	f	70	12/40	30,0	0,43
Glasfasern MMVF-11	f	180	16/23	69,6	0,39
Krokydolith	f	0,5	25/32	78,1	156,26
Krokydolith	f	0,5	32/48 m	66,7	133,34
Krokydolith	f	0,5	22/39	56,4	112,82
Schlackefasern (MMVF-22)	f	20	5/40	12,5	0,63
Schlackefasern (MMVF-22)	f	50	8/40	20,0	0,40
Schlackefasern (MMVF-22)	f	150	18/38	47,4	0,32
Steinfasern M	f	8,5	2/32	6,3	0,74
Steinfasern M	f	8,5	2/36 m	5,6	0,65
Steinfasern M	f	25,5	9/32	28,1	1,10
Steinfasern M	f	25,5	8/36 m	22,2	0,87
Steinfasern M	f	85	22/35 m	62,9	0,74
Steinfasern Rockwool Exp, 3	f	114	0/38	0,0	0,00
Steinfasern Rockwool Exp, 3	f	256,5	1/35	2,9	0,01
Steinfasern Rockwool (MMVF-21)	f	60	37/38	97,4	1,62
Steinfasern Rockwool (MMVF-21)	f	150	33/38	86,8	0,58
Tremolit	f	3,3	12/40	30,0	9,09
Tremolit	f	15	30/40	75,0	5,00
Siliziumkarbid, körnig	g	250	1/47	2,1	0,01

Tab. 3.4Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
(Fortsetzung).

Tab. 3.4	Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
	(Fortsetzung).

Substanz	bstanz Parti- Dosis Tumo		Tumorhäu	Fumorhäufigkeit			
	kelge- stalt ^a	[mg]	z/n ^b	%	[%/mg]		
Roller et al. (1996, 1997, Fortsetzung)							
Siliziumkarbid, körnig	g	250	0/71 m	0,0	0,00		
Siliziumkarbid, körnig	g	1000	0/45	0,0	0,00		
Siliziumkarbid, körnig	g	1000	0/70 m	0,0	0,00		
NaCI-Lösung	0	0	0/93	0,0			
NaCI-Lösung	0	0	1/69 m	1,5			
NaCI-Lösung	0	0	0/38	0,0			
unbehandelt	0	-	0/37	0,0			

^a f = faserförmig; g = granulär; 0 = keine Partikel

^b z = Anzahl Tiere mit Tumor im Sinne des Tests; n = Anzahl ausgewertete Tiere; Abkürzungen in der Spalte: m = männliche Tiere (sonst: weiblich); SD = Sprague-Dawley-Ratten (sonst: Wistar)

^c Quotient: % Tiere mit Tumor / Dosis [mg]; Erläuterung siehe Abschnitt 2.3.3

Die Ergebnisse aus Inhalationsversuchen stehen nicht im Widerspruch zu der aus Versuchen mit direkter Applikation abgeleiteten Aussage über die Abhängigkeit der karzinogenen Potenz von Faserlänge und Faser-Beständigkeit. Es ist daher bedauerlich, dass die Arbeitsgruppe der IARC (2002), die eine Neubewertung des karzinogenen Potentials von künstlichen Mineralfasern vorgenommen hat, nicht entlang der Kriterien von Faserabmessungen und Bio-Beständigkeit bewertet hat, sondern jeweils getrennt Bewertungen von Gruppen von Fasematerialien vorgenommen hat, wobei die Gruppeneinteilung nach "traditionellen" Namen bzw. nach technischem Verwendungszweck erfolgte. Bei IARC (2002) finden sich jeweils getrennte Bewertungen für folgende "Stoffgruppen": glass wool, continuous glass filament, rock wool, slag wool, special-purpose glass fibres, refractory ceramic fibres, newly developed wool. Auf die Bewertungen von IARC (2002) muss hier nicht näher eingegangen werden, sie wurden bei Wardenbach et al. (2005) ausführlich kritisch kommentiert.

Tab. 3.5Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion
von Asbest und künstlichen Mineralfasern (gemäß Begründungspapier
für den Ausschuss für Gefahrstoffe "Expositions-Risiko-Beziehung für
Künstliche Mineralfasern", 2008, unveröffentlicht)

Faserart	Inj. Faser-	Anzahl Ratten		Media	n [µm]	Faser-	Quelle
	zahl [10 [°]]	unters.	m. Tum.ª	Länge	D.	definition	
Kontrollen	0	433	2	-	-	L > 5 μm	Roller et
Crocidolite	0,042	273	170	1,4	0,19	D < 3 μm	al.
Tremolite	0,061	40	9	2,4	0,27	L/D > 3/1	(1996)
	0,28	40	30	2,4	0,27		[1]
MMVF-11	0,46	40	12	13,5	0,94		
	1,19	23	16	13,5	0,94		
B-01-0.9	2,7	39	3	≈8	≈0,7		
	5,4	37	4	≈8	≈0,7		
	10,8	84	13	≈8	≈0,7		
	21,6	50	33	≈8	≈0,7		
MMVF-21	0,47	38	37	14,6	1,03		
	1,17	38	33	14,6	1,03		
M-Stone	0,11	68	4	8,8	0,84		
	0,33	68	17	8,8	0,84		
	1,11	35	22	8,8	0,84		
MMVF-22	0,4	40	4	7,8	0,77		
	1	40	8	7,8	0,77		
	2,9	38	18	7,8	0,77		
Kontrolle NaCl	0	102	2	-	-	L > 5 μm	Pott et
Basalt	0,059	53	30	17	1,1	D < 3 μm	al.
Ceramic Fiberfrax	0,15	47	33	13	0,89	L/D > 5/1	(1989)
Ceramic MAN	0,021	54	12	16	1,4		[2]
Glass 104/475	0,680	53	34	2,6	0,15		
Kontrolle NaCl	0	32	2	-	-	L > 5 μm	Pott et
Crocidolite S.A.	0,042	32	18	2,1	0,20	D < 2 μm	al.
	0,169	32	28	2,1	0,20	L/D > 5/1	(1987)
Glass 104/475	0,079	30	5	3,2	0,18		[3]
	0,32	31	8	3,2	0,18		
Kontrolle NaCl	0	84	2	-	-	L > 5 μm	Pott et
Silicon carbide	0,005	16	2	3,1	0,31	D < 2 μm	al.
	0,027	23	5	3,1	0,31	L/D > 5/1	(1991a)
	0,13	21	13	3,1	0,31		[4]
	0,67	30	23	3,1	0,31		
	2,68	37	36	3,1	0,31		
Potassium titanate	0,045	34	1	3,2	0,22		
	0,18	36	11	3,2	0,22		
Ceramic	0,021	36	17	13,1	0,84		
Fiberfrax II	0,069	36	29	13,1	0,84		
M-475	0,32	48	8	2,3	0,14		
Ceramic Manville	0,009	36	6	16,4	1,35		
Ceramic Fibrefrax I	0,029	35	15	5,5	0,47		

^a Histologisch bestätigte, primäre epitheloide und sarkomatöse Mesotheliome in der Publikation [1]; Bezeichnung in [2], [3] und [4] als Mesotheliome und Sarkome (vereinzelt wurden histologisch bestätigte Karzinome als potentiell substanzbedingt gezählt) **Tab. 3.6** So genannte BMD₁₀- und T₁₀-Werte als Maß der karzinogenen Potenz gemäß Ergebnissen von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion (Faserdefinition: L > 5 mm; D < 3 mm oder D < 2 mm; L/D > 3/1 oder L/D > 5/1; gemäß Begründungspapier für den Ausschuss für Gefahrstoffe "Expositions-Risiko-Beziehung für Künstliche Mineralfasern", 2008, unveröffentlicht)

Faserart	Abmessungen, Medi- an [μm]		I.pDosis [10 rechnetem Ris	Daten- Quelle	
	Länge	Durchm.	BMD ₁₀	T ₁₀	(s. Tab. 3.5)
Asbest					
Krokydolith	1,4	0,19	-	0,007	1
Krokydolith	2,1	0,20	0,007	0,0079	3
Tremolit	2,4	0,27	0,0222	0,028	1
Superfeinfasern (sp	ecial-purpos	e glass fibre	s) und Whisker		
Siliziumkarbid	3,1	0,31	0,011	0,0136	4
Glass 104/475	~ 3	~ 0,16	0,047	0,164	2; 3; 4
Aluminiumsilikat	5,5	0,47	-	0,007	4
Kaliumtitanat	3,2	0,22	0,066	0,062	4
Keramikfasern (glas	ig)				
Aluminiumsilikat	~ 14	~ 1,0	0,0047	0,006	2; 4
Mineralwollen (glasi	g)				
Basalt	17	1,1	-	0,010	2
MMVF-21	14,6	1,03	0,014	0,048	1
MMVF-11	13,5	0,94	0,12	0,155	1
M-Stone	8,8	0,84	0,13	0,134	1
MMVF-22	7,8	0,77	0,47	0,42	1
B-01-0.9	≈8	≈0,7	4,98	5,19	1

3.1.2 Karzinogene Metalle

Für mehrere Metalle und ihre Verbindungen liegen Informationen aus epidemiologischen Studien beziehungsweise aus Langzeit-Inhalationsversuchen vor, so dass diese Stoffe als Karzinogene gelten. So hat z. B. die MAK-Kommission Bewertungen solcher Stoffe vorgenommen (DFG, 2009); diese Einstufungen in die Kategorien 1 und 2 des DFG-Systems für krebserzeugende Arbeitstoffe sind nachstehend beispielhaft für die diversen Klassifizierungen durch Gremien aufgeführt (in eckigen Klammern: CAS Nummern wie bei DFG, 2009): DFG-Kategorie 1:

Arsen und anorganische Arsenverbindungen Arsenmetall [7440-38-2] Arsentrioxid [1327-53-3] Arsenige Säure [13464-58-9] und ihre Salze, z. B. Natriumarsenit [7784-46-5] Arsenpentoxid [1303-28-2] Arsensäure [7778-39-4] und ihre Salze, z. B. Bleiarsenat [3687-31-8] Calciumarsenat [7778-44-1] Beryllium [7440-41-7] und seine anorganischen Verbindungen Cadmium [7440-43-9] und seine anorganischen Verbindungen (einatembare Fraktion) Chrom(VI)-Verbindungen (einatembare Fraktion; außer Bleichromat und Bariumchromat) Hartmetall, Wolframcarbid- und Cobalt-haltig (einatembare Fraktion) Nickel und Nickelverbindungen (einatembare Fraktion): Nickelmetall [7440-02-0] Nickelacetat [373-02-4] und vergleichbare lösliche Salze, Nickelcarbonat [3333-67-3] Nickelchlorid [7718-54-9] Nickelmonoxid [1313-99-1] Nickeldioxid [12035-36-8] Dinickeltrioxid [1314-06-3] Nickelhydroxid [12054-48-7] Nickelsulfid [16812-54-7] Nickelsubsulfid [12035-72-2] Nickelsulfat [7786-81-4] DFG-Kategorie 2:

Cobalt und Cobaltverbindungen (einatembare Fraktion) Cobaltmetall [7440-48-4] Cobalt(II)carbonat [513-79-1] Cobalt(II)oxid [1307-96-6] Cobalt(II)oxid [1308-06-1] Cobalt(II)sulfat ·7H₂O [10026-24-1] und vergleichbare lösliche Salze, Cobalt(II)sulfid [1317-42-6]

Vanadium [7440-62-2] und seine anorganischen Verbindungen (einatembare Fraktion)

Die Tabellen 3.7 bis 3.14 enthalten die Daten der für unsere Fragestellung aussagekräftigsten Inhalationsversuche mit diesen Metallen bzw. ihren Verbindungen. Es ist zu betonen, dass die in den Tabellen 3.7 bis 3.14 aufgeführten Metallverbindungen **unterschiedliche Löslichkeit** in biologischen Flüssigkeiten aufweisen. Sofern von einem Metall wie Ni oder Cd Karzinogenitätsversuche für mehrere Verbindungen vorliegen, gegebenenfalls sogar mehrere Verbindungen eines Metalls in derselben Versuchsreihe geprüft wurden, sind hier die Ergebnisse für alle diese Verbindungen

Tab. 3.7Ergebnisse eines Inhalationsversuchs mit verschiedenen Cadmium-
verbindungen an Wistar-Ratten (Glaser et al., 1990)

E	xposition			Anzahl	Ratten		Tumor-
Konz. [µg Cd/m³]	Substanz, berechnet	Dauer ^a [Mon.]	unters	sucht	mit pri gentu	im. Lun- mor(en)	häufig- keit ^b [%]
	[mg/m³]		m	w	m	w	[,0]
Kontrolle							
0		0	40	20	0	0	0,0
CdCl ₂							
30	0,049	18	20	18	15 *	13 *	73,7
90	0,147	6	20	18	11 *	3	36,8
CdSO₄							
90	0,167	14 / 18	20	20	11 *	18 *	72,5
CdS							
90	0,116	18	20	20	17 *	15 *	80,0
270	0,347	16	20	19	14 *	16 *	76,9
810	1,04	7 / 10	20	20	11 *	13 *	60,0
2430	3,12	4 / 3	16	19	7 *	6 *	37,1
270 ^c	0,347	6	20	20	3	3	15,0
CdO-Staub							
30	0,034	18	39	20	28 *	15 *	72,9
90	0,103	7 / 11	39	19	12 *	14 *	44,8
90 ^c	0,103	6	20	20	4 *	3	17,5
CdO-Rauch							
10	0,011	18	40		0		0,0
30	0,034	18	38		8 *		21,1

^a Bei einigen Gruppen wurde die Exposition vorzeitig abgebrochen (25 % Mortalität), zum Teil daher auch Expositionszeiten von männlichen und weiblichen Tieren unterschiedlich (Angaben dann hier durch Schrägstrich getrennt).

^b Männliche (m) und weibliche (w) Tiere kombiniert; *-Symbol bei den absoluten Tierzahlen bezeichnet statistische Signifikanz (p < 0,05)

^c Wöchentliche Expositionszeit bei diesen Gruppen 40 Stunden, bei den übrigen Gruppen 7 x 22 Stunden.

Tab. 3.8Ergebnisse eines Inhalationsversuchs mit Cadmiumchlorid an männlichen Wistar-Ratten. Expositionsdauer: 23 h/d, 7 d/Wo., 18 Monate, Beobachtungsdauer 31 Monate (Takenaka et al., 1983)

Expos	sitionskonze	ntration		Anzahl	Ratten
Cd, nominell [µg Cd/m³]	Substanz, nominell	Cd gemessen [µg Cd/m³]	unter- sucht	Tiere mit r	prim. Lungentu- nor(en)
	[mg/m³]			Karzi- nome	Karzinome plus Adenome (%)
0	0	0	38	0	0 (0)
12,5	0,020	13,4	39	6 *	7 (17,9)
25	0,041	25,7	38	20 *	20 (52,6)
50	0,082	50,8	35	25 *	26 (74,3)

^a *-Symbol bezeichnet statistische Signifikanz (p < 0,05)

Tab. 3.9 Ergebnisse eines Inhalationsversuchs mit Natriumdichromat sowie Cr(III)/(VI)-oxid-Gemisch mit männlichen Wistar-Ratten; Expositions-dauer: 22-23 h/d, 7 d/Wo., 18 Monate, Beobachtungsdauer 30 Monate (Glaser et al., 1986)

Expositio	nskonz.	µg Cr pro	Anz	ahl Ratten
Chrom(VI), gemes- sen [µg/m³]	Substanz, be- rechnet [mg/m³]	Lunge 1 J. n. Expos ende (28 Mon.)	unter- sucht	mit primärem Lungentumor ^a
Na ₂ Cr ₂ O ₇ ; MMD 0,3	36 μm, GSA 1,69 ^b			
0	0	0,1	37	0
25,5	0,128	5,8	18	0
50,4	0,254	13,3	18	0
102,4	0,516	52,5	19	3 * (16 %)
Cr₅O ₁₂ ; MMD 0,39	μm, GSA 1,71 ^ь			
63,3	0,336	508,1	18	1 (5,6 %)

^a Einer der 3 Lungentumoren in der höchsten Natriumdichromat-Dosisgruppe wurde als Adenokarzinom diagnostiziert, die übrigen Lungentumoren als Adenome; außerdem wurde in dieser Gruppe ein weiteres Tier mit Pharynxkarzinom gefunden. *-Symbol bezeichnet statistische Signifikanz (p < 0,05).</p>

^b MMD: Mass median diameter; GSA: geometrische Standardabweichung

Tab. 3.10Daten zu Dosis und Tumorhäufigkeit in den NTP-Karzinogenitäts-
versuchen mit "Nickel" an männlichen (m.) und weiblichen (w.) F344/N-
Ratten

Expos konzen	itions- tration	Nickelgehalt d. Lu. n. 15 Mon.	Ratten mit Lungentu	mor ^a / at risk
Substanz [mg/m³]	Ni [mg Ni/m ³]	(m. / w.) [µg Ni/g Kontr.lu.]	(m.+w. / m.+w.)	% m.+w. komb.
Nickeloxid (C	AS Nr. 1313-9	99-1, NTP TR 451, ²	1996a)	
0	0	0 / 0	1+1 / 54+53	1,9 %
0,62	0,5	317 / 302	1+0 / 53+53	0,9 %
1,25	1,0	1110 / 1093	6+6 / 53+53	11,3 %
2,5	2,0	2082 / 1804	4+5 / 52+54	8,5 %
keine eir	nzelne Gruppe	e signifikant, Trendte	est unter Komb. m.+w.	p = 0,003
Nickelsubsulf	id (CAS Nr. 1	2035-72-2, NTP TR	453, 1996b)	
0	0	0 / 0	0+2 / 53+53	1,9 %
0,15	0,11	6 / 6	6 *+6 / 53+53	11,3 %
1	0,73	9 / 19	11 *+9 * / 53+53	18,9 %
Nickelsulfat (CAS Nr. 1010	1-97-0, NTP TR 454	t, 1996c)	
0	0	0 / 0	2+0 / 54+52	1,9 %
0,12	0,03	0,177 / 0,188	0+0 / 53+53	0,0 %
0,25	0,06	0,528 / 0,538	1+0 / 53+53	0,9 %
0,5	0,11	1,688 / 2,212	3+1 / 53+54	3,7 %
2-Jahres-Übe	erlebensquote	n (Lebende Tiere be	ei Studienende / auswe	rtbare Tiere)
Nickeloxid: m	.: 14/54, 15/5	3, 15/53, 12/52; w.:	21/53, 26/53, 20/53, 26	6/54
Nickelsubsulf	id: m.: 13/53,	21/53, 18/53; w.: 25	5/53, 25/53, 28/53	
Nickelsulfat: r	m.: 16/54, 16/	53, 18/53, 21/53; w.	: 22/52, 17/53, 28/53, 2	9/54

^a Bronchioloalveoläres Adenom oder Karzinom oder Plattenepithelkarzinom; *-Symbol bei den absoluten Tierzahlen bezeichnet statistische Signifikanz (p < 0,05)

Tab. 3.11Daten zu Dosis und Tumorhäufigkeit in den NTP-Karzinogenitäts-
versuchen mit V_2O_5 an männlichen (m.) und weiblichen (w.) F344/N-
Ratten; Exposition 5 x 6 h/Wo., 104 Wochen

Expos konzen	itions- tration	V-gehalt d. Lu. nach 12 Mon.	Ratten mit Lungentu	ımor ^a / at risk
Substanz [mg/m³]	MMAD ^ь [µm]; GSA	(m. / w.) [µg V/Lunge]	(m.+w. / m.+w.)	% m.+w. komb.
Vanadiumper	ntoxid (CAS N	r. 1314-62-1, NTP T	R 507, 2002)	
0			4+0 / 50+49	4,0 %
0,5	1,2; 1,9	/ 12,3	10+3 / 49+49	13,3 %
1,0	1,2; 1,9	/ 25	6+1 / 48+50	7,1 %
2,0	1,3; 1,9	/ 45	9+1 / 50+50	10,0 %
2-Jahres-Übe	erlebensquote	n (Lebende Tiere be	ei Studienende / auswe	rtbare Tiere)
m.: 20/50, 29	/50, 26/50, 27	7/50; w.: 33/50, 24/50	0, 29/50, 30/50	

 ^a Bronchioloalveoläres Adenom oder Karzinom.Unter den männlichen und weiblichen Tieren ist die Tumorhäufigkeit *keiner* einzelnen Gruppe im Vergleich mit der Kontrolle signifikant erhöht (z. B. 10 / 49 versus 4 / 50 p = 0,068). Auch der Trendtest unter Kombination der Geschlechter ist *nicht* signifikant (Cochran-Armitage p = 0,19). NTP (2002) hat den Versuch unter Bezug auf historische Kontrollen als positiv bewertet.

^b MMAD: Mass median aerodynamic diameter; GSA: geometrische Standardabweichung

dargestellt, ohne dabei nach unterschiedlicher Löslichkeit zu differenzieren. Zwar ist aufgrund von Informationen zum Grad der Wasserlöslichkeit bekannt, dass z. B. Nickelsulfat im Vergleich zu Nickeloxid sehr wenig biobeständig ist; es kann im Einzelfall aber schwierig sein, *a priori* genaue Angaben zum Grad der Biobeständigkeit bzw. zur Bedeutung der Biobeständigkeit für de biologische Wirkung zu machen. Eine entsprechende Diskussion erscheint hier erst am Ende der Bestandsaufnahme der In-vivo- und In-vitro-Daten sinnvoll. Die Tabellen 3.7 bis 3.14 geben zunächst deskriptiv die Ergebnisse der In-vivo-Inhalationsversuche wieder. Sofern entsprechende Daten vorliegen, sind in die Tabellen Angaben zum Metallgehalt der Lungen nach längerer Inhalationsphase aufgenommen. Diese Informationen geben in Relation zu den Expositionskonzentrationen Hinweise auf die relative Biolöslichkeit der Stoffe.

Tab. 3.12Daten zu Dosis und Tumorhäufigkeit in den NTP-Karzinogenitäts-
versuchen mit V_2O_5 an männlichen (m.) und weiblichen (w.) B6C3F1-
Mäusen; Exposition 5 x 6 h/Wo., 104 Wochen

Expos konzen	itions- tration	V-gehalt d. Lu. n. 12 Mon.	Ratten mit Lungentu	ımor ^a / at risk
Substanz [mg/m³]	MMAD ^ь [µm]; GSA	(m. / w.) [µg V/Lunge]	(m.+w. / m.+w.)	% m.+w. komb.
Vanadiumper	ntoxidoxid (CA	AS Nr. 1314-62-1, N ⁻	TP TR 507, 2002)	
0			22+1 / 50+50	23,0 %
1,0	1,3; 1,9	/ 3	42 *+32 * / 50+50	74,0 %
2,0	1,2; 1,9	/ 4	43 *+35 * / 50+50	78,0 %
4,0	1,2; 1,9	/ 8	43 *+32 * / 50+50	75,0 %
2-Jahres-Übe	erlebensquote	n (Lebende Tiere be	ei Studienende / auswe	rtbare Tiere)
m.: 39/50, 33	/50, 36/50, 27	7/50; w.: 38/50, 32/50	0, 29/50, 32/50	

^a Bronchioloalveoläres Adenom oder Karzinom; *-Symbol bei den absoluten Tierzahlen bezeichnet statistische Signifikanz (p < 0,05)

^b MMAD: Mass median aerodynamic diameter; GSA: geometrische Standardabweichung

Tab. 3.15 enthält ergänzende Information aus Karzinogenitätsversuchen mit intratrachealer Instillation. Dort sind auch Ergebnisse mit Eisenverbindungen (Magnetit, Hämatit) aufgenommen, für die keine entsprechenden Daten nach inhalativer Exposition vorliegen. Für Übergangsmetalle schlechthin und insbesondere auch für Eisen wird immer wieder eine mögliche Rolle bei adversen Effekten im Organismus bis hin zu Krebsförderung diskutiert, die durch Redoxvorgänge unter Änderung der Oxidationsstufe der Übergangsmetalle (z. B. so genannte Fenton-Reaktion) vermittelt werden könnte. "Eisen" ist jedoch nicht als krebserzeugend anerkannt und Tab. 3.15 zeigt für die Eisenoxide Magnetit und Hämatit keine höhere karzinogene Potenz als für GBS (s. Abschnitt 3.1.3). Im Abschnitt zu GBS sind auch weitere Metallverbindungen (auch von Übergangsmetallen wie Titan und Zirkonium) aufgeführt.

In den Tab. 3.7 - 3.14 sind die *-Signifikanzsymbole bei den Absolutzahlen der Tumortiere, getrennt nach Geschlechtern, angebracht. Diese Kennzeichnung wurde entsprechend den in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Kriterien vorgenommen, wonach ein Effekt dann formal statistisch signifikant ist, wenn bei einer Expositionsgruppe eines Geschlechts die Tumorhäufigkeit nach Fisher's Exact Test im Vergleich mit der mitlaufenden Kontrollgruppe signifikant ist. Für die Versuchstierspezies "Ratte" ist dies nach Tab. 3.7-3.14 bei mindestens einem Geschlecht der Fall bei Verbindungen

Tab. 3.13Daten zu Dosis und Tumorhäufigkeit in den NTP-Karzinogenitäts-
versuchen mit Galliumarsenid an männlichen (m.) und weiblichen (w.)
F344/N-Ratten; Exposition 5 x 6 h/Wo., 105 Wochen

Expos konzen	itions- tration	Me-gehalt d. Lu. männl. Tiere n.	Ratten mit Lungentu	ımor ^a / at risk
Substanz [mg/m³]	MMAD ^ь [µm]; GSA	12 Mon. (Ga /As) [µg/Lunge]	(m.+w. / m.+w.)	% m.+w. komb.
Galliumarsen	id, GaAs (CA	S Nr. 1303-00-0, NT	P TR 492, 2000)	
0		/ 2,75	3+0 / 50+50	3,0
0,01	0,8; 1,9	2,04 / 4,46	0+0 / 49+50	0,0
0,1	1,0; 1,9	32,26 / 31,95	5+4 / 50+50	9,0
1,0	0,9; 1,8	106,1 / 106,0	3+9 * / 50+50	12,0
2-Jahres-Übe	erlebensquote	n (Lebende Tiere be	ei Studienende / auswe	ertbare Tiere)
m.: 13/50, 13	/50, 15/50, 13	8/50; w.: 19/50, 17/50	0, 20/50, 11/50	

 ^a Bronchioloalveoläres Adenom oder Karzinom (zusätzlich ist ein Plattenepithelkarzinom aufgetreten - weibl. Tiere, höchste Dosis; die kombinierte Häufigkeit ist aber nicht angegeben); *-Symbol bezeichnet statistische Signifikanz (p < 0,05)

^b MMAD: Mass median aerodynamic diameter; GSA: geometrische Standardabweichung

folgender Metalle: Cadmium, Chrom, Nickel, Arsen, Cobalt. Dabei ist der Effekt bei Chrom schwach, es wurde dort nur ein Geschlecht verwendet und es trat nur in der höchsten Dosis ein Effekt bei nur 3 Tieren auf; diese geringe absolute Häufigkeit entspricht wegen der relativ kleinen Gruppengröße von 19 Tieren einer prozentualen Häufigkeit von 16 % und ist im Vergleich mit der größeren Kontrollgruppe von 37 Tieren, in der keine Lungentumoren beobachtet wurden, statistisch signifikant. Beim Nickel gab nur eine der drei inhalativ geprüften Substanzen formal einen eindeutigen Effekt, nämlich das Nickelsubsulfid. Nickeloxid und Nickelsulfat führten nach den Kriterien formal nicht zu einem Effekt. Auch das Vanadiumpentoxid ist nach den Kriterien bei Ratten nicht positiv. Aus diesem Grund sind in Tab. 3.12 auch die Ergebnisse mit Mäusen aufgeführt, die zur Einstufung bei IARC (2006) und DFG (2009) beigetragen haben (im Übrigen sind hier nur Ergebnisse an Ratten aufgeführt, wie einleitend in Abschnitt 3.1 erläutert). Vanadiumpentoxid ist die einzige auf Karzinogenität geprüfte Vanadiumverbindung. Die Einstufung von Vanadiumpentoxid als possibly carcinogenic to humans durch IARC (2006) und besonders die Verallgemeinerung einer K2-Einstufung für alle Vanadiumverbindungen durch die MAK-Kommission wurde von Duffus (2007) heftig kritisiert.

Tab. 3.14Daten zu Dosis und Tumorhäufigkeit in den NTP-Karzinogenitäts-
versuchen mit Cobaltsulfat an männlichen (m.) und weiblichen (w.)
F344/N-Ratten; Exposition 5 x 6 h/Wo., 105 Wochen

Expos konzen	itions- tration	Co-gehalt d. Lu.	Ratten mit Lungentu	mor ^a / at risk
Substanz [mg/m³]	MMAD ^ь [µm]; GSA		(m.+w. / m.+w.)	% m.+w. komb.
Cobaltsulfath	eptahydrat, C	oSO₄·7H₂O (CAS N	r. 10026-24-1, NTP TR	471, 1998)
0		nicht gemessen,	1+0 / 50+50	1,0
0,3	1,5; 2,2	Substanz wasser-	4+3 / 50+49	7,1
1,0	1,4; 2,1	IOSIICIT	4+16 * / 48+50	20,4
3,0	1,6; 2,2		7 *+16 * / 50+50	23,0
2-Jahres-Übe	erlebensquote	n (Lebende Tiere be	ei Studienende / auswe	rtbare Tiere)
m.: 17/50, 15	/50, 21/50, 15	5/50; w.: 28/50, 25/50	0, 26/50, 30/50	

^a Bronchioloalveoläres Adenom oder Karzinom oder Plattenepithelkarzinom; *-Symbol bei den absoluten Tierzahlen bezeichnet statistische Signifikanz (p < 0,05)

^b MMAD: Mass median aerodynamic diameter; GSA: geometrische Standardabweichung

Bei DFG (2009) ist auch das Erdalkalimetall Beryllium als K1 eingestuft. Mit Berylliumverbindungen wurden auch Inhalationsversuche mit verschiedenen Versuchstieren durchgeführt. Die Veröffentlichungen datieren aber auf die 1950er und 60er Jahre und lassen keine klare Expositions-Risikozuordnung zu. Bei Beryllium sei daher hier nur festgestellt, dass im Inhalationsversuch an Ratten ein "positives" Ergebnis erhalten wurde. Die Quantifizierung der karzinogenen Potenz ist aber weder anhand epidemiologischer noch tierexperimenteller Daten möglich. Hierzu sei auf die Ergebnisse des BAuA-Projektes F1876 verwiesen (Roller et al., 2006).

Tab. 3.15Daten zu Dosis und Tumorhäufigkeit in Karzinogenitätsversuchen mit
intratrachealer Instillation verschiedener Metallverbindungen bei Ratten

Substanz	Anz.	Masse	Inst.	Anzah	I Ratten	% Ratten	Potenz ^a
	Instill.	pro Inst.	Masse, gesamt [mg]	m.Tum.	unters.	m. Tum.	[%/mg]
	Pott	et al. (1994); Pott und	Roller (19	94)		
Hämatit	15	10 mg	150	18	34	52,9	0,35
Magnetit	5	10 mg	50	9	36	25,0	0,50
	15	10 mg	150	25	37	67,6	0,45
Siliziumkarbid	20	3 mg	60	4	36	11,1	0,19
Nickeloxid	10	3 mg	30	23	60	38,3	1,28
TiO ₂ (Anatas)	15	3 mg	45	2	39	5,1	0,11
TiO ₂ (Rutil)	20	3 mg	60	1	39	2,6	0,04
NaCI-Lösung	15	0	0	0	39	0,0	
	20	0	0	0	40	0,0	
		Pott	et al. (1987	')			
Cadmiumchlorid,	20	1 µg Cd	0,036	0	38	0,0	
CdCl ₂ x H ₂ O	20	3 µg Cd	0,107	3	40	7,5	69,79
	15	9 µg Cd	0,242	2	36	5,6	23,16
Cadmiumoxid, CdO	20	1 µg Cd	0,023	2	37	5,4	236,36
	20	3 µg Cd	0,069	2	40	5,0	72,95
	15	9 µg Cd	0,154	0	39	0,0	
Cadmiumsulfid, CdS	10	63 µg Cd	0,810	2	39	5,1	6,30
	10	250 µg Cd	3,213	8	36	22,2	6,91
	10	1 mg Cd	12,85	7	36	19,4	1,51
Magnetit	15	15 mg	225,0	24	34	69,4	0,31
Nickeloxid, NiO	10	5 mg Ni	63,6	10	37	27,0	0,42
	10	15 mg Ni	190,9	12	38	31,6	0,17
Nickelpulver	20	0,3 mg	6,0	10	39	25,6	4,27
	10	0,9 mg	9,0	8	32	25,0	2,78
Nickelsubsulfid, Ni_3S_2	15	63 µg Ni	3,867	7	47	14,9	3,85
	15	125 µg Ni	7,673	13	45	28,9	3,77
	15	250 µg Ni	15,346	12	40	30,0	1,95
NaCI-Lösung	20	0	0	0	40	0,0	

^a Erläuterung siehe Abschnitt 2.3.3

3.1.3 Alveolengängige granuläre bio-beständige Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität (GBS) und sonstige Stäube

Im vorliegenden Abschnitt sind In-vivo-Daten zu GBS und sonstigen Stäuben (nichtfaserförmig, keine bekannte Karzinogenität von Metallionen) beschrieben, die als Bezugsinformation zum Vergleich mit In-vitro-Ergebnissen dienen können. Die 3-Buchstaben-Abkürzung GBS steht dabei für die neun Worte alveolengängige granuläre bio-beständige Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität. Eine solch scheinbar umständliche Definition ist in diesem Fall notwendig, um die Stoffe von anderen Stäuben bzw. Partikeln mit spezifischer Toxizität, wie z. B. Quarz, Nickel oder Partikeln mit organischer Beschichtung, abgrenzen zu können. In der Vergangenheit waren diese Stäube einfach als Inertstäube bezeichnet worden. Spätestens nachdem aber in den 1980er Jahren Lungentumoren bei Ratten nach Exposition gegenüber Ruß - nahezu frei von organischen Substanzen - und anderen "inerten" Partikeln beobachtet worden waren, musste der Begriff des Inertstaubs revidiert werden. In der Folge wurden die Lungentumoren, die bei Ratten z. B. nach Exposition gegenüber Dieselruß, Industrieruß und Titandioxid beobachtet wurden, in manchen Veröffentlichungen als für den Menschen irrelevanter, rattenspezifischer Überladungseffekt bewertet. Roller (2008) hat diese Overload-These diskutiert und ausführlich Gegenargumente erörtert. An dieser Stelle soll die Diskussion nicht vertieft werden. Vielmehr sind in den Tabellen 1 bis 5 möglichst genau die Daten der Langzeit-Tierversuche zusammengestellt, um eine Grundlage für den Vergleich mit In-vitro-Ergebnissen zu haben. In die Tabellen 3.16-3.20 mit aufgenommen sind SiO₂-Stäube (Quarz und amorphes SiO₂) sowie "sonstige" Stäube, also z. B. auch Stäube, die "im Grenzbereich" zu GBS anzusiedeln sind (wie Aluminiumoxid und Aluminiumsilikat, die in der 19-Stäube-Studie als GBS klassiert wurden, die aber spezifische Toxizität zeigen). Diese Stäube werden in dieser Arbeit nicht in einem eigenen Abschnitt behandelt, auch weil ein direkter Vergleich mit GBS innerhalb einer Tabelle sinnvoll erscheint (und weil eine allzu scharfe Abgrenzung in Einzelfällen schwierig, aber unnötig sein kann).

In den Tabellen 3.16 bis 3.20 ist als Potenzmaß das Tumorrisiko bezogen auf das langfristig retinierte Staubvolumen enthalten (wie in dem BAuA-Projekt F2083; Roller, 2008). Dies kann zum Vergleich mit In-vitro-Ergebnissen mit GBS hilfreich sein. Für einen Vergleich der karzinogenen Potenzen ganz verschiedener Stoffe (einschließlich Fasern und karzinogenen Metallen) ist aber nur die Partikelmasse ein vernünftigerweise geeignetes Dosismaß. Dies ist im nächsten Abschnitt 3.1.4 näher beschrieben.

	auf letzter	Seite der	r Tabelle	~								
Stoff	Durch-	Spezif.	Dichte	Expo	sition	GE	3S-Dosis	in Lunge		Ratten mit	Tum./	Literatur
	[hm] ^a	fläche	[g/mL]	[mg/m ³]	[h/Wo.,	nach ca. 1	Jahr Exp	osition ^b	n.~2 J.	Lu.tum. [abs./unter-	GBS GBS	
		[m²/g]			24 MO.J	[bm]	[hL] ^c	[hr/g] ^d	[mg] ^e	sucht, %]	[%/hL] ⁺	
Kohle			1,4 ^g			43	31	18	96	4/36 11	0,35	Martin et
Kontrolle	Ι	I	I	0	I	w SprDaw	'ley	I	I	0/ 0 0 _µ	I	al., 1977
TiO ₂ Rutil	MMAD		4,26 ⁱ	10	5 x 6	w 8,7	2,0	0,87	32	1 / 75 1,3		Lee et al.,
	(äquival.					<i>m</i> 10,1	2,4	0,73	21	2/71 2,8		1900, 1900
	mit ~0,8 geom.			50	5 x 6	w 60	14	6,0	130	0 / 74 0	0	
	Durchm.)					m 76	18	5,5	118	1 / 75 1,3		
				250	5 x 6	w 382	06	38	546	26 * / 74 35	6£'0	
						m 362	85	26	785	13*/77 17	0,17	
Kontrolle	Ι	I	I	0	I	w SprDaw	'ley	I	I	0 / 17 0	I	
						т ЅргDаи	vley	I	Ι	2 / 79 2,5	Н	
Dieselmotor-			1,85 ^k	0,35	5 x 7	<i>w m</i> 0,24	0,13	0,09	0,6	3 /223 1,3		Mauderly
emissionen, ~12 % ora.	~ 0,25 0,01-10			3,5	5 x 7	<i>w m</i> 2,18	1,18	0,79	11,5	8 * /221 3,6 ^m	2,3	et al., 1987; Ot
Stoffe				7,1	5 x 7	<i>w m</i> 7,29	3,94	2,63	20,5	29 * /227 12,8	3,0	Cneng et al., 1984;
Kontrolle	I	I	I	0	I	w m F344/	Crl	I	I	2 /230 0,9	I	Wolff et al., 1987; Ni- kula, 2000

Inhalationsversuche zur Karzinogenität von GBS und Siliziumdioxid (Tabelle über mehrere Seiten; Fußnoten beginnend Tab. 3.16

	Literatur			Muhle et	Bellmann	et al., 1991							NTP,	19908				
	Tum./	GBS GBS	[%/µL]	I	I	0	0	d U	, C, D			I	0		4,7 ^q		Ι	I
	Satten mit	bs./unter-	sucht, %]	00 011	כי רוי			D A A P	/ + + + + + + + + + + + + + + + + +	10 10	0,- 0,-	/111 2,7	0 / 48 0	1/50 2	3 */ 50 26	1/50 2	1/50 2	0/49 0
	_	n.~2 J. [[mg] ^e	0,19	0,24	1,41	2,05	13,0	18,1	2,24	3,20	ۍ ۱	9,1 ^r	10,5 ^r	29,4 ^r 1	24,2 ^r	I	
	in Lunge	osition ^b	[hL/g] ^d	0,1	0,09	0,55	0,60	4,3	5,1	0,32	0,30	I	1,7	1,6	5,1	7,5	I	I
	S-Dosis	Jahr Exp	[hL] [°]	0,1	0,13	0,57	0,85	4,4	7,3	0,33	0,42	344	1,7	1,6	5,1	7,5	1/N	4/N
	GE	iach ca. 1 ,	[bm]	/ 0,12 ⁿ	10,16 ⁿ	/ 0,69 ⁿ	1,03 ⁿ	/ 5,32 ⁿ	1 8,7 ⁿ	/ 1,4 ⁿ	1,8 ⁿ	w m F	/ 4,7 ^r	1 4,4 ^r	/ 14 ^r	1 21 ^r	w F34	m F34.
	ition	[h/Wo., r		5×6 и	2	5×6 и	2	5х6 и	2	5х6 и	2	I	5х6 и	u	5×6 и	u	I	
)	Expos	[mg/m ³]		0,35		1,5		5,4		3,9		0	9		18		0	
	Dichte	[g/mL]		1,2						4,3		I	2,8 ^q				I	
	Spezif.	fläche	[m²/g]	3,6								I					I	
	Durch-	[µm] ^a		MMAD	~ 4, geom.	SA 1,5; MW 3,5				MMAD	L, L	I	MMAD	z, l - J, z			I	
	Stoff			Toner	(gleicher Typ wie im	Instillations- versuch)				TiO ₂ Rutil		Kontrolle	Talk				Kontrolle	

Stoff	Durch-	Spezif.	Dichte	Expo	sition	GE	3S-Dosis	in Lunge		Ratten mit	Tum./	Literatur
	[µm] ^a	fläche	[g/mL]	[mg/m ³]	[h/Wo.,	nach ca. 1	Jahr Exp	osition ^b	n.~2 J.	Lu.tum. [abs./unter-	GBS	
		[m²/g]			24 MO.J	[ɓɯ]	[hL] ^c	[hL/g] ^d	[mg] ^e	sucht, %]	[%/µL]'	
Ruß Printex	0,014	230	1,85	9	10 Mo. ^s	15,4	8,3	5,5		12 */ 72 17	2,0	Heinrich et
00					20 Mo. ^s	15,4	8,3	5,5		7 */ 72 9,7	1,2	al., 1994
$NO_2 + SO_2 + C_2$	Ι	I	I	5 + 5 +	10 Mo. ^s	w Wistar		I	I	1/72 1,4	I	
Fumauenyu					20 Mo. ^s			I	I	0 / 72 0	I	
Kontrolle	Ι	I	Ι	0	Ι			I	I	0 / 72 0	I	
Ruß Printex 90 ^t	0,014 ^u	227	1,85	7-12 ^v	5 x 18	38	20,5	14	44	39 * /100 39	1,9	Heinrich et al., 1995
TiO ₂ P 25	0,021 ^u	48	3,8	7-15 ^w	5 x 18	35	9,2	6,1	39	32 * /100 32	3,4	
Dieselmotor-		Nativ	1,85 ^k	0,8	5 x 18	2,8	1,5	1,0	6,3	0 /198 0	0	
~40 % org.	0,015-16	Extrakt		2,5	5 x 18	11	5,9	4,0	24	11 * /200 5,5	0,8	
Stotte		90-130		7,0	5 x 18	36	19	13	64	22 * /100 22	1,1	
Kontrolle	Ι	Ι	I	0	I	w Wis	tar	I	I	1 /217 0,5	Ι	

	Literatur			Nikula et	al., 1990								
	Tum./	GBS GBS	[%/hL] ⁺	2,2		4,1		1,4		2,5		I	I
	Ratten mit	Lu.turn. [abs./unter-	sucnt, %]	8 * /107 7,5	2 /106 1,9	28 * /105 27	4 /106 3,8	8 * /105 7,6	5 /105 4,7	29 * /106 27	9 /106 8,5	0 /105 0	3 /109 2,8
		n.~2 J.	[mg] ^e	17	25	37	40	96	45	81	06	Ι	Η
	in Lunge	osition ^b	[hr/g] ^d	2,2	2,8	4,3	5,4	3,5	4,3	7,6	10	I	I
	3S-Dosis	Jahr Exp	[hL] ^د	3,4	4,3	6,5	8,1	5,3	6,5	11	15	4/N	4/N
	GI	nach ca. 1	[bu]	w 6,2	m 7,9	w 12	m 15	w 9,8	m 12	w 21	m 28	w F34	m F34
	sition	[h/Wo.,	z4 M0.]	5 x 16	5 x 16	5 x 16	5 x 16	5 x 16	5 x 16	5 x 16	5 x 16	I	I
•	Expos	[mg/m ³]		2,5	2,5	6,6	6,6	2,4	2,4	6,3	6,3	0	0
	Dichte	[g/mL]		1,85 ^y				1,85 ^k				I	
	Spezif.	fläche	[m²/g]									Ι	
	Durch-	[µm] ^a		< 0,05 ^x								Ι	
	Stoff			Ruß Elftex-	1∠, furnace	black		Dieselmotor-	erniss., Anten organ. Stoffe	nicnt genannt		Kontrolle	

)					6			
Stoff	Durch-	Spezif.	Dichte	Expo	sition	GE	BS-Dosis	in Lunge		Ratten mit	Tum./	Literatur
	[hm] ^a	fläche	[g/iiiiL]	[mg/m ³]	[h/Wo.,	nach ca. 1	Jahr Exp	osition ^b	n.~2 J.	Lu.tum. [abs./unter-	GBS GBS	
		[m²/g]			24 MO.]	[ɓɯ]	[hL] ^د	p [6/71]	[mg] ^e	sucnt, %]	[%/hL]'	
Dieselmotor-			1,85 ^k	3,5	3 x 17h							Iwai et al.,
Emissionen				+ - 4,	3 Mo.	1,35	0,7	0,49		0 / 48 ^z 0	0	7000
				-	6 Mo.	2,3	1,2	0,83		6 * / 43 ^z 14,0		
				<u>.</u>	9 Mo.					19 * / 47 ^z 40,4		
				<u>.</u>	12 Mo.	4,5	2,4	1,6		10 * / 44 ^z 22,7	8,6	
Kontrolle	I	I	I	0	I	w F3.	44	I	I	1 / 48 2,1	I	
						Siliziumdio	xid					
Quarz DQ12,	MMAD		2,6	0,74	5 x 6	m 0,75 ⁿ	0,29	0,19	1,03	20 * /113 17,7	64,3	Muhle et
bergpau- forschung, Essen	1,4 µm, geom. SA 1,8					w 0,57 ⁿ	0,22	0,14	0,79			aı., 1991; Bellmann et al., 1991
^a Entweder MN	IAD (mass r	median ae	rodynamic	diameter),	zum Teil r	nit Angabe de	es Bereich	s, oder mitt	lerer Durch	ımesser von Primå	arteilchen	oder von Ag-

Diese Dosis repräsentiert von den verfügbaren Daten die wirksame Dosis nach Inhalation von GBS wahrscheinlich am ehesten. Daher wurden nur diejenigen Versuche in die Tabelle aufgenommen, für die ein solcher Wert angegeben war oder sich als Mittelwert errechnen ließ. glomeraten/Aggregaten (SA = Standardabweichung; MW = Mittelwert).

^c Aus der Staubmasse und der Dichte berechnet.

م

Das Staubvolumen pro g Lunge ist hier der Vollständigkeit halber aufgenommen, da auch bei Roller (2008) so enthalten; es ist in Bezug auf den Grenzwert der MAK-Kommission von 1 μL/g Lunge (Greim, 1997) von Bedeutung. Die Werte in dieser Spalte geben den Faktor an, um den die GBS-Beladung der Lunge den Grenzwert übersteigt. Bei der Berechnung des Staubvolumens pro g Lunge wurde in den meisten Fällen davon ausgegangen, dass das Frischgewicht der unbehandelten Rattenlunge etwa 1,5 g beträgt (Greim, 1997). σ

Ausnahmen: Kohle 1,68 g, TiO ₂ Sprague- bereits pro µL/g Lunge angegeben (s. Fi Lungengewichte für die Kontroll-Lungen a Die nach 2 Jahren gefundene Staubhast ein zwischen den Tumorhäufigkeiten nach ei von Iwai et al. (2000) weist in die gleiche onen zu rechnen, da diese in kurzer Zeit (Die Tumorhäufigkeit in % pro µL GBS in und Vergleiche zwischen den karzinoger liegt wie bei Wistar-Ratten. Zur Berechnu figkeiten in einer exponierten Gruppe, kle Ergebnisse nur zum Teil eingetragen. Wi stämme die Tumorhäufigkeiten zum GBS ke von TiO ₂ -F in dem Versuch von Lee et al. (1995). Nach Angabe für Kohlenstäube in Tab. 3. Nur 6 Lungen histologisch untersucht, di Lungentumor. Nach Weast et al. (1989). In Analogie zum Industrieruß wird für die ruß zu Dieselruß unterschiedlichen Anteilk Mittelwert aus den Messungen nach 9 unc Aus dem Gesamtversuch lassen sich 4 Gi die nach Exposition im Mittel zwischen 9 Gramm Lunge aufwiesen als die relativ h (0,57 µL). Unter diesen 450 Ratten wurde ist mit 5 Tumortieren unter insgesamt 114 Risiko der am höchsten exponierten Tone zirka 1 Jahr retinierten Toner-Staubvolum
--

	pretation von "negativen" Studien in der arbeitsmedizinischen Epidemiologie von Woitowitz et al. (1996) anzuwenden. Die Zahl in der Spalte "Tum./ retin. GBS [%/μL]" ergibt sich rechnerisch nach 3 % / [(4,4 μL + 7,3 μL) / 2] = 0,51 %/μL.
σ	¹ Nach Ramdohr und Strunz (1967).
<u> </u>	Die veröffentlichten Werte beziehen sich bereits auf das Frischgewicht von 1 g Lunge der Kontrollratten.
S	⁵ Expositionszeit pro Woche 5 Tage je 17 h. Die Versuchsgruppen mit NO ₂ + SO ₂ + Formaldehyd dienten zur Untersuchung der Frage nach der Bedeutung der gasförmigen Bestandteile von Dieselmotoremissionen für die Karzinogenität. Verhältnisse der Expositionen zum MAK-Wert von 2002 (ohne Berücksich- tigung der längeren Expositionsdauer pro Tag): NO ₂ 1-fach, SO ₂ 10-fach, Formaldehyd 10-fach. Die Exposition gegenüber diesem Gasgemisch führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Lungentumorhäufigkeit.
+	0,04 % der Masse extrahiert im Vergleich zu 40 % bei Dieselruß mit der gleichen Methode. Mittelwerte pro mg Printex 90: 0,6 pg Benzo[a]pyren (Dieselruß 3,9 ng), 1-Nitropyren < 0,5 ng/mg, (Dieselruß 19,1 ng/mg).
Þ	¹ In Vorversuchen lagen die mass median aerodynamic diameter (MMAD) von TiO ₂ und Ruß durch die Agglomeration der Primärpartikeln bei etwa 1,5 µm. Um die Deposition in den terminalen Atemwegen zu erhöhen, wurden die größeren Partikeldurchmesser durch einen Zyklon abgeschieden, so dass MMADs von 0,8 µm (TiO ₂) und 0,64 (Ruß) entstanden.
>	/ Mittlere Expositionskonzentrationen: 4 Mon. 7,4 mg/m ³ ; 20 Mon. 12,2 mg/m ³ .
3	ⁿ Mittlere Expositionskonzentrationen: 4 Mon. 7,2 mg/m ³ ; 4 Mon. 14,8 mg/m ³ ; 16 Mon. 7,2 mg/m ³ .
×	^c Korngröße nicht angegeben. Es kann davon ausgegangen werden, dass der mittlere Durchmesser der Primärteilchen dieses in den USA hergestellten Ru- ßes deutlich unter 0,050 µm liegt, denn die mittleren Durchmesser der von Degussa produzierten Furnaceruße sind im Bereich von 0,014 bis 0,056 µm an- gegeben (Degussa, 1994).
>	Dichte nicht genannt. Degussa (1994) gibt als Dichte f ür die dort produzierten Ruße allgemein den Bereich von 1,8 bis 1,9 g/mL an, daher wird von 1,85 g/mL ausgegangen.
Ν	² 182 der 192 Ratten der vier exponierten Gruppen überlebten länger als 18 Monate, 35 (19 %) entwickelten zumindest 1 Lungentumor. Die Tierzahlen pro Gruppe betreffen Ratten, die mehr als 18 Monate überlebten.

Stoff	Mittl. Durch-	Spezif. Oberfl.	Dichte [g/mL]	Dosis intratra	acheal	GBS-Volum in Lunge	len	Lungentu	orim. Im.	Tum./ reti- nierte GBS	Literatur
	[mess.	() [m ² /g]		wöchentl. Instill. x mg	Volum. [µL] ^a	gesamt [µL]	[hr/g ^c [Jul/g	sucht, %	6]	[70/µL]	
Aktivkohle			1,4 ^e	10 × 1	7,1	4,8	3,2	11 / 23 ^f	48	10	Kawabata
Dieselruß			1,85 ^g	10 × 1	5,4	3,6 ^h	2,4 ^h	31 / 42 ^f	74	21 ^h	et al., 1986
Trägerflüssigkeit			I	10 x 0,2 mL	I	w F344		1 / 23 ^f	4,3	I	
Unbehandelt			I	I	I			0 / 50 ^f	0	I	
Magnetit			5,18 ⁱ	15 x 15	43	29	19	25 / 34	69	2,4	Pott et al.,
NaCI-Lösung	I	I	I	20 x 0,3 mL	I	I	I	0 / 40	0	0	1987
Hämatit		2,5	5,24 ⁱ	15 x 10	29	19	13	18 / 34	53	2,8	Pott et al.,
Magnetit		7,0	5,18 ¹	5 x 10	9,7	6,4	4,3	9 / 36	25	3,9	1994; Pott und Roller,
				15 x 10	29	19	13	25 / 37	68	3,6	1994
Aktivkohle		860	1,4 ^e	10 × 3	21	14	9'2	10 / 37	27	1,9	
				20 × 3	43	29	19	14 / 39	36	1,2	
TiO _{2,} Anatas	0,2	9,1	3,84 ⁱ	15 X 3	12	7,8	5,2	2 / 39	5,1	0,65	
TiO ₂ , Rutil		5,2	4,26 ⁱ	20 × 3	14	9,4	6,3	1 / 39	2,6	0,28	
SiC		6,1	3,22 ⁱ	20 × 3	19	12	8,3	4 / 36	11	0,92	
Dieselruß, Lkw		34 ^k	1,85 ^g	15 × 3	24	16 ^h	11 ^h	26 / 40	65	4,1 ^h	

Instillationsversuche zur Karzinogenität von GBS und Siliziumdioxid an (Wistar-)Ratten (Veröffentlichungen vor 2000; Tabelle über zwei Seiten; Fußnoten beginnend auf zweiter Seite der Tabelle) Tab. 3.17

Ratten (Fortsetzung)
an (Wistar-)
nd Siliziumdioxid a
on GBS ur
Instillationsversuche zur Karzinogenität vo
5. 3.17

stoff	Mittl. Durch-	Spezif. Oberfl.	Dichte [g/mL]	Dosis intratra	acheal	GBS-Volum in Lunge	len	Ratten m. Lungent	prim.	Tum./ reti- nierte GBS	Literatur
	mess. [µm]	(BEI) [m ² /g]		wöchentl. Instill. x mg	Volum. [µL] ^a	gesamt [µL] ^b	[JuL/g [Jul/g	laos./ur sucht,	%]	[70/µL]	
Dieselruß,	0,2		1,85 ^g	10 X 3	16	11 ^h	7,0 ^h	35 / 58	60	5,5 ^h	Pott et al.
				20 × 3	32	21 ^h	14 ^h	25 / 38	66	3,1 ^h	und Roller,
Ruß Printex 90	0,014	270	1,85	15 x 3	24	16	11	24 / 37	65	4,1	setzung)
NaCI-Lösung	I	I	I	15 x 0,4 mL	I	I	I	0 / 39	0	0	
NaCI-Lösung	I	I	I	20 x 0,4 mL	I	I	I	0 / 40	0	0	
Dieselruß, orig.		12	1,85 ^g	ges. 15 mg ^m	8,1	5,4 ^h	3,6 ^h	8 / 48	17	3,1 ^h	Dasen-
Dieselruß,		138	1,85 ^g	ges. 15 mg ^m	8,1	5,4	3,6	2 / 48	4,2	0,78	brock et al., 1996
				ges. 30 mg ^m	16,2	11	7,2	10 / 48	21	1,9	
Ruß, 101, _n extrahiert ^{,n}	0,095	22	1,85	ges. 15 mg ^m	8,1	5,4	3,6	4 / 48	8,3	1,5	
Ruß Printex 90, ex- trahiert	0,014	271	1,85	ges. 15 mg ^m	8,1	5,4	3,6	11 / 48	23	4,3	
NaCI-Lösung, 0,25 % Tween 80	I	I	I	3 x 0,2 mL, 13 x 0,3 mL	I	I	I	0 / 47	0	0	

^a Berechnet aus Partikelmasse und Dichte.

^b Der Anteil der GBS-Dosis, die in der Lunge längerfristig verbleibt, wird im Mittel mit 2/3 der instillierten Dosis angenommen.

^c Berechnet unter der Annahme eines mittleren Lungengewichts der Kontrolltiere von 1,5 g, siehe Fußnote d von Tab. 3.16.

^d Ein Maß für die karzinogene Potenz des GBS in der betreffenden Versuchsgruppe. Erläuterung siehe Abschnitt 2.3.3.

^e Dichte von Kohle angenommen, da keine Angabe für die Dichte von Aktivkohle verfügbar.

Anzahl Ratten, die mindestens 18 Monate überlebten.

- ^g Dichte in Analogie zu Ruß angenommen.
- ist und der Effekt pro µL Partikeln entsprechend höher. In dem Experiment von Dasenbrock et al. (1996) waren 47 % der Masse extrahierbar; falls dieser An-^h Die Berechnung berücksichtigt nicht, dass nur der Kohlenstoffkern biobeständig ist. Infolgedessen ist zu erwarten, dass die retinierte Partikelmasse geringer teil in der Lunge gelöst wird, errechnet sich die doppelte Wirkung pro µL Ruß.
- Nach Weast et al. (1989)
- als das Ergebnis von 2001. Eine Heterogenität von Dieselruß-Oberflächen lässt sich auch an anderen Beispielen zeigen; aber auch beim Industrie-Ruß Prin-tex 90 wurden Werte zwischen 227 und 337 m²/g gemessen. k Gleiche Herkunft wie der Dieselruß aus der 19-Stäube-Studie (Tab. 3.19, 3.20), aber die BET-Oberfläche, die 1987 gemessen wurde, war deutlich größer
 - ^m 16 17 Instillationen ungleicher Einzeldosen.
- ⁿ Dreimal 30 Min. Extraktion mit kochendem Toluol. 47 % der Masse wurden vom Dieselruß extrahiert, bei den beiden Industrierußen < 0,1 %.

Stoff,	Herkunft,	Ko	rngröl [µm]	ße ^b	Part.zahl	Dichte	Spez.	Quarz	Asche
Bezeichnung	termin	10 % <	50 % <	90 % <	x 10 ⁹	[g/mL]	[m ² /g]	[%]	[%]
Kohle, gemahlene Magerkohle	Nieder- rhein.Bergw erks-AG ^d	1,6	4,0	7,6	0,27	1,4	4,1 ^e 1,50 ^f	< 0,1	5,1
Kohle, gemahlene untere Fettkohle ^g	DMT 1994	1,0	1,8	3,4	1,7	1,4	9,9 ^e 2,80 ^f	< 0,1	6
Fettkohle, quarzarmer Grubenstaub ^h	DMT 1994	1,5	3,4	6,1	0,54	1,8	6,4 ^e 1,75 ^f	1,3	~40
Gasflammkohle, quarzreicher Grubenstaub ⁱ	DMT 1994	1,0	2,4	4,7	1,5	2,2	10,9 ^e 2,32 ^f	9,0	~60
Gestein, Grubenstaub ^j	DMT 1994	0,8	2,3	4,6	1,2	2,4	17,6 [°] 1,78 ^f	16,7	86
Quarz, Dörentrup Mahlg. Nr. 12	Hauptstelle ^k 1966/67	0,6	1,1	2,3	3,6	2,6	8,8 ^e 3,10 ^f	99,1	

Tab. 3.18 Kenndaten^a der 6 Stäube des 1. Teils der 19-Stäube-Studie (Bergbaustäube; Pott und Roller, 2005; Roller, 2008; s. Tab. 3.20)

^a Überlassung von 4 der 6 Stäube sowie der Messdaten durch Herrn Dr. Armbruster, Deutsche Montan Technologie GmbH, Geschäftsbereich Pro Tec, Essen.

^b Messung mit dem Coulter Counter. Das Signal dieses Messgerätes ist primär abhängig vom Teilchenvolumen, d. h. mit dieser Methode wird der volumen- bzw. massenäquivalente Kugeldurchmesser von unregelmäßig geformten Partikeln bestimmt; als untere Grenze des Messbereichs wurde ein Äquivalentdurchmesser von 0,6 µm angegeben (Armbruster et al., 1979). Es ist nicht auszuschließen, dass die Stäube Teilchen mit kleinerem Durchmesser enthalten, die bei der Messung nicht erfasst wurden. Wahrscheinlich wären bei einem elektronenmikroskopischen Messverfahren die 10-, 50- und 90-Perzentile zu niedrigeren Durchmesserwerten hin verschoben.

- ^c Durch Rückrechnung aus der Korngrößenverteilung ermittelt, keine direkten Messdaten.
- ^d Überlassen von Dr. Weller, ca. 1970.
- ^e Oberflächenbestimmung durch Eickhoff (2001) nach der so genannten BET-Methode. Dieser Wert wurde für weitere Berechnungen verwendet.
- ^f Spezifische Oberfläche, berechnet aus dem Partikelvolumen, das sich aus der Partikelgrößenverteilung ergibt, und zwar unter der Annahme einer Kugeloberfläche (s. Fußnote b).
- ⁹ Gereinigt und gemahlen, Tremonia II.
- ^h Sammlung aus der Luft unter Tage in den *Bochumer Schichten* mit BAT II-Gerät.
- ⁱ Sammlung aus der Luft unter Tage in den *Essener Schichten* mit BAT II-Gerät.
- ^j Sammlung aus der Luft einer unter Tage führenden Straße, Feinfraktion des Staubes aus einer Filtereinheit. Der hohe Ascheanteil von 86 % setzt einen geringen Kohlegehalt voraus, daher die Bezeichnung *Gesteinsstaub* anstatt *Kohlenstaub*.
- ^k Hauptstelle für Staub- und Silikosebekämpfung des Steinkohlenbergbauvereins, Essen.

Tab. 3.19Kenndaten der 13 Stäube des 2. Teils der 19-Stäube-Studie (Nicht-
Bergbaustäube; Pott und Roller, 2005; Roller, 2008; s. Tab. 3.20)

Stoff, Bezeichnung	Korngröße Mittelw. ^a [µm]	Dichte [g/mL]	BET- Oberfl. [m ² /g]	Herkunft / Hersteller	Literatur oder nähere Angaben
Flammruß 101	0,095	1,8 - 1,9	20; 18,4 ^b	Degussa	Degussa,
Furnaceruß Printex 90	0,014	1,85 ^c	300; 337 ^b	Degussa	1991, 1994
Aluminiumoxid C^d , > 99,6% Al ₂ O ₃	0,013 ^c 0,020	2,9 3,2 ^{c,e}	100 ± 15 124 ^b	Sigma-Aldrich / Degussa	Degussa, 1983a, 1989
Aluminiumsilikat P 820, 9,6% Al ₂ O ₃ , 82% SiO ₂ , 8% Na ₂ O	0,015 ^f	2,1	100 62,9 ^b	Sigma-Aldrich / Degussa	Degussa, 1982
Kaolin, hydratisiertes Aluminiumsilikat, K 7375 <i>[1332-58-7]</i>	0,1 - 4 ~2 ^c	2,5 ^c	19 ^b	Sigma-Aldrich	Katalog von Sigma-Aldrich
Dieselruß	0,2 ^c (Agglom. + Aggregate)	1,85 ^g	12,9 nativ 34,5 ^{b,h} extrahiert	Dr. Tomingas	siehe Text
TiO ₂ P 25, hydrophil, überwiegend Anatas	0,030/0,021 0,025 ^c	3,8	50 ± 15 52 ^b	Degussa	Deg., 1983a, 1989 Nolan et al., 1989
TiO ₂ P 805 ⁱ , AL 90,003-2, hydrophob ^j	0,021	3,8	45 ± 10 32,5 ^b	Sigma-Aldrich / Degussa ^j	Deg., 1989, 1996 Pott et al., 1998a,b
Test Toner für Kopierer (Polymer mit Rußkern)	3,5 (MMAD 4,0; geo.Stand abweich. 1,5)	1,2	3,6 ^b	Xerox	Bellmann et al., '91 Muhle et al., 1990, 1991
TiO ₂ Anatas AL 23,203-3 <i>[1317-70-0]</i> , (hydrophil)	0,2 ^c	3,9	9,1 9,9 ^b	Sigma-Aldrich	Nolan et al., 1987 Pott et al., 1994
Zirkon(IV)-oxid, 99% ZrO ₂ AL 23,069-3	< 5 ^k ~2 ^c	5,85 ^m	4,4 ^b	Sigma-Aldrich	Katalog von Sigma-Aldrich
Lungenstaub, Bergmann, Silikose Grad III (336/1)	0,2 ^c	~2 ^c	12,2 ^b	Dr. Brockhaus	siehe Text
Silica fumed, Si S5505 (amorphes SiO ₂)	0,014	2,2 ⁿ	200 ± 25 210 ^b	Sigma-Aldrich	Katalog von Sigma-Aldrich

Fußnoten siehe nächste Seite

Fußnoten zu Tab. 3.19

- ^a Bei Degussa-Stäuben Berechnung des arithmetischen Mittelwerts nach Bestimmung der Durchmesser von 3.000 - 5.000 Teilchen über elektronenmikroskopische Aufnahmen (Degussa, 1983b); zum Teil abweichende Angaben in verschiedenen Veröffentlichungen.
- ^b Oberflächenbestimmung nach dem BET-Verfahren durch Eickhoff (2001). Dieser Wert wurde für weitere Berechnungen verwendet.
- ^c Für den getesteten Staub liegt kein Messwert oder mehr als eine Information vor. Aufgrund des Datenumfeldes wurde der mit ^c gekennzeichnete Wert als dem korrekten Wert nächstliegend angenommen und weiteren Berechnungen zugrunde gelegt. Im Falle des Kaolin wird der Wert von zirka 2 µm gestützt durch Daten von K. Rödelsperger (persönliche Mitteilungen, 2005, 2006).
- ^d Herstellung hochdisperser Oxide wie Aluminuiumoxid C und TiO₂ P 25 durch Hochtemperaturhydrolyse der entsprechenden Chloride (Verfahren 1941 von Degussa entwickelt: AEROSIL[®]-Verfahren). Obwohl Aluminiumoxid C in einer Knallgasflamme entsteht, ist es kristallographisch ausschließlich der δ-Gruppe zuzuordnen. Die Primärteilchen zeigen unter dem Elektronenmikroskop kubische Formen mit abgerundeten Ecken. Sie besitzen ähnlich wie AEROSIL[®] keine innere Oberfläche. Diese Tatsache lässt sich aus der Übereinstimmung der nach der BET-Methode und der durch Auswertung von EM-Aufnahmen ermittelten spezifischen Oberflächen ableiten. Agglomerate, die reproduzierbar gemessen werden können und in DIN 53206 definiert sind, treten bei den pyrogenen Oxiden nicht auf. Die tatsächlich vorliegenden Agglomeratgrößen hängen von der "Vorgeschichte" und den Verarbeitungsbedingungen ab. (Weitere Charakterisierungen in Degussa, 1989.)
- ^e Bestimmt mit Luftvergleichspyknometer.
- ^f Größe der Primärteilchen bei Silikaten wegen starker Verwachsungen nicht genau bestimmbar.
- ^g Für den elementaren Rußkern in Analogie zum technischen Ruß 1,85 g/mL angenommen (s. oben, Degussa). Entsprechend UBA (1999) wurde davon ausgegangen, dass 50 % der Masse des nativen Dieselrußes von LKW Stoffen zuzurechnen sind, die sich in der Lunge leicht lösen (s. Text). Infolgedessen reduzieren sich z. B. 5 mg Diesel-Gesamtpartikelmasse in der Lunge auf 2,5 mg (= elementarer Rußkern); sie ergeben bei einer Dichte von 1,85 g/mL ein Volumen von 1,35 µL.
- ^h Der Wert von 12,9 m²/g betrifft die Gesamtpartikelmasse, der Wert von 34,5 m²/g betrifft extrahierten Ruß. Beide Werte wurden von Eickhoff (2001) ermittelt, für die weiteren Berechnungen wurde der Wert des extrahierten Rußes verwendet, da dies eher der In-vivo-Situation entsprechen dürfte.
- ¹ Substanz nicht im Sigma-Aldrich-Katalog verzeichnet, daher war seinerzeit bei Sigma-Aldrich nachgefragt worden, ob TiO₂ T 805 von Degussa in kleiner Menge lieferbar sei. Die angefragte Position wurde angeboten, jedoch nur in einer Menge von 40 kg. Lieferung in 2 Behältern mit der Bezeichnung P 805. Der nachdrücklichen Bitte um Klärung kamen weder Sigma-Aldrich noch Degussa nach; daher ist es nicht beweisbar, dass das P 805 der Studie mit T 805 identisch ist.
- ^j Hydrophobierung von P 25 im Falle von T 805 mit Trimethoxyoctyl-Silan (Degussa, 1996).
- ^k Die Partikelgröße wurde von der Lieferfirma mit < 5 µm angegeben. Rödelsperger (persönliche Mitteilung, 2005) fand ein heterogenes Material sowohl mit ultrafeinen Partikeln als auch mit viel größeren Partikeln bis zu 10 µm gemäß Rasterelektronenmikroskopie. Aus der relativ geringen spezifischen Oberfläche (4,4 m²/g) ist aber zu schließen, dass der Staub angemessen der Gruppe der groß-feinen GBS zuzuordnen ist.
- ^m Nach Weast et al. (1989).
- ⁿ Der Hersteller der Probe ist nicht angegeben, möglicherweise handelt es sich um AEROSIL[®]. In der Tabelle ist die Dichte von AEROSIL[®] genannt (Degussa, 1984); die von Sigma-Aldrich angegebene spezifische Oberfläche von *Silica fumed* ist mit derjenigen von AEROSIL[®] 200 identisch. Die mittlere Primärpartikelgröße von AEROSIL[®] 200 wird mit 0,012 µm angegeben, Teilchenoberfläche glatt und porenfrei.

Neuere Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intratrachealer Instillation von GBS und Siliziumdioxid bei Rat-ten: Vergleich der 19-Stäube-Studie (Staubcharakterisierung s. Tab. 3.18-3.19) mit einem anschließenden UBA-Tab. 3.20

77	ојект (га	pelle uper	menrere Se	siten; rui	snoten D	eginnend a	ur ietzter	Selle der	l abelle)		
Cubetanz	Durch-	Instil-	Retiniertes c+b_Vol_b	Ratten	A	Ratten m. nzahl und %	Lutum. von " <i>at ri</i> s	<i>k</i> "	% Tumorhä µL retin	ufigkeit pro . Staub ^d	Größen- klasse und
Oubstantz	[hm] ^a	[mg]	500701. [µL]	at risk ^c	"normal z	e" Schnitt- ahl	hohe Scl	hnittzahl	"normale" Schnittzahl	hohe Schnittzahl	Potenz
			19 – Stäu	be-Stu	ıdie (Pot	tt und Roller,	2005; Roll	ler, 2008)			
			GBS (ge	sordnet na	ch zunehr	nender mittler	er Partikelg	röße)			
Aluminimized C	0.013	5 x 6	9	44	36	81,8	ł	1	13,6	1	
	0,010	10 x 6	12	47	34	72,3 ^g	1	1	6,0	-	"Nano"
		5 x 1,5	3	46	31	67,4	ł	1	22,5	1	= ultrafein
Ruß Printex 90	0,014	5 x 3	5,8	45	37	82,2	ł	ł	14,9	1	Spezifisches
		5 x 6	11	48	40	83,3 ^g	ł	ł	7,6	1	Risiko:
Aluminiumsilikat	0.015	5 x 6	10	47	28	59,6	1	1	6,0	-	pro µL/g
P820	0,010	10 x 6	19	45	34	75,6	ł	ł	4,0	1	Dolotivo
		5 x 3	2,6	42	22	52,4	1	1	20,2	-	Potenz:
TiO ₂ P25	0,025	5 x 6	5,3	46	31	67,4	ł	ł	12,7	1	5,6
		10 x 6	11	46	32	69'0 ^g	ł	ł	6,3	1	
Ruß lamp black	0.005	5 x 6	11	45	27	60,0	1	1	5,5	-	klain_fain"
101	0,000	10 x 6	22	46	29	63,0 ^g	1	ł	2,9	-	
TiO ₂ (Anatas,		10 x 6	10	44	13	29,5	ł	ł	3,0	-	Spezifisches Dicitor
fein)	0,6	20 x 6	21	44	28	63,6	1	ł	3,0	-	9,6 %
		3 x 2,5	1,4	45	2	4,4	1	1	3,1	-	pro µL/g
Dieselruß	0,2	5 x 3	2,7	47	12	25,5	1	ł	9,4	-	Relative
		5 x 6	5,4	45	18	40,0	1	1	7,4	-	Potenz:
Lungenstaub ^h	0,2	10 x 6	20	40	32	80,0	1	ł	4,0	-	4 , -

Neuere Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intratrachealer Instillation von GBS und Siliziumdioxid bei Rat-ten (Fortsetzung) Tab. 3.20

	Durch-	Instil-	Retiniertes	20 10 10		Ratten m.	Lutum. von " <i>at ri</i> s		% Tumorhä	ufigkeit pro Staub ^d	Größen- klasse und
Substanz	messer [µm] ^a	lationen [mg]	StbVol. ^D [µL]	at risk ^c	"norma	e" Schnitt- cahl	hohe Sci	nittzahl	"normale" Schnittzahl	hohe Schnittzahl	Potenz ^e
Untere Fettkohle,	0	10 x 6	29	48	26	54,2	1	1	1,9	1	
gemahlen	<u>,</u>	20 x 6	57	44	34	77,3	1	1	1,4	1	
Kaolin	c c	10 x 6	16	48	20	41,7	1	1	2,6	1	
~Al₂Si₂O₅(OH)₄	۲,0 ۲	20 x 6	32	47	35	74,5	1	1	2,3	1	
ZrO ₂	~ 2	10 x 6	6,8	47	4	8,5	1	1	1,3	1	"groß-tein"
Gestein, Kohlen-	с с	10 x 6	17	47	16	34,0	1	1	2,0	1	Spezifisches
grube	۶, ²	20 x 6	33	45	26	57,8	1	1	1,7	1	Risiko: 4.6 %
Gasflammkohle,	Ċ	10 x 6	18	43	31	72,1	1	1	4,0	1	pro µL/g
Grubenstaub	۸ 4	20 x 6	36	45	38	84,4	1	1	2,3	1	Relative
Fettkohle,	, c	10 x 6	22	48	27	56,3	1	1	2,5	1	Potenz:
Grubenstaub	0 4	20 x 6	44	45	36	80,0	1	1	1,8	1	1 (Referenz)
Toot Tonor	о Г	10 x 6	33	24	13	54,2	1	1	1,6	1	
	c, c	20 x 6	67	24	21	87,5	1	1	1,3	1	
Magerkohle, ge-		11 x 6	31	47	27	57,4	1	1	1,8	1	
mahlen	, 5,	20 x 6	57	48	31	64,6	-	1	1,1	1	
					Siliziu	mdioxid					
		5 x 1	1,3 (0,85)	35	23	65,7	-	1	> 51 ⁱ	1	-
Quarz DQ12	1,1	10 x 1	2,6 (1,7)	35	25	71,4	1	1	> 28 ⁱ	1	1
		10 x 2	5,1 (3,4)	36	28	77,8	1	ł	> 15 ⁱ	I	ł

Neuere Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit intratrachealer Instillation von GBS und Siliziumdioxid bei Ratten (Fortsetzung) Tab. 3.20

	Durch-	Instil-	Retiniertes	Ratten	A	Ratten m. nzahl und %	Lutum. von " <i>at ri</i> s	., k	% Tumorhἐ μL retin	iufigkeit pro . Staub ^d	Größen- klasse und
oubstatic	[mm] ^a	[mg]	500701. [µL]	at risk ^c	"normal 2	e" Schnitt- ahl	hohe Sc	hnittzahl	"normale" Schnittzahl	hohe Schnittzahl	Potenz
SiO ₂ amorph, Sigma-Aldrich ^j	0,014 ^j	10 x 3		35	N	5,7	ł	1	0,19	ł	ł
					Kont	rollen					
Kontrollen ^k	ł	1	1	139	~	0,7	1	ł	1	1	
				UBA-P	rojekt	(Kolling et a	I., 2008)				
					G	BS					
Ruß Printex 90	0,014	10 × 0,5	1,8	7	-	14,3	3	42,9	7,9	23,8	1
Magerkohle, gem.	4,0	10 × 1	4,8	17	0	0'0	0	0'0	0,0	0'0	1
					Siliziu	mdioxid					
Quarz DQ12	1,1	1 x 3	0,77 (0,51)	7	9	85,7	9	85,7	> 111 ⁱ	> ۱۱۱ ^ا	1
DQ12 + PVN0	1,1	1 x 3	0,77 (0,51)	7	5	71,4	2	71,4	> 93 ⁱ	> 93 ⁱ	1
SiO ₂ amorph, Aerosil® 150	0,014 ^m	30 × 0,5		31	4	12,9	6	29,0	0,86	1,9	ł
					Kont	rollen					
Vehikel		10 × 0,3 mL		30	0	0,0	0	0,0	1		

Meist durchschnittlicher oder mittlerer Durchmesser der Primärpartikeln (s. Tabellen 3.18-3.19). Im Falle von Dieselruß haben die Ergebnisse der Parti-kelgrößenmessungen zu der Schlussfolgerung geführt, dass die durchschnittliche Größe der meist aggregierten ultrafeinen Primärpartikeln in die Grö-ßenklasse von 0,09 bis 0,2 µm fällt. Das wird durch weitere Auswertungen gestützt, die Bio-Beständigkeit von Dieselruß-Agglomeraten ist unbekannt (Pott und Roller, 2005; Roller, 2008). ത

Das instillierte Staubvolumen wurde aus Staubmasse und Materialdichte berechnet. Mit der Ausnahme von Quarz (s. Fußnote i), Dieselruß (s. Fußnote v) und amorphem SiO ₂ wurde der Anteil des langfristig in der Lunge retinierten Staubes durchgängig mit 2/3 der instillierten Dosis im Mittel einer Gruppe angenommen; dies ist eher im oberen Bereich veröffentlichter Daten (Pott und Roller, 2005; Roller, 2008).
Verhältnis der beobachteten Tumorhäufigkeit zur Dosis, diese ausgedrückt als in der Lunge retiniertes Staubvolumen. Maß der karzinogenen Potenz des Staubs in der jeweiligen Gruppe zum Vergleich mit anderen Gruppen der Versuche. Bei SiO ₂ , amorph: bezogen auf instillierte Masse, weil Retention un- bekannt. Weitere Erläuterungen siehe Abschnitt 2.3.3.
Für die Auswertung der karzinogenen Potenz in der 19-Stäube-Studie waren die so genannten GBS in drei Größenklassen eingeteilt worden: Nano-GBS = ultrafeine GBS (mittlerer Durchmesser 0,09-0,2 μm), groß-feine GBS (mittlerer Durchmesser 1,8-4 μm). In dieser Tabellenspalte sind die Ergebnisse multivariater Regressionsanalysen angegeben (die Tumorhäufigkeiten, die in dieser Tabelle in Kursivschrift gedruckt sind, waren wegen wahrscheinlicher Sättigungseffekte nicht in die Regressionsanalyse einbezogen worden. Das spezifische Risiko repräsentiert die Steigung eines Multistage-Modells im unteren Kurvenbereich, es wurde in der Einheit "% Risiko pro μL retiniertem Staub pro g Lungen-Frischgewicht der Kontrolltiere" angegeben, weil die Größe "μL retinierter Staub pro g Lungen-Frischgewicht der Kontrolltiere" eine Rolle bei der Ableitung des Allgemeinen Staubgrenzwerts spielte (Greim, 1997). Die Relative Potenz ist auf die Größenklasse "groß-fein" mit dem niedrigsten spezifischen Risiko bezogen.
Eine besondere Untersuchung der nicht-neoplastischen Läsionen ergab einen mehr als doppelt so hohen Fibrosegrad verglichen mit Industrieruß und Titatndioxid (Dosismaß: Staubvolumen, Bellmann et al., 2006). Ein demzufolge zu vermutendes spezifisches karzinogenes Potential von Aluminium konnte wegen der bereits hohen Tumorhäufigkeit nicht empririsch nachgewiesen werden.
Die in dieser Tabelle in Kursivschrift gesetzten Tumorhäufigkeiten waren wegen wahrscheinlicher Sättigungseffekte nicht in die Regressionsanalyse ein- bezogen worden (s. Fußnote e).
Staub aus der Asche der Lunge eines mit Silikose des Grades III verstorbenen Bergmannes.
Wegen einer besonderen Tendenz von Quarzstaub, in die Lymphknoten zu gelangen, ist zu erwarten, dass der langfristig in der Lunge retinierte Anteil von Quarzstaub in der Lunge geringer ist als bei den GBS. In früheren Instillationsversuchen mit Quarz DQ12 führten bronchiale Clearance und der "Lymphotropismus" zu einem retinierten SiO ₂ -Gehalt von rund 1/3 der instillierten Masse nach 10 Monaten (siehe Roller, 2008). Deshalb wurde für DQ12 ein zusätzlicher Reduktionsfaktor von 2/3 angenommen (abgeschätzte Retention = instillierte DQ12-Dosis x 2/3 x 2/3). Beispiel: Instillation von 10 mg Quarz mit einer Dichte von 2,6 g/mL führt zu einem langfristig retinierten Staubvolumen von 1,7 µL. Der Wert in der Spalte "% Tumorhäufigkeit pro µL retin. Staub" ist aber so berechnet, als läge auch der Quarzgehalt pro Lunge wie bei den GBS langfristig bei 2/3 der instillierten Menge; diesem Wert ist das Zeichen ">" vorangestellt, um auf die besonderen Verhältnisse hinzuweisen.
Staub bezogen von Sigma-Aldrich, Katalogbezeichnung "silica fumed". Der Hersteller der Probe ist nicht angegeben, möglicherweise handelt es sich um AEROSIL [®] . Die von Sigma-Aldrich angegebene spezifische Oberfläche von <i>Silica fumed</i> ist mit derjenigen von AEROSIL [®] 200 identisch. Als Durchmesserwert wurde dieselbe mittlere Primärpartikelgröße wie bei AEROSIL [®] 150 (Fußnote m) angenommen.

b

Ψ.

۲

.__

٩

συ

Ð

- Die drei Kontrollgruppen der 19-Stäube-Studie kombiniert (Vehikel und unbehandelt).
 - 7 x 20 mg PVNO subkutan (4 Monate).

¥

^m Mittlerer Durchmesser der Primärpartikeln gemäß Angabe von Degussa.
3.1.4 Zusammenfassung der qualitativen und quantitativen Bewertung der Karzinogenität von Stäuben und Rauchen

In der Tab. 3.21 sind die Ergebnisse von Langzeit-Inhalationsversuchen mit Ratten zusammengefasst. Dabei sind ausschließlich Daten der in den Tab. 3.1-3.2, 3.7-3.14 und 3.16 aufgeführten Versuche verwendet. Zur Berechnung eines für den Vergleich aller Stäube geeigneten Potenzmaßes wurde die Exposition "normiert". Das heißt, dass die Partikelkonzentration in der Atemluft anhand der tatsächlichen Expositionsstunden pro Woche linear auf eine "Wochenarbeitszeit" von 40 Stunden umgerechnet wurde. Weitere rechnerische Korrekturen wurden nicht vorgenommen; es ist zu beachten, dass es hier nicht um eine guantitative Risikoabschätzung für den Menschen geht, sondern um einen relativen Potenzvergleich innerhalb von Inhalationsversuchen an Ratten. Deshalb wurde auch nicht ein möglicherweise unterschiedliches Atemzeitvolumen des Menschen in der Freizeit und am Arbeitsplatz berücksichtigt. Es wurde auch nicht die Gesamtexpositionsdauer bezogen auf die Lebenszeit der Tiere in Normierungsrechnungen einbezogen: In aller Regel betrug die Expositionsdauer in den Versuchen zwei Jahre. In den Ausnahmefällen, in denen nur 1 Jahr lang exponiert wurde, ist kein geringerer Effekt offenkundig, in dem Versuch von Heinrich et al. (1994), in dem Ruß sowohl mit 10 Monaten als auch mit 20 Monaten Expositionsdauer getestet wurde, war die Tumorhäufigkeit am Versuchsende (nach zweieinhalb Jahren) in der Gruppe mit der kürzeren Expositionsdauer höher. Möglicherweise spielt aufgrund der langen Latenzzeit der Lungentumoren das zweite Expositionsjahr bei den Ratten keine oder nur eine relativ geringe Rolle für das Lebenszeit-Lungentumorrisiko. Durch eine Korrektur der Expositionskonzentration gemäß Gesamtexpositionsdauer würde daher eventuell keine wirkliche "Korrektur" vorgenommen, sondern ein zusätzlicher Fehler eingeführt (so würde z. B. der Unterschied in der Potenz für Ruß Printex 90 zwischen den beiden Versuchsgruppen von Heinrich et al., 1994, größer anstatt kleiner).

Das Potenzmaß ist in Tab. 3.21 in der letzten Spalte aufgeführt: die prozentuale Häufigkeit an Tieren mit Lungentumor, abzüglich der Häufigkeit in der Kontrollgruppe, bezogen auf die "normierte Expositionskonzentration" (zum Quotienten aus Tumorhäufigkeit und Dosis bzw. Exposition siehe Abschnitt 2.3.3). Zusätzlich zu den Informationen aus den Tabellen 3.1-3.2, 3.7-3.14 und 3.16 ist für das Potenzmaß in Tab. 3.21 die Information aus dem BAuA-Projekt F1876 benutzt (Roller et al., 2006). Dort wurden ED10-Werte aus Inhalationsversuchen an Ratten für Stoffgruppen wie Cr(VI)-Verbindungen und Quarz berechnet. Die ED10 aus dem Tierversuch entspricht dem Langzeit-Mittelwert der Expositionskonzentration, äquivalent zu einer 35-40jährigen Exposition des Menschen am Arbeitsplatz, der nach Analyse der experimentellen Daten rechnerisch mit einem zusätzlichen absoluten Lebenszeitrisiko für Lungenkrebs in Höhe von 10 % assoziiert ist. Die Daten in Tab. 3.21 sind nach dem Potenzmaß in absteigender Reihenfolge sortiert.

Außerdem sind die Tabellenbereiche von Tab. 3.21 je nach Höhe des Potenzmaßes in drei unterschiedlichen Farben markiert. Die Farben signalisieren 3 Potenzklassen. Bei Betrachtung der Ergebnisse aus allen verfügbaren Bereichen von In-vivo-Untersuchungen (Epidemiologie, Inhalationsversuche, Karzinogenitätsversuche mit sonstiger Applikationsart) scheint es sinnvoll, für einen quantitativen Vergleich mit In-vitro-Daten die Maßzahlen der Potenz auf 3 Werte zu begrenzen. Eine höhere "Auflösung" wäre vor dem Hintergrund der unvermeidlichen Streuungen zwischen verschiedenen Verbindungen einer Stoffgruppe (z. B. Cadmium-Verbindungen, "Asbeste") und zwischen den Ergebnissen verschiedener "Testansätze" (einzelne epidemiologische Studien, einzelne Versuchsgruppen in Tierversuchen) in den In-vivo-Systemen einerseits und den Streuungen zwischen einzelnen Ansätzen der In-vitro-Versuche andererseits einem überschaubaren, aussagekräftigen Ergebnis der Vergleichsanalysen sicherlich nicht förderlich.

Für die Inhalationsversuche wurde daher folgende Einteilung in Potenzklassen aufgrund des Risikos pro normierter Exposition (% Tu. pro mg/m³ normiert) vorgenommen:

falls Potenz größer als 10 % pro mg Staubmasse/m ³
falls Potenz größer als 1 % pro mg Staubmasse/m ³ ,
aber kleiner als 10 % pro mg Staubmasse/m ³
falls Potenz kleiner als 1 % pro mg Staubmasse/m ³

Diese massebezogene Einteilung kann stoffübergreifend auf alle Substanzgruppen angewendet werden; das ist auch sinnvoll, weil bei In-vitro-Versuchen häufig nur die Dosis in Form der Substanzmasse angegeben ist.

In Tab. 3.21 ist das Risiko durchgängig auf 1 mg/m³ bezogen; das hat zur Folge, dass in der obersten Potenzklasse Werte größer als 100 % pro mg/m³ auftreten. Das bedeutet selbstverständlich nicht, dass in der Realität mit Risiken größer als 100 % zu rechnen ist, es bedeutet lediglich, dass bei Langzeit-Mittelwerten von 100 µg/m³ mit Risiken im Bereich oberhalb von 10 % zu rechnen ist (nähere Erläuterung in Abschnitt 2.3.3). Die Einheit "Prozent pro mg/m³" ist nicht identisch mit der Einheit "Prozent". Aus dem Umstand, dass hier ein Quotient "Risiko/Exposition" gebildet wird, ist nicht die Schlussfolgerung zu ziehen, dass exakt lineare Expositions-Risikobeziehungen unterstellt werden. Der rechnerische Quotient aus der beobachteten Tumorhäufigkeit (abzüglich Spontanrate) und der normierten Exposition dient als Maß der Wirkungsstärke in vivo. Weil sich diese Wirkungsstärke über alle Stoffe hinweg um mehr als drei Zehnerpotenzen unterscheidet, ergeben sich rechnerisch auch Werte größer als 100 % pro mg/m³. Würde man anstatt auf 1 mg/m³ z. B. auf 1 µg/m³ beziehen, dann ergäben sich rechnerisch für die niedrigste Potenzklasse sehr kleine Zahlenwerte (z. B. 0,0004 % pro µg/m³), die irrtümlich signalisieren könnten, hier sei - ohne legitimiertes Rechenmodell - in niedrige Dosisbereiche "extrapoliert" worden. Es ist daher nochmals zu betonen, dass alle Werte der letzten Spalte der Tab. 3.21 einheitlich auf Zahlenwerten aus dem ieweiligen experimentellen Bereich beruhen. Es könnte argumentiert werden, dass sich im Vergleich von zwei Stoffen die Zugehörigkeit zur Potenzklasse in Abhängigkeit von der Dosis ändern kann, weil unterschiedliche Verlaufsformen der Dosis-Wirkungsbeziehung bei den beiden Stoffen vorliegen. Dies ist einer der Gründe, weshalb hier auf 3 Potenzklassen beschränkt wird, so dass es dann unwahrscheinlich ist, dass sich in relevanten Expositionsbereichen die Zugehörigkeit zu einer Potenzklasse dosisabhängig ändert.

Tab. 3.22 enthält Potenzmaße auf der Grundlage epidemiologischer Daten. Dazu wurden vor allem die epidemiologisch-basierten ED10-Werte des BAuA-Projektes F1876 herangezogen (Roller et al., 2006). Analog zu den Inhalationsversuchen wurde das Exzess-Risiko auf eine "normierte" Expositionskonzentration bezogen. Das ist hier der Langzeit-Mittelwert der Staubmassen-Konzentration im Szenario

Tab. 3.21Karzinogene Potenz bezogen auf normierte Expositionskonzentration in
Inhalationsversuchen zur Karzinogenität von Stäuben und Rauchen
(Details der Versuche siehe Tab. 3.1-3.2, 3.7-3.14, 3.16; Fußnoten sie-
he letzte Seite der Tabelle)

Stoff	Charak-		Expositio	n	% Ratten	% Tu. pro	
	sierung	mg/m³	d x h/Wo.	mg/m ³ normiert ^a	Lu.tum.	miert	
Cadmium-		0,020	7 x 23	0,08	17,9	224	
Cadmium- chlorid (Take-		0,041	7 x 23	0,17	52,6	309	
naka)		0,082	7 x 23	0,33	74,3	225	
CdCl ₂ (Glaser)		0,049	7 x 22	0,189	73,7	390	
CdSO ₄		0,167	7 x 22	0,643	72,5	113	
040		0,116	7 x 22	0,447	80,0	179	
CuS		0,347	7 x 22	1,34	76,9	57,4	
CdO-Staub		0,034	7 x 22	0,131	72,9	556	
CdO-Rauch		0,034	7 x 22	0,131	21,1	161	
Cd -Verb. Mit- telwert						246	
Cadmium- Risikoabschät- zung Ratte ^b				0,03 Cd	10	333 Cd	
Galliumarsenid,	1,0; 1,9 ^c	0,1	5 x 6	0,075	9,0	80	
GaAs (CAS Nr. 1303-00-0)	0,9; 1,8 ^c	1,0	5 x 6	0,75	12,0	12	
GaAs, Mittelw.						46	
Nickelsubsulfid		0,15	5 x 6	0,113	11,3	100	
(CAS NI. 12035-72-2)		1	5 x 6	0,75	18,9	25,2	
Ni-subsulfid , Mittelwert						63	
Nickeloxid		1,25	5 x 6	0,94	11,3	12,0	
(CAS Nr. 1313- 99-1)		2,5	5 x 6	1,875	8,5	4,5	
NiO, Mittelw.						8	
Nickelsulfat (CAS Nr. 10101-97-0)		0,5	5 x 6	0,375	3,7	9,9	

Stoff	Charak-		Expositio	n	% Ratten	% Tu. pro
	teri- sierung	mg/m ³	d x h/Wo.	mg/m ³ normiert ^a	Lu.tum.	mg/m° nor- miert
Nickel- Risikoabschät- zung Ratte ^b				0,4 Ni	10	25 (Ni)
Quarz DQ12	MMAD 1,4 µm	1,0	5 x 6	0,75	17,7	23,6
Quarz- Risikoabschät- zung Ratte ^b				0,5	10	20
Cobaltsulfat-	1,5; 2,2 ^c	0,3	5 x 6	0,225	7,1	27,1
CoSO ₄ ·7H ₂ O	1,4; 2,1 ^c	1,0	5 x 6	0,75	20,4	25,9
(CAS NI. 10026-24-1)	1,6; 2,2 ^c	3,0	5 x 6	2,25	23,0	9,8
Co-sulfat Mit- telwert						20,9
	1,2; 1,9 ^c	0,5	5 x 6	0,375	13,3	24,8
V_2O_5	1,2; 1,9 ^c	1,0	5 x 6	0,75	7,1	4,1
	1,3; 1,9 [°]	2,0	5 x 6	1,5	10,0	4,0
V ₂ O ₅ Mittelwert						10,9
Na ₂ Cr ₂ O ₇	MMD 0,36 μm	0,516	7 x 22,5	2,03	16,0	7,9
Cr ₅ O ₁₂	MMD 0,39 μm	0,336	7 x 22,5	1,32	5,6	4,2
Cr -Verb. Mit- telwert						6
Chrom- Risikoabschät- zung Ratte ^b				0,5 Cr	10	20 (Cr)
Chrysotil	0,08 ^d	10,1	5 x 6	7,6	20,3	2,4
Krokydolith	0,30 ^d	10	5 x 6	7,5	14,2	1,65
Asbest Mit- telwert						2,0

Tab. 3.21Karzinogene Potenz in Inhalationsversuchen (Fortsetzung; Fußnoten
siehe letzte Seite der Tabelle)

Stoff	Charak-	- Exposition			% Ratten	% Tu. pro
	sierung	mg/m³	d x h/Wo.	mg/m ³ normiert ^a	Lu.tum.	miert
Ruß Printex 90	0,014 ^e	7-12	5 x 18	22	39,0	1,8
Puß Printey 00	0,014 ^e	6	5 x 17 (10 Mon.)	12,75	16,7	1,3
Tuis Fintex 50	MMAD 1,1	6	5 x 17 (20 Mon.)	12,75	9,7	0,8
Ruß Elftex-12	< 0,05 ^e	6,6	5 x 16	13,2	15,2	1,0
Nano-Ruß Mittelwert						1,2
TiO ₂ P 25	0,021 ^e	7-15	5 x 18	22	32,0	1,4
Dieselmotor-	MMAD	3,5	5 x 7	3,06	3,6	0,88
emissionen	~ 0,25	7,1	5 x 7	6,21	12,8	1,9
Dieselmotor- emissionen		6,3	5 x 16	12,6	17,9	1,3
Dieselmotor-	MMAD	2,5	5 x 18	5,6	5,5	0,89
~40 % org. Stoffe	0,25, 0,015-16	7,0	5 x 18	15,75	22,0	1,37
Dieselruß Mittelwert						1,3
Risikoabschät- zung Ratte Dieselruß + ultraf. Partikel ^b				6	10	1,7
Talk	MMAD 2,7-3,2	18	5 x 6	13,5	14,0	0,96
RCF 3 (AI-Si)	0,88 ^d	29,2	5 x 6	21,9	15,7	0,63
RCF 1 (Kaolin)	0,85 ^d	29,1	5 x 6	21,8	14,6	0,59
RCF 2 (Al-Zr- Si)	0,89 ^d	28,9	5 x 6	21,7	10,7	0,41
RCF Mittel- wert						0,54
Toner	MMAD ~ 4	16,0	5 x 6	12,0	4,39 ^p	0,37 ^p

Tab. 3.21Karzinogene Potenz in Inhalationsversuchen (Fortsetzung; Fußnoten
siehe letzte Seite der Tabelle)

Stoff	Charak-		Expositio	n	% Ratten	% Tu. pro	
	sierung	mg/m ³	d x h/Wo.	mg/m ³ normiert ^a	Lu.tum.	miert	
Glasfaser MMVF 10	1,33 ^d	29,1	5 x 6	21,8	5,9	0,19	
Steinfaser MMVF 21	1,10 ^d	30	5 x 6	22,5	4,4	0,12	
RCF 4 (Kaolin after service)	1,24 ^d	30,1	5 x 6	22,6	4,2	0,11	
TiO₂ Rutil	MMAD 1,5-1,7	250	5 x 6	187,5	25,8	0,13	

 Tab. 3.21
 Karzinogene Potenz in Inhalationsversuchen (Fortsetzung)

^a Linear umgerechnet auf 5 x 8 h/Wo. Man beachte außerdem: Teilweise ist in den Originalarbeiten mit Metallverbindungen (CdCl₂, Na₂Cr₂O₇, Ni-Oxid usw.) und dementsprechend in den Primärtabellen dieses Berichts (z. B. Tab. 3.7-3.9) die Expositionskonzentration bezogen auf das Element (Cd, Cr, Ni) angegeben; für einen Vergleich der unterschiedlichen Staubarten ist hier aber die Substanzmasse (Asbest, CdCl₂, Na₂Cr₂O₇, TiO₂, Ruß usw.) zugrunde gelegt.

^b Gemäß ED10-Berechnungen von Roller et al. (2006)

Mass median aerodynamic diameter (MMAD, in µm); geom. Standardabweichung

Median des Faserdurchmessers [µm]

Mittlere Primärpartikelgröße [µm]

Tab. 3.22	Potenzberechnungen nach epidemiologischen Daten zur Karzinogenität
	von Stäuben und Rauchen (nach Roller et al., 2006)

Stoff	ED10-Epidem.ª	ED10- Epidem., ausgedrückt als Substanzmasse	Potenz [% Risiko pro mg/m³]
Asbest (0,1 mg/m ³ \rightarrow 2 - 5 F/mL, HVBG, 1994)	3 Fasern/mL	~ 0,1 mg/m ³	100
Chrom(VI)-Verbindungen (CrO ₃ /Cr = 1,9)	0,05 mg Cr/m ³	0,1 mg/m ³	100
Cadmium-Verbindungen (CdO/Cd = 1,14)	0,3 mg Cd/m ³	0,4 mg/m ³	25
Quarz	0,5 mg/m ³	0,5 mg/m ³	20
Dieselrußpartikel	~ 1 mg/m ³	~ 1 mg/m ³	10
Nickel-Verbindungen (Ni ₃ S ₂ /Ni = 1,2; NiO/Ni = 1,3)	0,8 - 5,6 mg Ni/m ³	1 - 7 mg/m ³	sulfid.: 10 oxid.: 1,4

^a Langzeit-Mittelwert (35-40 J. Arbeitsplatz) der Expositionskonzentration, der nach Analyse epidemiologischer Daten rechnerisch mit einem zusätzlichen absoluten Lebenszeitrisiko für Lungenkrebs in Höhe von 10 % assoziiert ist.

einer 35- bis 40jährigen Exposition am Arbeitsplatz (40 Stunden-Woche). Es ergeben sich Werte von 1 % pro mg/m³ bis zu 100 % pro mg/m³ (entsprechend 10 % pro 100 μ g/m³). Es ist konsequent, für diese Werte dieselben Grenzen wie bei den Inhalationsversuchen zur Einteilung in die Potenzklassen zu verwenden (s. o.).

In den Tabellen 3.3 und 3.15 sowie 3.17-3.20 sind als ergänzende Information Daten von Karzinogenitätsversuchen mit intratrachealer Instillation zusammengestellt. Dort bietet sich eine Einteilung in Potenzklassen mit dem Dosismaß "instillierte Staubmasse" an. Diese Daten sind in Tab. 3.23 zusammengefasst, wobei die Versuchsgruppen wiederum in absteigender Rangfolge nach karzinogener Potenz sortiert sind. Die Einteilung in 3 Potenzklassen erfolgte hier nach folgender Definition:

Potenzzahl = 3,	falls Potenz größer als 10 % pro mg Staubmasse
Potenzzahl = 2,	falls Potenz größer als 1 % pro mg Staubmasse,
	aber kleiner als 10 % pro mg Staubmasse
Potenzzahl = 1,	falls Potenz kleiner als 1 % pro mg Staubmasse

Die Prozentzahlen und die Worte "mg Staubmasse" sind dabei gleich wie oben bei der Definition für die Inhalationsdaten, bei "mg Staubmasse" handelt es sich aber bei den Intratrachealversuchen um die insgesamt je Tier instillierte Staubmasse, während es sich bei den Inhalationsdaten um die Massenkonzentration pro Kubikmeter Luft handelt. In Tab. 3.23 sind nur die Daten der jeweils niedrigeren Dosen der Versuche der Tabellen 3.3 und 3.15 sowie 3.17-3.20 aufgeführt und für die Zuordnung zu den Potenzklassen verwendet. Diese Daten sind in der Regel aussagestärker als die Daten der höheren Dosen. Weil die Dosis-Wirkungsbeziehung zu höheren Dosiswerten stets abflacht, sind die Risiko/Dosis-Quotienten für die hohen Dosiswerte tendenziell niedriger (Abb. 3.1; weitere Erläuterungen siehe Abschnitt 2.3.3). Ergebnisse der "Intensivhistologie" von Kolling et al. (2008; Tab. 3.20) sind für die Tabellen 3.23 - 3.25 nicht berücksichtigt.

In Tab. 3.24 ist die gesamte Information aus den Abschnitten 3.1.1 bis 3.1.4 qualitativ und (semi-)quantitativ zusammengefasst. Eine Entscheidung für ein "positives" bzw. "negatives" Test- bzw. Studienergebnis ist in Tab. 3.24 mit einfacher Plus/Minus-Symbolik angezeigt. Bei den Inhalationsversuchen ist dabei das Ergebnis von Fisher's Exact Test, getrennt nach Geschlechtern und im Vergleich mit der mitlaufenden Kontrollgruppe, verwendet, wie in Abschnitt 2.3.1 erläutert und in den Tabellen 3.1-3.2. 3.7-3.14 und 3.16 mit *-Symbolik bei den Versuchsaruppen angezeigt. Ein Pluszeichen ist in der entsprechenden Spalte von Tab. 3.24 dann eingetragen, wenn für den jeweiligen Stoff mindestens ein positiver Fisher-Test in dem beschriebenen Sinn vorliegt. Bei den epidemiologischen Studien ist bei dem jeweiligen Stoff dann ein Pluszeichen eingetragen, wenn übereinstimmend K1-Einstufungen von IARC (2007) und DFG (2009) vorlagen. In allen anderen Fällen ist ein Minuszeichen eingetragen, ohne Rücksicht darauf, ob umfangreiche epidemiologische Studien zu dem jeweiligen Stoff vorliegen oder nicht. Im Falle von "Nickel, metallisch, elementar" ist das Minuszeichen eingeklammert, weil zwar bei IARC (2007) nur eine 2B-Bewertung vorliegt, weil aber Nickelmetall [7440-02-0] in der Liste der K1-Stoffe der DFG (2009) aufgeführt ist. Fasst man die Daten der Intratracheal- und Intraperitonealstudien zusammen, dann ist festzustellen, dass mit allen in geeigneter Weise geprüften Partikeln der Tab. 3.24 ein statistisch signifikantes Ergebnis erhalten wurde. In den Fällen, in denen keine geeigneten experimentellen Daten vorlagen, wurde das entsprechende Feld in Tab. 3.24 leer gelassen.



Abb. 3.1 Illustrierung zur Methode der Berechnung des Quotienten aus prozentualer Tumorhäufigkeit und intratracheal instillierter Staubmenge. Beispielhaft sind die Daten für Quarz DQ12 und TiO₂ P25 aus der 19-Stäube-Studie dargestellt. Da die Punkte augenscheinlich auf einer eher "hyperlinearen" Kurve liegen, wird der Quotient (hier: = Steigung) mit zunehmender Dosis kleiner. "Praxisrelevante" Dosen sind niedriger als die niedrigsten experimentell verwendeten. Deshalb sind für die Berechnungen zur Ermittlung eines Potenzmaßes die jeweils niedrigen Dosisstufen verwendet (Tab. 3.23).

Tab. 3.23Karzinogene Potenz in Karzinogenitätsversuchen mit intratrachealer
Instillation (Daten von Tab. 3.3, 3.15, 3.17-3.20; Fußnote s. zweite Seite
der Tabelle)

Substanz	Instillierte Anzahl Ratten			% Tumor-	%
	Masse,	mit Lun-	unter-	häufigkeit	Tum.hfgkt.
	gesamt [mg]	gentumor	sucht		p. og
Cadmiumoxid	0,023	2	37	5,4	236,36
Cadmiumoxid	0,069	2	40	5,0	72,95
Cadmiumchlorid	0,107	3	40	7,5	69,79
Cadmiumchlorid	0,242	2	36	5,6	23,16
Quarz DQ12	5	23	35	65,7	13,14
Ruß Printex 90	7,5	31	46	67,4	8,99
Cadmiumsulfid	3,21	8	36	22,2	6,91
Cadmiumsulfid	0,81	2	39	5,1	6,30
Siliziumkarbid-Whiskers	5	9	37	24,3	4,86
Krokydolith, Südafrika	10	15	35	42,9	4,29
Nickelpulver	6,0	10	39	25,6	4,27
Nickelsubsulfid	3,87	7	47	14,9	3,85
Nickelsubsulfid	7,67	13	45	28,9	3,77
TiO ₂ P25	15	22	42	52,4	3,49
Siliziumkarbid-Whiskers	10	12	39	30,8	3,08
Nickelpulver	9,0	8	32	25,0	2,78
Aluminiumoxid C	30	36	44	81,8	2,73
Dieselruß	30	35	58	60,3	2,01
Ruß lamp black 101	30	27	45	60,0	2,00
Aluminiumsilikat P820	30	28	47	59,6	1,99
Dieselruß	15	12	47	25,5	1,70
Glasfasern 104/475	10	5	34	14,7	1,47
Lungenstaub	60	32	40	80,0	1,33
Glasfasern M-104/475	10	5	38	13,2	1,32
Nickeloxid	30	23	60	38,3	1,28
Aluminiumsilikat P820	60	34	45	75,6	1,26
Aluminiumoxid C	60	34	47	72,3	1,21
Gasflammkohle	60	31	43	72,1	1,20
Tremolit	2,5	1	38	2,6	1,05
Erionit	2,5	1	39	2,6	1,03
Fettkohle	60	27	48	56,3	0,94
Untere Fettkohle	60	26	48	54,2	0,90

Substanz	Instillierte	Anzahl	Ratten	% Tumor-	%
	Masse, gesamt [mg]	mit Lun- gentumor	unter- sucht	häufigkeit	Tum.hfgkt. pro mg ^a
Test Toner	60	13	24	54,2	0,90
Aktivkohle	30	10	37	27,0	0,90
Magerkohle	66	27	47	57,4	0,87
SiO ₂ amorph, ultrafein	15	4 ^b	31	12,9	0,86
Gestein, Kohlengrube	60	16	47	34,0	0,57
TiO ₂ (Anatas, fein)	120	28	44	63,6	0,53
Magnetit	50	9	36	25,0	0,50
TiO ₂ (Anatas, fein)	60	13	44	29,5	0,49
Gestein, Kohlengrube	120	26	45	57,8	0,48
Hämatit	150	18	34	52,9	0,35
Silizumkarbid	60	4	36	11,1	0,19
SiO ₂ amorph, ultrafein	30	2 ^c	35	5,7	0,19
ZrO ₂	60	4	47	8,5	0,14
TiO ₂ (Anatas)	45	2	39	5,1	0,11
TiO ₂ (Rutil)	60	1	39	2,6	0,04

 Tab. 3.23
 Karzinogene Potenz in Karzinogenitätsversuchen mit intratrachealer Instillation, Fortsetzung

^a Weil die Dosis-Wirkungsbeziehung zu höheren Dosiswerten stets abflacht, sind die Risiko/Dosis-Quotienten für die höheren Dosiswerte tendenziell niedriger; aussagestärker sind in der Regel die Werte des Risiko/Dosis-Quotienten, die bei den niedrigeren Dosen berechnet wurden (Abb. 3.1). Deshalb sind hier nur die Daten der jeweils niedrigeren Dosen aufgeführt und für die Zuordnung zu den Potenzklassen verwendet. Weitere Erläuterungen siehe Abschnitt 2.3.3.

^b Daten der Studie von Kolling et al. (2008) mit "normaler Schnittzahl = Routinehistologie" (s. Tab. 3.20). Gemäß "Intensivhistologie" wurden in der Studie 9 Tumortiere festgestellt.

^c Daten der 19-Stäube-Studie mit "normaler Schnittzahl = Routinehistologie" (s. Tab. 3.20). Das geprüfte amorphe SiO₂ ist nicht als GBS zu betrachten, die Bio-Beständigkeit ist geringer als bei TiO₂ und es hat sich signifikante spezifische Toxizität gezeigt. Für eine aktuelle Bewertung der karzinogenen Potenz erscheint der Versuch von Kolling et al. (2008, s. Fußnote b) besser geeignet. Die Gesamtdosis war bei Kolling et al. (2008) niedriger, dennoch war die Tumorhäufigkeit (mit normaler Schnittzahl) höher. Dies dürfte damit zusammenhängen, dass die Gesamtdosis auf eine größere Zahl von Einzelinstillationen (30 versus 10) verteilt war. Vermutlich war dadurch im Zusammenhang mit der Löslichkeit die wirksame Langzeit-Dosis höher. Falls diese Annahme zutrifft, dann wäre nach Inhalation (mit einer "zeitlich noch gleichmäßiger verteilten Gesamtdosis") mit einer eher höheren Wirkungsstärke zu rechnen. Dies sollte dringend mittels Inhalationsversuch überprüft werden.

Stoff	Effektnachweis, qualitativ			Potenzkl., bez. auf Masse (Exposition bzw. instill.)			
	Epi-	Ra	itten	Epi-	Ratte	en	
	demio- logie ^a	Inhala- tion ^b	sonst (i.tr./i.p.)	demio- logie ^c	Inhalation ^c	i.tr. ^d	
Cadmium (Verb.)	+	+	+	3	3	3	
Arsen (GaAs)	+	+			3		
Nickel, sulfidisch	+	+	+	2-3	3	2	
Ni, metall., element.	(-)		+		f	2	
Quarz	+	+	+	3	3	3	
Cobalt (sulfat)	-	+			3		
Vanadiumpentoxid	-	_e			3		
Nickeloxid	+	-	+	2	2	2	
Nickelsulfat	+	-	+	2-3	2		
Chrom(VI)-Verb.	+	+	+	3	2		
Amphibolasbest	+	+	+	3	2	2	
Chrysotilasbest	+	+	+	3	2		
Erionit	+	+	+			2	
SiC-Fasern, dünn	-	+	+			2	
Glasfasern, dünn	-	+	+			2	
Industrieruß UF	-	+	+		2	2	
Al-oxid UF	-		+			2	
TiO₂ UF	-	+	+		2	2	
Dieselmotor-Emiss.	-	+	+	2-3	2	2	
Keramikf., glasig	-	+	+		1		
SiO ₂ amorph UF	-		+			1	
Glaswolle	-	-	+		1		
Steinwolle	-	-	+		1		
Schlackenwolle	-	-	+		1		
Toner	-	-	+		1	1	
Kohlenstaub	-	-	+		1	1	
Kaolin	-		+			1	
Eisenoxid	-		+			1	
Ni, metall., legiert	-		+		f	f	
TiO ₂ F	-	+	+		1	1	

Tab. 3.24In vivo-Informationen zur Karzinogenität von Stäuben und Rauchen
(siehe Tabellen 3.21-3.23; Fußnoten auf der nächsten Seite)

Fußnoten zu Tab. 3.24

- ^a Die Plus- und Minussymbole beziehen sich auf den "<u>Nachweis</u>" eines Expositionseinflusses: Aus einem Minuszeichen darf nicht die Schlussfolgerung gezogen werden, die Substanz habe beim Menschen kein karzinogenes Potential, es bedeutet lediglich, dass bisher die mit den gegebenen Expositionshöhen und Stichprobengrößen erhaltenen Studienergebnisse nicht als "Nachweis" eines Kausalzusammenhangs zwischen Exposition und erhöhtem Krebsrisiko eingestuft wurden. In der Regel ist hier die Bewertung der IARC verwendet (+ = sufficient evidence in humans; - = limited evidence oder weniger).
- ^b Kriterium: Versuch und Versuchsgruppe mit deutlichstem Effekt, statistische Signifikanz gegenüber mitlaufender Kontrolle (Fisher's Exact Test, einseitig, p < 0,05)
- ^c Für die Ermittlung der Potenzklasse wurde die über den Hintergrund hinausgehende prozentuale Tumorhäufigkeit (Risiko) auf den Langzeit-Mittelwert (40 h/Wo.) der Expositionskonzentration (Substanzmasse) bezogen; Einteilung der Klassen: 3 falls Risiko > 10 % pro mg/m³, 2 falls Risiko > 1 % pro mg/m³ und < 10 % pro mg/m³, 1 falls Risiko < 1 % pro mg/m³.
- ^d Für die Ermittlung der Potenzklasse wurde die über den Hintergrund hinausgehende prozentuale Tumorhäufigkeit (Risiko) auf die insgesamt pro Tier instillierte Substanzmasse bezogen; Einteilung der Klassen: 3 falls Risiko > 10 % pro mg, 2 falls Risiko > 1 % pro mg und < 10 % pro mg, 1 falls Risiko < 1 % pro mg.</p>
- e Aber: Von NTP (2002) im Vergleich mit historischen Kontrollen als positiv bewertet, außerdem eindeutig positiv im Inhalationsversuch mit Mäusen
- f Für elementares Nickel liegen keine veröffentlichten Daten über einen Inhalationsversuch vor; im Instillationstest und im Intraperitonealtest hat sich elementares Nickel als ähnlich stark wirksam wie Nickelsubsulfid gezeigt. Nickellegierungen mit weniger als 50 % Nickelgehalt waren nach intraperitonealer und intramuskulärer Applikation nur sehr schwach oder gar nicht wirksam (mittels Inhalation oder Instillation bei Ratten nicht geprüft).

Die vielleicht auffälligste Information von Tab. 3.24 ist, dass die Zahl der positiven Ergebnisse von der Epidemiologie über die Inhalationsversuche zu den "sonstigen" Versuchen zunimmt und dass gemäß den "sonstigen" Versuchen alle Substanzen "positiv" sind. Diese Datenlage scheint sich auf verschiedene Weise interpretieren zu lassen. Die scheinbar einfachste, vordergründig nächstliegende Erklärung - die wir *nicht* für zutreffend halten - ist die, dass Tierversuche an Ratten zu empfindlich sind, um das Krebsrisiko des Menschen zuverlässig bestimmen zu können. Diese "Erklärung" setzt voraus, dass die "negativen" Ergebnisse der epidemiologischen Studien darauf beruhen, dass die betreffenden Stoffe tatsächlich kein karzinogenes Potential beim Menschen besitzen, dass diese epidemiologischen Daten also "korrekt negativ" die Abwesenheit eines Krebsrisikos beim Menschen anzeigen. Diese Information ist aber tatsächlich in den epidemiologischen Daten nicht enthalten. Vielmehr kann das Ergebnis einer epidemiologischen Studie auch dann "negativ" sein, wenn ein expositionsbedingtes Krebsrisiko zwar vorhanden ist, wenn aber gleichzeitig die methodischen Voraussetzungen (Stichprobenumfang, Beobachtungsdauer, Expositionsdauer, Expositionshöhe) nicht ausreichen, um die (tatsächlich vorhandene) Risikoerhöhung auf ein ausreichend so hohes Maß zu bringen, dass es statistisch/wissenschaftlich als auffällig und "sicherlich nicht zufällig" erkennbar ist. Wie jede andere empirische Methode haben auch epidemiologische Studien ein "Auflösungsvermögen" bzw. eine "Nachweisgrenze". Dies ist detailliert in Kapitel 4 sowie den Abschnitten 5.2 bis 5.4 beschrieben (s. auch Woitowitz et al., 1996; Melnick, 2005). Das entsprechende wissenschaftliche Gesetz lässt sich abstrakt und einfach folgendermaßen formulieren: Das Fehlen des Nachweises eines Effekts ist nicht gleichbedeutend mit dem Nachweis des Fehlens eines Effekts.

Gerade bei Lungenkrebs ist die klare Zuordnung eines erhöhten Risikos zu einem einzelnen bestimmten Einfluss in der Umwelt oder am Arbeitsplatz besonders schwierig. Eindeutig erhöhte Lungenkrebsrisiken in epidemiologischen Studien an Arbeitsplätzen zeigen immer ein absolutes expositionsbedingtes Risiko an, das im Bereich von mehreren Prozent, in der Regel sogar zweistellig, und damit oberhalb tolerabler Risikohöhen liegt. Eine genauere Analyse der epidemiologischen Studien, die den entsprechenden "negativen" Ergebnisse der Tab. 3.24 zugrunde liegen, zeigt, dass aus diesen Studien tatsächlich kein Anhalt für ein geringeres karzinogenes Potential der Stäube beim Menschen im Vergleich zur Ratte abgeleitet werden kann. Vielmehr ist aufgrund der abzuschätzenden kumulativen Exposition der Vergangenheit dort gar nicht mit einem klaren Risikonachweis zu rechnen, auch dann, wenn das expositionsbedingte Risiko in einem nicht tolerablen Bereich gelegen hat. Es würde im Rahmen des vorliegenden Projektes zu weit führen, dies für die einzelnen Stoffe auszuführen, diesbezüglich ist auf frühere Arbeiten zu verweisen (Wardenbach et al., 2005; Roller et al., 2006; Roller, 2007, 2008, 2009).

Aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge ist für die Ergebnisse der Tab. 3.24 folgende Interpretation plausibel: Die Nachweismöglichkeiten jeder empirischen Methode sind beschränkt durch so etwas wie Auflösungsvermögen und Nachweisgrenzen (mathematisch-philosophische Betrachtungen zum Wesen eines statistischen "Nachweises" siehe Kapitel 4). Wegen der methodischen Grenzen epidemiologischer Studien über den Zusammenhang von Lungenkrebs-Erkrankungen und chemischen Einwirkungen in der Umwelt oder am Arbeitsplatz konnte bisher in solchen Studien das Bestehen eines ursächlichen Zusammenhangs nur für Stäube oder Rauche mit einer besonders hohen Wirkungsstärke hinreichend wahrscheinlich gemacht ("nachgewiesen") werden. In Tierversuchen können kontrolliert höhere Expositionen des zu untersuchenden Stoffes eingesetzt werden und viele andere Einflüsse (Zigarettenrauch, Alkoholkonsum, Ko-Expositionen gegenüber anderen chemischen Stoffen, Ernährung etc.) können besser als in epidemiologischen Studien ausgeschlossen werden. Deshalb wurden in Inhalationsversuchen an Ratten auch für Stäube oder Rauche Lungenkrebs erzeugende Wirkungen deutlich gemacht, die in epidemiologischen Studien nicht erkannt wurden. Es ist aber unwahrscheinlich, dass dies in einer höheren "Empfindlichkeit" der Spezies "Ratte" bedingt ist. Dagegen spricht nämlich, dass bei den meisten Stoffen guantitativ ein höheres expositionsbezogenes Risiko aus den epidemiologischen Daten folgt als aus den Versuchen mit Ratten, soweit die Datenqualität für quantitative Vergleiche ausreicht (Tab. 3.24; siehe auch Roller et al., 2006). Besonders auffällig und gut dokumentiert ist ein höheres expositionsbezogenes Risiko beim Menschen im Vergleich zur Ratte bei Asbest und Chrom(VI)-Verbindungen. Wegen der tendenziell eher geringen Empfindlichkeit der Rattenlunge gegenüber Partikelkarzinogenität ist auch die Nachweisgrenze von Inhalationsversuchen an Ratten noch relativ hoch. Die Empfindlichkeit des Prüfmodells lässt sich jedoch steigern, indem anstatt der inhalativen Exposition eine direktere Applikation an Zielgewebe gewählt wird. Mit einem solchen Ansatz wurde für faserförmige Stäube ein breites Spektrum an unterschiedlichen Wirkungsstärken an der Serosa nach intraperitonealer Injektion differenziert. Mit intratrachealer Instillation wurde die Empfindlichkeit des Tiermodells erhöht, indem die Beladung der Lunge. die sich im Inhalationsversuch über lange Zeit erst aufbauen muss, bereits in relativ jungem Alter der Tiere erfolgte, so das ein längerer Zeitraum zur Tumorinduktion zur Verfügung stand.

Tab. 3.25In vivo-Referenzinformation zur Karzinogenität von Stäuben und Rau-
chen (siehe Text sowie Tab. 3.24; Reihenfolge der Stoffe innerhalb der
Blöcke alphabetisch)

Stoff	Effektnachwo	eis, qualitativ	Potenz-	AGS/DFG ^a -
	Inhalation, Ratte	gesamt	gen auf Mas- se	Bewertung
Amphibolasbest	+	+	3	1/1
Arsen	+	+	3	1/1
Cadmium (Verbindungen)	+	+	3	2/1
Chrom(VI)-Verbindungen	+	+	3	1 ^b , 2/1 ^b
Chrysotilasbest	+	+	3	1/1
Erionit	+	+	3	1/1
Glasfasern, dünn	+	+	3	2/2
Cobalt (sulfat)	+	+	3	2/2
Ni, metallisch, elementar		+	3	3/1
Nickel, sulfidisch	+	+	3	1/1
Quarz	+	+	3	1°/1
SiC-Fasern	+	+	3	2/2
Vanadiumpentoxid	-	+	3	-/2
Al-oxid, ultrafein (Nano)		+	2	-/-
Dieselmotor-Emissionen	+	+	2	2 ^c /2
Glaswolle (rel. beständig)	-	+	2	2/2
Industrieruß, ultrafein (Nano)	+	+	2	-/3B
Keramikfasern, glasig	+	+	2	2/2
Nickel, oxidisch	-	+	2	1/1
Nickelsulfat	-	+	2	1/1
Schlackenwolle (rel. best.)	-	+	2	2/3
Steinwolle (rel. beständig)	-	+	2	2/2
TiO ₂ , ultrafein (Nano)	+	+	2	-/- ^d
Eisenoxid, fein		+	1	-/-
Kaolin, fein		+	1	-/-
Kohlen(gruben)staub	-	+	1	-/3B
Ni, metallisch, legiert, fein		+	1	? ^e
SiO ₂ , amorph, ultraf. (Nano)		+	1	-/-
TiO ₂ , fein	+	+	1	-/3A
Toner, fein	-	+	1	-/-

Fußnoten zu Tab. 3.25

- ^a Einordnung in Karzinogenitätskategorien gemäß der CMR-Gesamtliste des AGS und der DFG (2009). Die Spalte "AGS/DFG-Bewertung" in dieser Tabelle dient der Verdeutlichung des Umstandes, dass sich für Stoffe mit gemäß der Methode dieser Arbeit höherer karzinogener Potenz tendenziell "strengere" Einstufungen in die Karzinogenitätskategorien gemäß EU- bzw. DFG-Kriterien finden. Sie dient nicht der rechtlichen Information über Stoffeinstufungen. Bei den Einstufungen sind gegebenenfalls Details zu beachten, z. B. unterschiedliche Einstufungen für verschiedene Verbindungen eines bestimmten Metalls oder ergänzende Zusätze wie "Faserstaub" oder "einatembare Fraktion". Zur Information über die rechtlich relevante Einstufung ist die Originalinformation einschließlich aller Ergänzungen und Fußnoten zu beachten.
- ^b Bei AGS/EU: Chromtrioxid, Zinkchromate Kategorie 1; bei DFG: Chrom(VI)-Verbindungen (einatembare Fraktion; außer Bleichromat und Bariumchromat) Kategorie 1
- ^c Beim AGS sind Quarz und Dieselmotoremissionen nicht als Stoffe in eine Karzinogenitätskategorie eingestuft, sondern Tätigkeiten oder Verfahren, bei denen Beschäftigte in bestimmten Bereichen arbeiten, werden vom AGS als krebserzeugend Kategorie 1 oder 2 bezeichnet.
- ^d Bei DFG (2009) ist Titandioxid [13463-67-7] (einatembare Fraktion), ausgenommen ultrafeine Partikel, in der Karzinogenitäts-Kategorie 3A aufgelistet.
- In dieser Zeile sind (nicht-ultrafeine) Partikel aus nickelhaltigen Legierungen gemeint, die nur eine äußerst geringe Bioverfügbarkeit von Nickel aufweisen und auch in empfindlichen In-vivo-Tests keine signifikante nickelspezifische Karzinogenität zeigen, wie z. B. die bei Pott et al. (1991b) intraperitoneal geprüfte Nickellegierung "29" und die bei Sunderman (1984) intramuskulär geprüfte Ni-Fe-Legierung (NiFe_{1.6}). Mir ist unklar, inwiefern sich die EU- bzw. DFG-Einstufungen von metallischem Nickel auf solche Legierungen beziehen.

Die Steigerung der Empfindlichkeit betrug auf diese Wiese ungefähr einen Faktor von 5 (Roller und Pott, 2006). Insgesamt sprechen die Daten der Tab. 3.24 deshalb dafür, dass für alle diese Stäube und Rauche auch beim Menschen ein karzinogenes Potential für die Lunge (bei Fasern auch für die Serosa) vorhanden ist. Die karzinogene Wirkungsstärke der Stoffe dürfte sich aber - bezogen auf die langfristig einwirkende Massenkonzentration pro Kubikmeter Luft - um mehr als 3 Größenordnungen unterscheiden.

Als Referenzinformation für In-vitro-Daten bieten sich daher drei Arten von Information an: 1.) Qualitativer, formaler Nachweis in Inhalationsversuchen an Ratten; 2.) Vorhandensein eines Effektnachweises in mindestens einem der verfügbaren empirischen Untersuchungssysteme (einschließlich Epidemiologie und Versuche an Ratten mit direkter Applikation); 3.) Potenzzahl, gebildet aus der Gesamtheit aller verfügbaren Information.

Die ersten beiden dieser drei Möglichkeiten müssen nun nicht weiter kommentiert werden; die qualitativen, formalen Nachweise in Inhalationsversuchen ergeben sich aus Tab. 3.24; für alle aufgeführten Stoffe - außer Vanadiumpentoxid - liegt ein formal positives Ergebnis bei Menschen oder Ratten in mindestens einem Untersuchungssystem vor; Vanadiumpentoxid ist aus den weiter oben beschriebenen Gründen ebenfalls als "positiv" zu betrachten. Eine Vereinheitlichung der Einteilung in die drei Potenzklassen ist allerdings noch näher zu erläutern. Zunächst ist davon auszugehen, dass epidemiologische Information die oberste Priorität besitzt. Insgesamt scheint hinsichtlich der Einteilung in die Potenzklassen die Diskrepanz zwischen den epidemiologischen Daten und den experimentellen Daten von Ratten nicht groß zu sein.

Tab. 3.26 Quellenangaben zu den in Tab. 3.24 und 3.25 zusammengefassten tierexperimentellen Referenzinformation zur Karzinogenität von Stäuben und Rauchen. Die Daten sind in den Tabellen 3.1-3.4, 3.7-3.15 und 3.16-3.20 ausführlich referiert; die umfangreichen epidemiologischen Studien sind bei Roller et al. (2006) ausführlich dargestellt.

Stoff	Quellen der als Re Tierversuche ^a	eferenzinformatio	n benutzten
	Inhalation	Instillation	intrap. Inj.
Chrysotilasbest	Davis und Jones (1988), Mast et al. (1995a)	./.	Pott et al. (1976, 1984, 1987, 1989, 1990.
Amphibolasbest	Davis et al. (1986,	Pott et al. (1987,	al. (1996, 1997)
Glasfasern, dünn	et al. (1994), Cul-	1991a)	
SiC-Fasern	len et al. (2000)		
Erionit	Wagner et al. (1985)		
Keramikfasern, glasig	Mast et al. (1995a,b)	./.	
Glaswolle (rel. beständig)	Hesterberg et al.	./.	
Schlackenwolle (rel. best.)	(1993)	./.	
Steinwolle (rel. beständig)	McConnell et al. (1994)	Pott et al. (1987, 1991a)	
Arsen (GaAs)	NTP (2000)	./.	./.
Cadmium (Verbindungen)	Glaser et al. (1990), Takenaka et al. (1983)	Pott et al. (1987)	./.
Chrom(VI)-Verbindungen	Glaser et al. (1986)	./.	./.
Quarz	Muhle et al. (1991), Bellmann et al. (1991)	Pott und Roller (2005), Roller (2008), Kolling et al. (2008)	Pott et al. (1984)
Vanadiumpentoxid	NTP (2002)	./.	./.
Cobalt (sulfat)	NTP (1998)	./.	./.
Nickel(sub)sulfid	NTP (1996b)	Pott et al. (1987)	[Pott et al.
Ni, metallisch, elementar	./.		(1991b)]*
Ni, metallisch, legiert, fein	./.	./.	
Nickeloxid	NTP (1996a)	Pott et al. (1987, 1994), Pott und Roller (1994)	
Nickelsulfat	NTP (1996c)	./.	

Tab. 3.26Quellenangaben zu den in Tab. 3.24 und 3.25 zusammengefassten tier-
experimentellen Referenzinformation zur Karzinogenität von Stäuben
und Rauchen, Fortsetzung

Stoff	Quellen der als Re Tierversuche ^a	eferenzinformatio	n benutzten
	Inhalation	Instillation	intrap. Inj.
Aluminiumoxid, ultrafein (Nano)	./.	Pott und Roller (2005), Roller (2008)	./.
Dieselmotor-Emissionen	Mauderly et al. (1987), Cheng et al. (1984), Wolff et al. (1987), Nikula (2000), Nikula et al. (1995), Iwai et al. (2000), Hein- rich et al. (1995)	Kawabata et al. (1986), Pott et al. (1994), Pott und Roller (1994, 2005), Da- senbrock et al. (1996), Roller (2008)	Pott et al. (1991a)
Industrieruß, ultrafein (Na- no)	Nikula et al. (1995), Heinrich et al. (1994, 1995)	Pott et al. (1994); Pott und Roller (1994, 2005), Dasenbrock et al. (1996), Roller (2008), Kolling et al. (2008)	./.
TiO ₂ , ultrafein (Nano)	Heinrich et al. (1995)	Pott und Roller (2005); Roller (2008)	./.
Eisenoxid, fein	./.	Pott et al. (1987, 1994); Pott und Roller (1994)	Pott et al. (1976, 1987, 1989, 1991a)
Kaolin, fein	./.	Pott und Roller (2005); Roller (2008)	./.
Kohlen(gruben)staub	Martin et al. (1977)	Pott und Roller (2005); Roller (2008), Kolling et al. (2008)	./.
SiO ₂ , amorph, ultrafein (Nano)	./.	Pott und Roller (2005); Roller (2008), Kolling et al. (2008)	./.
TiO ₂ , fein	Lee et al. (1985, 1986), Muhle et al. (1991), Bell- mann et al. (1991)	Pott et al., 1994; Pott und Roller (1994, 2005); Roller (2008)	Pott et al. (1984, 1987, 1989, 1991a)
Toner, fein	Muhle et al. (1991); Bellmann et al. (1991	Pott und Roller (2005); Roller (2008)	./.

Übereinstimmend ergibt sich für Cadmium, Nickelsulfid und Quarz eine Einordnung in die oberste Potenzklasse, Nickeloxid und Dieselmotoremissionen sind eher in der mittleren Potenzklasse anzusiedeln, für keinen der gemäß Inhalationsversuchen in der untersten Potenzklasse eingeordneten Stoffe liegen aussagekräftige epidemiologische Daten vor. Eine erhebliche Abweichung in der Einordnung ergibt sich allerdings für Asbest und für Chrom(VI)-Verbindungen. Im Falle der Chrom(VI)-Verbindungen erscheint dies nicht weiter schwierig, weil hier entsprechend der Priorität der Epidemiologie einfach die experimentellen Daten in den Hintergrund zu treten haben.

Im Falle des Asbests sind aber weitergehende Überlegungen hinsichtlich der anderen faserförmigen Stäube erforderlich. Gemäß den Ergebnissen bei Wardenbach et al. (2005) ist der Unterschied im expositionsbezogenen Krebsrisiko nach Inhalation bei Mensch und Ratte so groß, dass für die Beurteilung der karzinogenen Potenz von faserförmigen Stäuben auch dann nicht einfach die Informationen aus Versuchen an Rattenlungen herangezogen werden sollten, wenn keine aussagekräftigen epidemiologischen Daten vorliegen. Es ist daher wissenschaftlich nicht plausibel, dass zwar die Asbeste in Abweichung von den Ergebnissen nach Inhalation und nach intratrachealer Instillation bei Ratten in der obersten Potenzklasse einzuordnen sind, die Stäube aus dünnen (relativ beständigen) künstlichen Mineralfasern jedoch nicht. Bezogen auf die Staubmasse waren Stäube aus dünnen Glasfasern und SiC-Fasern nach intratrachealer Instillation genauso stark wirksam wie Asbest (Krokvdolithasbest und SiC-Fasern Potenz 4-5, Tremolitasbest und Glasfasern 104/475 Potenz 1-1,5; Tab. 3.3), Asbest ist nach epidemiologischer Information in der obersten Potenzklasse einzuordnen, die Stäube aus dünnen Glasfasern und SiC-Fasern sollten daher folgerichtig ebenfalls in Klasse 3 eingeordnet werden. Stäube aus Aluminiumsilikatwollen (glasige Keramikfasern) und anderen Mineralwollen weisen im Mittel höhere Faserdurchmesser auf als Asbest und enthalten folglich auch weniger Fasern pro Masseneinheit als Asbest und als Stäube aus dünnen künstlichen Mineralfasern. Bezogen auf die Staubmasse ist ihre karzinogene Potenz daher niedriger als diejenige von Asbest einzuschätzen; weil die Stäube aber in der Fasergestalt ein besonderes karzinogenes Prinzip im Unterschied zu GBS enthalten, ist es nicht plausibel, diese Stäube in derselben Potenzklasse wie GBS einzuordnen. Sie werden daher hier der Potenzklasse 2 zugeteilt. Das besondere karzinogene Potential der Stäube aus Aluminiumsilikatwollen (glasige Keramikfasern) und anderen (relativ biobeständigen) Mineralwollen hat sich nach intraperitonealer Injektion eindeutig gezeigt, die Stäube waren dabei deutlich stärker wirksam als granuläre Stäube und als Stäube aus relativ wenig bio-beständigen Mineralwollen (Tabelle 3.4-3.6; siehe auch Bild 8b bei Pott et al., 1995).

Tab. 3.25 zeigt zusammengefasst die Referenzinformation, die sich aus den oben beschriebenen Daten und Überlegungen ergibt. In Tab. 3.26 sind nochmals die Quellenangaben zu den Tierversuchen, d. h. zu den Daten von Tab. 3.24, zusammengefasst. In Tab. 3.25 mit aufgenommen sind die Bewertungen bei DFG (2009) sowie gemäß der CMR-Gesamtliste (BAuA, 2009), welche die Einstufungen nach Anhang VI Teil 3 der Verordnung (EG) Nr. 1272/20081 sowie TRGS 905 und TRGS 906 enthält. Dabei stellt eine Einstufung in Kategorie 1 (krebserzeugend beim Menschen) die "strengste" Bewertung dar. Die Tabelle zeigt, dass sich für Stoffe mit - gemäß der Methode dieser Arbeit - höherer karzinogener Potenz tendenziell "strengere" Einstufungen in die Karzinogenitätskategorien gemäß EU- bzw. DFG-Kriterien finden.

3.2 In-vitro-Versuche zur Gentoxizität/Zytotoxizität

3.2.1 Faserförmige Stäube

3.2.1.1 <u>Ergebnisse von In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität von faserförmigen</u> <u>Stäuben</u>

Die Zahl der Publikationen über In-vitro-Versuche zu Fragen der Gentoxizität bzw. zelltransformierenden Wirkung von faserförmigen Stäuben ist sehr groß. Bei den Recherchen zeigte sich, dass es nicht möglich und auch nicht sinnvoll ist, diese Publikationen vollständig so auszuwerten, dass etwa die Messdaten umfassend in Tabellen präsentiert und statistisch rechnerisch analysiert würden. Denn bei einem Teil der Studien wurden nur Asbeste untersucht; aus diesen Studien kann nur geschlossen werden, dass In-vitro-Studien grundsätzlich in der Lage sind, Signale zu produzieren, die als Hinweis auf In-vivo-Gentoxizität bzw. auf die bekannte Karzinogenität von Asbest aufgefasst werden können (Renier et al., 1992; Lu et al., 1994; Dopp et al., 1995, 2005; Trosic et al., 1997; Lohani et al., 2002; Xu et al., 2007). Vergleichende Aussagen zur Wirkungsstärke lassen sich aus den Studien mit zum Teil sehr unterschiedlichem Design kaum entnehmen. Die Daten solcher Studien sind daher hier nicht tabellarisch im Detail aufgeführt. Die Studien haben jedenfalls gezeigt, dass mit Asbeststäuben reproduzierbar positive Befunde in verschiedenen In-vitro-Modellen erhalten wurden. Künstliche Mineralfasern wurden in diesen Studien nicht untersucht. Dagegen wurde angestrebt, die Daten neuerer Studien, in denen mehrere verschiedene Faserstäube vergleichend geprüft wurden, möglichst detailliert wiederzugeben. Ein generelles Problem für den In-vivo/in-vitro-Vergleich ist es aber, "vergleichbare" Stoffproben zu definieren. Sofern z. B. Publikationen darüber berichten, dass "asbestos" in vitro geprüft wurde, ist es unklar, zu welchen In-vivo-Studien genau dies in Beziehung zu setzen ist. Für alle Tabellen, in denen hier über In-vitro-Ergebnisse berichtet wird und die eine Spalte "Referenz" enthalten gilt daher Folgendes: Die Angaben zur "Referenz" beziehen sich nicht in allen Fällen auf exakt dieselben Substanzproben, die in vitro untersucht wurden, sondern es wurde auch Referenzinformation von Staubarten verwendet, die nach aller verfügbaren wissenschaftlichen Evidenz als gleichartig zu betrachten sind (Potenzzahlen gemäß Tab. 3.25). Die Entscheidung, was als "gleichartig" zu betrachten ist, muss zwangsläufig subjektive Elemente enthalten. Stäube sind keine eindeutig definierbaren Stoffe wie organische Verbindungen, die sich allein durch ihre Strukturformel eindeutig definieren lassen. Es ist praktisch unmöglich, "objektive" Substanzidentität zu Stäuben bei Studien verschiedener Autoren anzugeben. Die Problematik wird in diesem Bericht an verschiedenen Stellen erläutert (Abschnitt 2.1, 3.2.2, 3.2.3.1 und 3.2.3.3, Tab. 3.93).

Zu allen Publikationen über In-vitro-Studien ist zu bemerken, dass sehr häufig die Auswertung, insbesondere eine quantitative Auswertung, dadurch erschwert ist, dass die Versuchsergebnisse nur in Form von Grafiken präsentiert sind. Dies mag zwar dem eiligen Leser der Originalarbeit einen raschen Eindruck vermitteln, führt aber dazu, dass für eine schriftliche Wiedergabe und für weitergehende Analysen Zahlenwerte mit entsprechenden Ungenauigkeiten aus den Grafiken abgegriffen werden müssen. Hier wäre es wünschenswert, dass Ergebnisse von In-vitro-Versuchen häufiger tabellarisch mit Zahlenwerten und Streuungsmaßen berichtet würden.



 Abb. 3.2 Dosis-Wirkungsbeziehungen in den Zelltransformationsversuchen von Hesterberg und Barrett (1984); Abkürzungen: L = mittlere Faserlänge, D = mittlere Faserdicke, Zahlenangaben bezogen auf die Einheit μm.

Zu den aussagekräftigsten In-vitro-Versuchen über die biologischen Wirkungen von faserförmigen Stäuben gehören sicherlich die umfangreichen Versuchsreihen der Arbeitsgruppe von Barrett (Tab. 3.27). Die Versuche stammen aus einer Zeit, als extensive Charakterisierungen der physikalisch/chemischen Eigenschaften von Staubproben nicht selbstverständlich waren. Dementsprechend enthält die Arbeit auch keine Angaben zu den Faserzahlen je mg Staub bzw. je Probe; dies sollte jedoch nicht zur Abwertung der Aussagekraft der ansonsten gut beschriebenen Versuche verwendet werden. Anhand der vorhandenen Angaben zu Faserabmessungen sind fundierte Interpretationen möglich. Abb. 3.2 illustriert wesentliche Aspekte der Versuchsreihen. Der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet sind die Daten zu Chrysotil; in Tab. 3.27 ist aber aufgeführt, dass die Wirkungsstärke der Chrysotilprobe nicht schwächer, sondern eher größer war als diejenige der Krokydolithprobe. Abb. 3.2 zeigt, dass auch die künstlichen Mineralfasern, deren mittlerer Durchmesser bei etwas mehr als 100 nm lag, massebezogen eine größere Wirkungsstärke als Krokydolith entfalteten. Nach dem Mahlen der Probe - und damit Reduktion der mittleren Faserlänge - waren die Glasfasern deutlich weniger wirksam. Eine andere Probe mit wesentlich dickeren Glasfasern, nahe bei 1 µm, war auch ohne entsprechendes Mahlen relativ schwach wirksam. Dies stimmt sehr gut mit Ergebnissen aus Karzinogenitätsversuchen überein, wonach längere Fasern eine höhere Wirkungsstärke haben als kürzere (siehe auch Tab. 3.4-3.6). Massebezogen sind auch in vivo Proben dickerer Fasern weniger wirksam als Proben dünnerer Fasern. Hesterberg und Barrett (1984) weisen in ihrer Diskussion korrekt darauf hin, dass daraus nicht notwendigerweise zu schließen ist, dass eine dickere Faser eine geringere Potenz hat als eine dünnere Faser: Denn Proben dickerer Fasern enthalten pro Masseeinheit weniger Fasern als Proben ansonsten ähnlicher dünnerer Fasern.

Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuche (Zelltransformation; Hesterberg und Barrett, 1984; Abkürzungen siehe S. 4) Tab. 3.27

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Ref	erenz ^a
	Masse	F-zahl		"Messwert"	+/-	+/-	Potenz
Testmodell; Prüfsysten	n; Messgröße/	Beobachtung	g; Autor(en)				
Transformationstest; <i>Syr.</i> <i>quency was calculated by</i> Hesterberg und Barrett (1	ian hamster em / dividing the tot 984)	bryo cells (SH al number of ,	IE; Tertiärkultur); transformed colo	morphologische nies by the total r	Zelltransform number of colo	lation (<i>trans</i> onies survivi	formation fre- ng treatment);
Chrysotil, UICC	0,25 µg/cm ²		80 % S.	0,5 % T.			
	0,5 µg/cm ²		60 % S.	1,5 % T.			
	1 µg/cm ²		40 % S.	3 % T.	+	+ HNI	ო
	2 µg/cm ²		30 % S.	6 % T.		+ <u>1</u>	
	DWB		+	3 % Т. pro µg/cm ²			
Krokydolith, UICC	0,25 µg/cm ²		95 % S.	ذ			
	0,5 µg/cm ²		80 % S.	0,8 % T.			
	1 µg/cm ²		70 % S.	2 % T.	+	+ HNI	ო
	2 µg/cm ²		40 % S.	4 % T.		+ <u>1</u>	
	DWB		+	2 % Т. pro µg/cm ²			

serförmige Stäube: In-vitro-Versuche zur Zelltransformation (Fortsetzung)	
Tab. 3.27 F ₆	

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Ref	erenz ^a
	Masse	F-zahl		"Messwert"	+/-	+/-	Potenz
Fortsetzung Hesterberg u	und Barrett (198	4)					
Chrysotil, UICC, 2. Ex-	0,1 µg/cm ²		95 % S.				
periment	0,25 µg/cm ²		80 % S.	0,4 % T.			
	0,5 µg/cm ²		40 % S.	1,5 % T.	+	+ HNI	ო
	1 µg/cm ²		8 % S.	3 % T.		+ <u>1</u>	
	DWB		+	3 % Т. pro µg/cm ²			
Chrysotil, UICC, ge-	0,1 µg/cm ²		100 % S.				
manlen	0,25 µg/cm ²		98 % S.	0 % T.			
	0,5 µg/cm ²		95 % S.	0 % T.	I	ć	Ċ
	1 µg/cm ²		.S % 06	0 % T.			
	DWB		(+)	I			

(Fortsetzung)
Zelltransformation
n-vitro-Versuche zur
Faserförmige Stäube: I
Tab. 3.27

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Ref	erenz ^a
	Masse	F-zahl		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung Hesterberg u	und Barrett (198	4)					
Quarz, Min-U-Sil	2 µg/cm ²			0,4 % T.			
	5 µg/cm ²		140 % S.	0,6 % T.			
	10 µg/cm ²		100 % S.	1 % T.			
	20 µg/cm ²		90 % S.		+	+ HNI	ю
	40 µg/cm ²		40 % S.				
	80 µg/cm ²		15 % S.				
	DWB		+	0,15 % T.pro µg/cm ²			
α-Quarz (obtained from	2 µg/cm ²		120 % S.				
Ur. Brody, NIEHS)	5 µg/cm ²		110 % S.				
	10 µg/cm ²		110 % S.	0,2 % T.			
	20 µg/cm ²		115 % S.	0,5 % T.	+	+ HNI	ę
	40 µg/cm ²		115 % S.	0,5 % T.		+ <u>-</u>	
	80 µg/cm ²		95 % S.	0,6 % T.			
	DWB		+	0,015 % T _. pro µg/cm ²			

ierenz ^a	Potenz				ę						ć		
Ref	-/+				+ HNI	+ <u>1</u>					INH n.g.		
Gentox.	-/+				+						+		
Gentoxizität	"Messwert"		0,5 % T.	1,5 % T.	8 % T.		14 % Т. pro µg/cm ²	0,2 % T.	0,4 % T.	1 % T.	1,5 % T.	5 % T.	0,6 % T. pro µg/cm ²
Zytotoxizität			90 % S.	80 % S.	20 % S.	8 % S.	+	95 % S.	95 % S.	80 % S.	30 % S.	8 % S.	+
is	F-zahl	4)											
Dos	Masse	nd Barrett (1984	0,1 µg/cm ²	0,25 µg/cm ²	0,5 µg/cm ²	1 µg/cm ²	DWB	0,5 µg/cm ²	1 µg/cm ²	2 µg/cm ²	4 µg/cm ²	8 µg/cm ²	DWB
Substanz		Fortsetzung Hesterberg u	Glasfasern Code 100,	Experiment 1, L = 9,5 µm, D = 0,13 µm				Glasfasern Code 100,	gemahlen, Experiment 1, L = 1,7 µm, D = 0,13	шл			

Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuche zur Zelltransformation (Fortsetzung) Tab. 3.27

(Fortsetzung)
elltransformation
Versuche zur Ze
ube: In-vitro-
Faserförmige Stäu
Tab. 3.27

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Ref	erenz ^a
	Masse	F-zahl		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung Hesterberg u	und Barrett (198 [,]	4)					
Glasfasern Code 100,	0,5 µg/cm ²		95 % S.	0,12 % T.			
Experiment 2, L = 16,0 µm, D = 0,18 µm	1 µg/cm ²		80 % S.	1 % T.			
	2 µg/cm ²		20 % S.	4 % T.	+	+ . HN	က
	4 µg/cm ²		8 % S.			+ <u>1</u>	
	DWB		+	1,5 % T. pro µg/cm ²			
Glasfasern Code 100,	0,5 µg/cm ²			0			
gemanlen, Experiment 2, L = 0,95 µm, D =	1 µg/cm ²		98 % S.	0			
0,18 µm	2 µg/cm ²		95 % S.	0	I	INH n.g.	ذ
	4 µg/cm ²		95 % S.	0			
	DWB		-				
Glasfasern Code 100,	0,5 µg/cm ²		20 % S.	4 % T.			
Experiment 3, L = 9,5 µm, D = 0,13 µm	1 µg/cm ²		6 % S.	12 % T.	+	+ <u>-</u> HN	ç
	DWB		+	10 % T. pro µg/cm ²		+ <u>L</u>	

Substanz	SOQ	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Ref	erenz ^a	
	Masse	F-zahl		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz	
Fortsetzung Hesterberg u	ind Barrett (198	4)						
Glasfasern Code 110,	1 µg/cm ²		.S % 06	0,15 % T.				
Experiment 3, U = 0,8 µm	2 µg/cm ²		80 % S.	0,5 % T.				
	4 µg/cm ²		.S % 07	0,6 % T.				
	8 µg/cm ²		40 % S.	4 % T.	+	- + 	7	
	16 µg/cm ²		10 % S.					
	DWB		+	0,4 % Т. pro µg/cm ²				

Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuche zur Zelltransformation (Fortsetzung) Tab. 3.27

wurde auch Referenzinformation von Staubarten verwendet, die nach aller verfügbaren wissenschaftlichen Evidenz als gleichartig zu betrachten sind (so wird z. B. für die Code 110-Glasfasern in dem Versuch von Hesterberg und Barrett, 1984, die Information über die in Inhalations- und Intra-peritonealversuchen an Ratten geprüften Fasern aus Glaswollen MMVF11 verwendet). Potenzzahlen gemäß Tab. 3.25. Die Angaben zur "Referenz" beziehen sich nicht in allen Fällen auf exakt dieselben Substanzproben, die in vitro untersucht wurden, sondern es ത

Hier ist anzumerken, dass trotz umfangreicher In-vivo-Daten mit Faserzahlbestimmungen die Frage der genauen Bedeutung der Faserdicke für ihre karzinogene Potenz bis heute nicht geklärt ist (siehe auch Roller et al., 1996, 1997).

Faserart	Krit.	Fas	erlänge [μm]	Faserdu	urchmess	ser [µm]
	Fasern pro ng	10%<	50%<	90%<	10%<	50%<	90%<
Chrysotil UICC/B	809	0,3	0,7	1,9	0,03	0,06	0,12
Krokydolith	99	0,9	1,8	4,7	0,11	0,19	0,32
Erionit, Oregon	40	0,8	1,8	4,6	0,08	0,16	0,41
Siliziumkarbid	107	1,5	3,1	9,5	0,19	0,31	0,48
Glasf. JM 104/475	158	0,7	2,3	8,2	0,06	0,14	0,38
Glasf. B-3K	57	1,6	3,3	7,7	0,19	0,37	0,70
Glasf. B-1M	3	6,7	10,7	21,1	0,88	1,68	2,49

Tab. 3.28Fasergehalte und Fasergrößenverteilungen der von Riebe-Imre et al.
(1994) geprüften faserförmigen Stäube.

Bemerkenswert bei den Versuchen von Hesterberg und Barrett (1984) ist, dass dort auch Proben granulärer Quarzstäube geprüft wurden, die grundsätzlich ebenfalls positive Befunde ergaben. Die – im Vergleich zu den Faserstäuben – relativ geringe Wirkungsstärke der Quarzproben stimmt mit einer relativ schwachen karzinogenen Wirkung intraperitoneal verabreichten Quarzes (Pott et al., 1987) überein. Sie stimmt aber nicht gut mit der karzinogenen Potenz in Inhalationsversuchen mit Ratten überein, in denen Asbest eine relativ geringe Wirkung gezeigt hat (Tab. 3.21). Allerdings hat Asbest in den Inhalationsversuchen eine ganz erheblich geringere Potenz gezeigt als aus epidemiologischen Studien zu berechnen ist (Tab. 3.22). Nach Tab. 3.24 sind Asbest und Quarz – bezogen auf die gravimetrische Expositionskonzentration – in derselben Größenordnung der karzinogenen Potenz beim Menschen angesiedelt.

Wegen ihres Umfangs und relativ klarer Ergebnisse sind außerdem die Transformationstests von Riebe-Imre et al. (1994) herauszuheben. Bei der Versuchsreihe von Riebe-Imre et al. (1994) liegt die Besonderheit vor, dass dort dieselben Stäube untersucht wurden, die zuvor auch in Langzeit-Tierversuchen auf karzinogene Effekte geprüft worden waren. Es handelte sich um mehrere faserförmige Stäube (Tab. 3.28), die im Vergleich mit unterschiedlichen granulären Stäuben (z. B. Nickeloxid) untersucht wurden. In der Versuchsreihe wurden für die Transformationstests sowohl Zellen einer Hamsterzell-Linie als auch Mesothelzellen von Ratten eingesetzt. Zytotoxizität wurde mittels Lebendzellzahlbestimmungen geprüft. In der Tab. 3.29 ist als Maß der Zytotoxizität der Stäube die so genannte ED50 angegeben, das ist diejenige Dosis in µg/mL, die zu einer Reduktion der Lebendzellzahl auf 50 % des Kontrollwertes führte*. Als Maß der Zelltransformation wurde so genannter *anchorage independent growth* auf Soft-Agar jeweils für mehrere Dosierungen bestimmt. Bei der Auswertung wurden mittels Regressionsanalyse die Steigungen der Dosis-Wirkungsbeziehungen berechnet; sie werden bezogen auf die Steigung beim Krokydolith bei der Hamsterzell-Linie angegeben (Steigung Krokydolith, M3E3/C3, definitionsgemäß = 100).



Abb. 3.3 Beziehungen zwischen den in-vivo- und in-vitro-Wirkungsstärken einiger faserförmigen und granulären Stäube, die in beiden Versuchsmodellen geprüft wurden (siehe Text).

In der Tab. 3.30 sind die Ergebnisse der Zelltransformationstests von Riebe-Imre et al. (1994) mit Ergebnissen von In-vivo-Langzeitversuchen (mit intraperitonealer Injektion) verglichen, die ebenfalls bei Riebe-Imre et al. (1994) referiert sind. Es handelt sich dabei jeweils um die gleichen Stäube (Daten siehe Tab. 3.28). Als Maß der Potenz in vivo sind hier die Dosis-Häufigkeitsbeziehungen der Langzeitversuche in so genannte TD25-Werte zusammengefasst. Dies sind diejenigen Dosiswerte, die rechnerisch mit einem zusätzlichen (expositionsbedingten) Tumorrisiko in Höhe von 25 % assoziiert sind. Sie wurden aus den Dosis-Tumorhäufigkeitsbeziehungen anhand der Originaldaten berechnet (Pott et al., 1987; Pott et al., 1989; Pott et al., 1991a, 1991b; Roller et al., 1996). Eine grafische Darstellung dieser TD25-Werte der faserförmigen Stäube und Erläuterungen der Berechnungsweise sind bei Pott et al. (1995) veröffentlicht. Die Werte für die granulären Nickel-Stäube wurden anhand der Originalpublikation von Pott et al. (1991b) für diesen Bericht berechnet (lineare Interpolation). In der Abb. 3.3 sind außerdem die In-vitro-Ergebnisse mit den Rattenmesothelzellen grafisch in Beziehung gesetzt zu den In-vivo-Ergebnissen mit dem gleichen Rattenstamm (Wistar). Für eine anschaulichere Vergleichbarkeit mit den in-vitro-

^{*} Die ED50-Werte sind in der Arbeit von Riebe-Imre et al. (1994) in Form von Grafiken dargestellt. Sie wurden von mir mittels Regressionanalyse aus den Originaldaten der Dosis-Wirkungsbeziehungen (Riebe-Imre, 1992, persönliche Mitteilung an M. Roller) berechnet. Dieselben Berechnungsergebnisse sind für die Tab. 5.3 verwendet.

Ergebnissen sind dabei die Kehrwerte der in-vivo-TD25-Werte ebenfalls relativ zum Krokydolith angegeben (Steigung Krokydolith = 1 / TD25, Krokydolith, definitionsgemäß = 100).

Die Tab. 3.30 und die Abb. 3.3 zeigen tendenziell eine Korrelation der massebezogenen Wirkungsstärken, die für einige faserförmige und granuläre Stäube im Zelltransformationsmodell von Riebe-Imre et al. (1994) ermittelt wurden, mit der karzinogenen Wirkungsstärke derselben Stäube im Intraperitonealmodell der Arbeitsgruppe von Pott. In Einzelfällen haben sich gleichwohl deutliche Unterschiede in den Wirkungsstärken in vivo einerseits und in vitro andererseits ergeben. Sehr gut übereinstimmend wurde in beiden Versuchsmodellen eine höhere Wirkungsstärke von Chrysotilasbest als von Krokydolithasbest - bezogen auf die Masse - gefunden (dies ist deshalb bemerkenswert, weil in der regulatorischen Diskussion der Weißasbest Chrysotil häufig als weniger "gefährlich" oder als in seinen Risiken gut beherrschbar geführt wird; siehe z. B. Eggertson, 2008; Chrysotile Institute, 2010). Die Wirkungsunterschiede werden anhand der spezifischen Fasergehalte plausibel. Wegen der besonders hohen Fasergehalte des Chrysotil können sich dabei rechnerisch geringere Wirkungsstärken je Chrysotilfaser ergeben (dies ist aber vorsichtig zu interpretieren, weil die Faserzahlen von Chrysotil wegen unregelmäßiger Formen und Spaltbarkeit besonders schwierig zu bestimmen sind). Eine deutliche Diskrepanz zwischen In-vivo- und In-vitro-Ergebnissen findet sich - quantitativ, nicht qualitativ - z. B. bei den "Hochleistungskeramikfasern" aus Siliziumkarbid. Eine einfache Erklärung lässt sich dafür nicht angeben. Erwähnenswert ist, dass mit granulärem Titandioxid grundsätzlich bei Riebe-Imre et al. (1994) positive Befunde im Zelltransformationstest erhalten wurden. Diese Befunde wurden seinerzeit in der Publikation als "guasinegativ" bewertet, weil ein deutlicher guantitativer Unterschied zu den faserförmigen Stäuben und auch zu dem Nickelpulver besteht und weil TiO₂ seinerzeit die "negative Kontrolle" zu den Faserstäuben repräsentierte. Im Hinblick auf eine Frage nach möglichen Wirkungen von "früheren Inertstäuben" (einschließlich Nanopartikeln aus solchem Material, sowie deren Aggregaten und Agglomeraten) ist aber eine Neubewertung angezeigt (siehe Abschnitt zu GBS, weiter unten).

Die Tab. 3.31 und die Abb. 3.4 zeigen Ergebnisse von Janssen et al. (1994). In den Versuchen wurde im Hinblick auf einen möglichen Wirkungsmechanismus der Faserkarzinogenese die Expression der so genannten Proto-Onkogene c-fos und c-jun untersucht. Im Prüfmaterial enthalten waren Proben der künstlichen Mineralfasern MMVF-10 und RCF-1, die wohl von Seiten der Mineralfaserindustrie zur Verfügung gestellt worden waren. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung erschienen auch Publikationen über Inhalationsversuche mit Stäuben derselben Bezeichnungen (Tab. 3.1). Beim Staub MMVF10 handelte es sich dabei um eine Probe, die einen zu jener Zeit gebräuchlichen Typ einer zur Wärmedämmung verwendeten Mineralwolle repräsentieren sollte. Die Abkürzung RCF steht für Refractory Ceramic Fiber, sie war damals üblich für Mineralwollen, die wie die zur Wärmedämmung verwendeten Wollen aus glasigem Mineral bestanden, die aber durch einen besonders hohen Aluminiumgehalt beständiger sind (zur Unterscheidung von anderen Keramikfasern, wie z. B. kristallinen Siliziumkarbid-Fasern, wird heute auch die Bezeichnung "Aluminiumsilikatwollen" für RCF bevorzugt).

Substanz	Dos	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	nz
	Masse [µg/mL]	F-zahl	EU50, Le- bendzell- zahlbest.	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsysten	n; Messgröße/	'Beobachtunç	g; Autor(en)				
Transformationstest; <i>Syn</i> Anzahl transformierter Ko Angabe in Relation zu Kr	<i>ian hamster epi</i> vlonien relativ zu okydolith (Mass	i <i>thelial cell line</i> u unbehandelt e / Faserzahl)	(M3E3/C3); <i>anc</i> ten Kontrollen, Stu t; Riebe-Imre (19	<i>chorage indepenc</i> eigung von Dosis 92, persönl. Mitte	<i>lent growth</i> (V Wirkungsbez eilung), Riebe-	Vachstum auf So ziehungen ausge -Imre et al. (199.	oft-Agar), ewertet, 4)
Chrysotil, 809 F/ng	0,01-1		11,3 / 9,2	186 / 23	+	INH+, IP+	ę
Krokydolith, 98,6 F/ng	1-2		14,2 / 1,4	100 / 100	+	INH+, IP+	ę
Erionit, 39,7 F/ng	5-20		66,5 / 2,6	19 / 48	+	INH+, IP+	З
Glasf. JM, 158 F/ng	50-150		40,7 / 6,4	n.n.	I	INH+, IP+	3
Glasf. B1, 2,7 F/ng	300-500		n.n.	n.n.	I	INH-, IP+	2
Glasf. B3, 57 F/ng	200-400		83,4 / 4,8	n.n.	I	INH n.g., IP-	I
SiC, 107 F/ng	10-100		44,3 / 4,7	5,6 / 5,2	+	INH+, IP+	S
TiO ₂ , granulär	200-750		462	0,07	(-)	INH+, IP-	-
NiO, granulär	200-750		(ca. 200)	0,16	+	INH+, IP+	2
Nickel, granulär	10-50		< 200	5,0	+	INH n.g., IP+	ю

Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuche zur Zelltransformation, Studien von Riebe-Imre et al. (1994) Tab. 3.29

bg	
ZU	
set	
Ë	
Ĕ	
Б	
atic	
Ĕ	
ğ	
INS	
Itra	
le l	
Z	
he	
n	
SIS	
Š	
<u>t</u>	
Ξ	
<u>_</u>	
.e	
äul	
5	
ge	
Ē	
lör	
ĕ	
-a a	
щ	
"	
Ň	
<u>е</u>	
ab	
F	

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	zu
	Masse [µg/mL]	F-zahl	EU50, Le- bendzell- zahlbest.	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsysten	n; Messgröße/	Beobachtunç	j; Autor(en)				
Transformationstest; <i>me</i> ; gestation); <i>anchorage in</i> ; Kontrollen, Steigung von ¹ M3E3/C3-Zellen (s.o.; Ma	sothelial cells fru dependent grow Dosis-Wirkungs isse / Faserzahl	<i>om the diaphr.</i> <i>th</i> (Wachsturr beziehungen); Riebe-Imre	agm of Han-Wist auf Soft-Agar), / ausgewertet, An (1992, persönl.	<i>ar rats</i> (RaD/C1, Anzahl transformi Jabe in Relation Mitteilung), Riebe	established fr erter Kolonie zur Wirkung v -Imre et al. (*	om foetal rats al n relativ zu unbe on Krokydolith t 1994)	t day 19 of shandelten bei
Chrysotil, 809 F/ng	0,01-1		34,0 / 27,5	671 / 82	+	INH+, IP+	3
Krokydolith, 99 F/ng	1-2		45,3 / 4,5	160 / 160	+	INH+, IP+	3
Erionit, 40 F/ng	5-20		168 / 6,7	17 / 42	+	INH+, IP+	3
Glasf. JM, 158 F/ng	50-150		30,7 / 4,9	1,8/1,1	+	INH+, IP+	3
Glasf. B-1, 2,7 F/ng	300-500		292 / 0,79	0,09 / 3,4	+	INH-, IP+	2
Glasf. B-3, 57 F/ng	200-400		147 / 8,4	0,27 / 0,46	+	INH n.g., IP-	I
SiC, 107 F/ng	10-100		156 / 16,7	n.n.	I	INH+, IP+	3
TiO ₂ , granulär	200-750		ca. 500	0,08	(-)	INH+, IP-	-
NiO, granulär	200-750		615	n.n.	-	INH+, IP+	2
Nickel, granulär	10-50		123	2,3	+	INH n.g., IP+	с

Vergleich der In-vitro-Ergebnisse von Riebe-Imre et al. (1994) mit der karzinogenen Potenz (TD25 i.p.) derselben Stäube (siehe Text) Tab. 3.30

Substanz	F ^a /ng	Faserabr	nessung	Potenz	in vivo		Potenz	in vitro ^d	
			=	TD25 ^c	TD25 ^c	Hamster	zell-Linie	Ratten	zellen
		Ľ	Dp	[mg]	[10 ⁹]	Masse	Faserz.	Masse	Faserz.
Chrysotil UICC/B	808	0,7	0,06	0,035	0,029	186	23	671	82
Krokydolith	85/99	1,8	0,19	0,15	0,015	100	100	160	160
Erionit	40			0,22	0,0088	19	48	17	42
Siliziumkarbid	107	3,1	0,31	0,29	0,031	n.n.	n.n.	1,8	1,1
Glasfasern JM 104/475	158	2,3	0,14	0,79	0,12	n.n.	n.n.	0,09	3,4
Glasfasern B-1M	2,7	10,7	1,68	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,27	0,46
Glasfasern B-3K	22	3,3	0,37	6,3	0,36	5,6	5,2	n.n.	n.n.
TiO ₂ , granulär	-	ł	-	n.n.	ł	0,07	1	0,08	1
NiO, granulär	-	ł		23	1	0,16	ł	n.n.	n.n.
Nickel, granulär	-	1	-	14	-	5,0	1	2,3	-

Faserdefinition: Länge (L) > 5 µm, Durchmesser (D) > 2 µm, L/D > 5/1

p a

Median bei den Angaben für die in den i.p.-Versuchen verwendeten Proben

Berechnet anhand des quantal-linearen Modells aus den beobachteten Häufigkeiten von untersuchten Tieren und Tieren mit Tumor bei einer oder mehreren Dosisstufen ပ

d = Gentoxizität-"Messwert" von Tab. 3.29 (siehe auch Text)



Abb. 3.4 Dosis-Wirkungsbeziehungen in den In-vitro-Versuchen von Janssen et al. (1994).

Im Abstract der Arbeit von Janssen et al. (1994) heißt es: "No increases in protooncogene induction were observed using MMVF-10 or RCF-1 at nontoxic concentrations ($\leq 5 \mu g/cm^2$ dish). ... Nonfibrous particles (riebeckite, polystyrene beads) did not alter proto-oncogene expression ..." Diese Aussagen zeigen einen weiten Interpretationsspielraum solcher Versuche. Die beiden künstlichen Mineralfasertypen führten nach Angabe der Autoren nicht zur Geninduktion bei nicht-toxischen Dosen. Was heißt das? Liegt hier ein positives oder ein negatives Testergebnis vor? Die Abb. 3.4 zeigt sowohl für Krokydolith als auch für die beiden Typen künstlicher Mineralfasern Dosis-Wirkungsbeziehungen der c-fos-Induktion. In keinem Fall entsteht der Eindruck einer sublinearen Kurve, die Steigung wird eher bei den höheren Dosen flacher. Nimmt man die Steigung einer linearen Interpolation zwischen Kontrollwert und niedrigerer Dosis als Maß der Wirkungsstärke, dann ergibt sich massebezogen rechnerisch für den Krokydolith eine 4,5fach stärkere Wirkung als bei den künstlichen Fasern. Nimmt man entsprechend die Werte der höheren Dosis, dann bleibt ein Unterschied von einem Faktor 2, d. h. die künstlichen Fasern erscheinen bezogen auf die Masse halb so stark wirksam wie Krokydolith. Krokydolithasbest (Blauasbest) ist eines der bedeutendsten Arbeitsplatzkarzinogene, der Probe von Janssen et al. (1994) wird von den Autoren eindeutig ein deutlicher Effekt in ihrem Testmodell zugesprochen. Aber bei Proben, die nur um einen Faktor von 2 bis 4 schwächer wirksam sind als der stark karzinogene Blauasbest, lässt sich für dieses In-vitro-Modell bereits keine klare Aussage über einen relevanten Effekt mehr treffen. Hier muss von einem sehr geringen Auflösevermögen des Testmodells gesprochen werden, das die Bewertung der Ergebnisse sehr schwierig macht. Bemerkenswert ist, dass MMVF10 und RCF1 gemäß Abb. 3.4 sehr ähnliche Ergebnisse brachten, während im Inhalationsversuch nur mit RCF1 eindeutig eine Erhöhung der Lungentumorhäufigkeit der Ratten gefunden wurde (Tab. 3.1). Ferner fällt auf, dass der granuläre Riebeckit-Staub mit der 5-µg/cm²-Dosis nicht zu einer schwächeren c-fos-Induktion führte als MMVF10 und RCF1. Somit bleibt unklar, ob hier Zufallsstreuung vorliegt oder z. B.

Substanz	Dos	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Rei	ferenz
	Masse	F-zahl	(Veränderungen nach 24 / 72 h)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsysten	n; Messgröße/	Beobachtun	g; Autor(en)				
Induktion von c-fos- und c per minute, cpm) nach rac dy-state mRNA-Levels); 、	⊃-jun-Proto-Onk dioaktiver Marki Janssen et al. (ogenen, Expc lerung und Nc 1994)	sitionsdauer 8 h; R hthern-blot-Hybridis	tatten-Pleurames ierung als Maß d	otheliomzeller er c-fos- / c-ju	ר (RPM); Ak n-Genexpre	tivität (counts ssion (stea-
Krokydolith, L = 11,4, D	5 µg/cm ²		++ / -	7 / 4,8	+	+ HNI	c
= 0,27 µm	25 µg/cm ²		+++/+	10,5 / 7	(+)	+ 	0
MMVF10, L = 19,8, D =	5 µg/cm ²		- / -	3,5 / 3,5	I	- HNI	C
1,36 µm	25 µg/cm ²		+/+	6,5 / 4,5	ć	+ 	N
RCF1, L = 24,0, D =	5 µg/cm ²		+/-	3,5 / 3,5	I	+ HNI	C
1,07 µm	25 µg/cm ²		++ / +	6 / 4	ć	+ 	N
Erionit, L = 6,0, D = 0,8	1 µg/cm ²		- / -	3,8 / 3	i	+ HNI	2
шл	5 µg/cm ²		++ / +	8 / 5,2	(+)	+ -	C
Riebeckit, D = 0,8 µm	5 µg/cm ²		(25 µg/cm ² : - / -)	4,5/3	I	خ	?
Kontrolle				2,5 / 2,5			

Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität von Janssen et al. (1994; Abkürzungen siehe S. 4) Tab. 3.31

ein allgemeiner Partikeleffekt, der nicht faserspezifisch ist. Auch dies kann als Ausdruck des geringen Auflösevermögens des Modells gesehen werden.

Einer besonderen Erläuterung bedarf die Arbeit von Cavallo et al. (2004), weil die Interpretationen der Autoren in besonders starkem Kontrast zu den augenscheinlichen Aussagen der grafisch präsentierten Messergebnisse stehen. In der Studie waren vier Proben von künstlichen Mineralfasern im Vergleich mit einer Krokydolithprobe untersucht worden. Die physikalisch/chemischen Eigenschaften der Proben sind relativ detailliert beschrieben, so z. B. die Elementzusammensetzung der Materialien und Kenngrößen der Fasergrößenverteilungen. Bei der Studie geht es vor allem um den Comet-Assay, sowohl in der Variante ohne als auch mit Fpg-Enzymbehandlung. Die Stäube wurden nach Masse dosiert und zwar einheitlich bei allen Proben mit 1. 2, 5 und 10 µg/cm². Leider werden die Zahlenwerte der Testergebnisse nicht in einer Tabelle angegeben, sondern sie werden in Form einer Grafik präsentiert, wobei keine genauen Angaben über die Variabilität der Messwerte enthalten sind. Die Grafik besteht im Wesentlichen aus einem xy-Diagramm, mit der Massendosis als x-Achse und dem Tail-Moment als y-Achse. In ein einziges Diagramm sind die Ergebnisse aller Proben und aller Ansätze des Comet-Assay, d. h. ohne und mit Fpg-Enzym, eingetragen. Um eine bessere Unterscheidung der Ergebnisse ohne und mit Fpg-Enzym zu ermöglichen, enthält die Abbildung zusätzlich zwei kleinere xy-Diagramme, die sich von dem größeren Diagramm nur dadurch unterscheiden, dass die Werte für den Assay ohne und mit Fpg-Enzym jeweils in einen getrennten Diagramm dargestellt sind. Der erste Eindruck von den Grafiken ist, dass mit allen Proben deutliche Dosis-Wirkungsbeziehungen erhalten wurden und dass sich die Dosis-Wirkungsbeziehungen mit einer einzigen Ausnahme nur relativ wenig unterscheiden. Die Ausnahme sind die Ergebnisse des Tests mit Fpg-Enzym für die Krokydolithprobe, die - bezogen auf die Massendosis - eine stärkere Wirkung als die anderen Proben zu zeigen scheint.

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse ohne Fpg-Enzym, so ergibt sich ungefähr folgendes Bild: Bei den unbehandelten Kontrollen findet sich ein Tail-Moment von 5, bei allen Faserproben ist dieser Wert bei allen Dosen deutlich erhöht, und zwar um das 4fache auf den Wert 20 bis zum 9fachen auf den Wert 45. Bei den meisten Stäuben ist eine klare Dosisabhängigkeit zu erkennen, wobei der relativ größte Anstieg bei der niedrigsten Dosis von 1 µg/cm² erfolgt und dann ein schwächerer, aber gleichwohl deutlich erkennbarer Anstieg bis zur höchsten Dosis von 10 µg/cm² erfolgt. Eine Ausnahme bildet dabei die Probe der Rock wool, die den stärksten Effekt (Tail-Moment 45) bei der niedrigsten Dosis zeigt, der bei den höheren Dosen auf ein ungefähr gleichbleibendes Niveau von 35 abfällt. Krokydolith ragt in seiner massebezogenen Wirkungsstärke ohne Fpg-Enzym nicht aus den übrigen Faserproben heraus. In unserer Tab. 3.32 sind die Ergebnisse beispielhaft für die Massendosis von 5 µg/cm² aufgeführt (wobei die Zahlenwerte aus der Abbildung von Cavallo et al., 2004, abgegriffen sind). Meine Schlussfolgerung aus den Ergebnissen wäre, dass sich mit der Standardversion des Comet-Assay in der Studie von Cavallo et al. (2004) mit einer Probe von Krokydolithasbest und mit vier Proben von künstlichen, glasigen Mineralwollen deutliche und bezogen auf die Staubmasse sehr ähnliche Dosis-Wirkungsbeziehungen finden. Die Auswertung bzw. Interpretation der Autoren unterscheidet sich stark von dieser Schlussfolgerung. Die Autoren haben einen statistischen Test durchgeführt und bewerten die Testergebnisse sehr stark orientiert an den Ergebnissen des statistischen Tests mit dem sehr "strengen" Signifikanzniveau von 0,1 % (d. h. signifikant, falls p < 0,001). Mit diesem Test und dem gewählten Signifikanzniveau finden die Autoren - nach Angaben in ihrem Text - einen statistisch signifikanten Effekt nur mit der Probe von Rock wool. Die Ergebnisse mit den anderen künstlichen Mineralfasern und mit dem Asbest sind nicht signifikant.

Eine ähnliche Diskrepanz zwischen der augenscheinlichen Botschaft der xy-Diagramme und den Ergebnissen des statistischen Tests ergibt sich auch bei den Daten der Assay-Variante mit Fpg-Enzym. Das Tail-Moment der Kontrolle liegt dabei bei 10. Mit der Dosis von 5 µg/cm² finden sich mit allen künstlichen Mineralfasern sehr ähnliche Werte zwischen knapp 30 und zirka 35. Das Tail-Moment für Krokydolith liegt ungefähr doppelt so hoch bei rund 60. Der statistische Test der Autoren ergibt nur für den Krokydolith und für die Keramikfasern (refractory ceramic fibers, RCF) Signifikanz. Insgesamt gehen die Schlussfolgerungen der Autoren daher in die Richtung, dass nur Krokydolith und bestimmte Proben aus ihrer Auswahl von künstlichen Mineralfasern positive Testergebnisse in ihrem Comet-Assay ergeben haben. Diese Interpretation erscheint vor dem Hintergrund der verwendeten statistischen Methode fraglich. Hinzu kommt, dass sich die Wirkungsstärken bezogen auf die Faserzahlen wiederum anders darstellen.

Die von Cavallo et al. (2004) gewählte statistische Analysemethode erfordert eine eingehendere Diskussion der statistischen Auswertung von Dosis-Wirkungsbeziehungen. Diese wird in diesem Abschnitt nur angeschnitten und in einem eigenen Kapitel 4 als Exkurs detaillierter geführt. Cavallo et al. (2004) geben keinen Grund dafür an, weshalb sie nicht das häufig gewählte Signifikanzniveau von 5 %, sondern das ungewöhnliche Niveau von 0,1 % verwenden. Deshalb kann hier nur vermutet werden, dass dies vor dem Hintergrund des "multiplen Testens" erfolgt ist. Die Autoren verwenden Student's t-Test. Dieser Test ist angelegt zum Vergleich zweier Stichproben mit (annähernd) normalverteilten Variablen. Im Falle mehrerer Dosen wird der Test aber mehrmals gegenüber derselben Kontrollgruppe durchgeführt, was die Irrtumswahrscheinlichkeit im Sinne der Neyman-Pearson-Statistik (s. Kapitel 4) verändert. In der Vergangenheit wurde immer wieder die Frage des multiplen Testens bzw. der "Post-Hypothesen-Statistik" angesprochen. Ursprünglich bezieht sich diese Problematik auf einen Fall, in dem z. B. fünf Proben geprüft werden, man gleichzeitig vor Versuchsbeginn keine Informationen über vermutete Wirkungsstärken der Proben hat, jedoch nach Versuchsdurchführung nach etwaigen Unterschieden in der Wirkungsstärke der Proben sucht. Es mag dann verführerisch sein, die Proben mit dem schwächsten und stärksten Effekt, etwa mit Student's t-Test, untereinander zu vergleichen. Dabei mag ein p-Wert von 0.03 erhalten werden. Im Rahmen der Neyman-Pearson-Statistik wäre dieser Unterschied zwischen diesen beiden Proben aber nicht notwendigerweise auf dem 5%-Niveau statistisch signifikant. Durch das mehrfache Testen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit "auf lange Sicht" verändert. Die Hypothese eines möglichen Unterschieds gerade zwischen diesen beiden Proben wurde dabei nicht vor dem Versuch, sondern erst anhand der Versuchsergebnisse gebildet. Unter einer relativ großen Zahl von Proben ist es auch aufgrund des Zufalls wahrscheinlich, dass sich zwischen zwei Proben ein relativ großer Unterschied findet.
(2004)	
on Cavallo et al. (
cur Gentoxizität vo	
e Stäube: In-vitro-Versuche z	
Faserförmig	
Tab. 3.32	

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Rei	ferenz
	Masse [µg/cm²]	F-zahl [F/cm ²]		"Messwert" (pro 10 ³ F)	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsyster	n; Messgröße/	Beobachtung	g; Autor(en)				
Comet-Assay (Standard) sothelzell-Linie MeT-5A;	und so genanni Tail-Moment (o	e Fpg-Version hne / mit Fpg)	n (mit Fpg-Enzym);); Cavallo et al. (2	behandlung), Bel 004) - Erläuteru	nandlungsdau Ingen siehe T	ier 2 h; mer ext	Ischliche Me-
Krokydolith, NIEHS, L 10, D 0,27	5	7600 (1800)	80-90 % V., morpholog. Veränderungen	30 / 60 (3,9 / 7,9)	+/-	+ dl + HNI	3
Glass wool, L 57,3, D 4,3	5	950 (700)	80-90 % V.	32 / 35 (34 / 37)	- / -	- HNI - HNI	2
Rock wool, L 52,1, D 2,3	5	6500 (5000)	80-90 % V., morpholog. Veränderungen	28 / 40 (4,3 / 6,2)	+ / -	- HNI + 9	2
Danish rock wool, L 96,9, D 3,7	5	900 (800)	80-90 % V., morpholog. Veränderungen	35 / 40 (39 / 44)	- / -	+ dl - HNI	2
Refractory ceramic fi- bers (RCF), L 44,5, D 3,3	5	2600 (1700)	80-90 % V., morpholog. Veränderungen	35 / 36 (13 / 14)	- / +	+ HNI + HNI	2
Kontrolle				5 / 10			

(2006)	
<u>a</u> .	
et	
Cardinal	
VON	
Gentoxizität	
ur (
Ū B	
Versuch	
In-vitro-	
Stäube:	
serförmige	
Fa	
Tab. 3.33	

Substanz	Dos	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Rei	erenz
	Masse [µg/cm ²]	F-zahl [F/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem	ı; Messgröße/	Beobachtung	j; Autor(en)				
Analyse Thiobarbitursäure TBARS-Äquivalente, spek nali et al. (2006) - Erläute	e-reaktiver Sub trophotometris erungen siehe	stanzen (TBAF ch bestimmt, c Text	रS), Behandlungs quantifiziert mittels	dauer 24 h; mer s Malondialdehyo	ıschliche Mes I-Eichkurve [n	othelzell-Lir mol/mg Prot	iie MeT5A; ein]; Cardi-
Krokydolith, NIEHS, L 10, D 0,27	10		13 % nv /25 µg/cm ²	0,056	+	+ dl + HNI	3
Glass wool, L 57,3, D 4,3	10		5 % nv /25 µg/cm ²	0,021	I	+ dl - HNI	2
Rock wool, L 52,1, D 2,3	10		2,5 % nv /25 µg/cm ²	0,049	+	- HNI - HNI	2
Danish rock wool, L 96,9, D 3,7	10		3 % nv /25 µg/cm²	0,031	+	+ dl - HNI	2
Kontrolle			2 % nv /25 µg/cm ²	0,018			

(Fortsetzung)
ur Gentoxizität
ro-Versuche zu
Stäube: In-viti
Faserförmige
Tab. 3.33

Substanz	Dos	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Re	ferenz
	Masse [µg/cm ²]	F-zahl [F/cm ²]		"Messwert"	+/-	+/-	Potenz
Testmodell; Prüfsystem	n; Messgröße/	'Beobachtunç	j; Autor(en)				
Vitamin E-Analyse, Behar (2006) - Erläuterungen s	ndlungsdauer 2 iehe Text	4 h; menschli	che Mesothelzell-	Linie MeT5A; Vit	amin E [ng/mę	g Protein]; (Cardinali et al.
Krokydolith, NIEHS, L 10, D 0,27	10		13 % nv /25 µg/cm ²	30,41	+	INH + IP +	3
Glass wool, L 57,3, D 4,3	10		5 % nv /25 µg/cm ²	60,07	+	INH - IP +	2
Rock wool, L 52,1, D 2,3	10		2,5 % nv /25 μg/cm ²	58,24	+	INH - IP +	2
Danish rock wool, L 96,9, D 3,7	10		3 % nv /25 µg/cm ²	63,00	+	INH - IP +	2
Kontrolle			2 % nv /25 µg/cm ²	78,41			

\sim	
ng	
zu	
ët	
£	
Ъ	
it (
itä	
Ξ.	
g	
ē	
Ģ	
Z	
Ð	
ч	
su	
٩,	
~	
itro	
Ž	
<u>_</u>	
ğ	
äuk	
Stà	
é	
Jig	
, Ľ	
Ë	
Se	
Ц	
ო	
ń	
с. С.	
đ	

Tab. 3.33 Faserförmig	ge Stäube: In-vit	:ro-Versuche 2	zur Gentoxizität (F	ortsetzung)			
Substanz	Dos	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Rei	ferenz
	Masse [µg/cm ²]	F-zahl [F/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsysten	n; Messgröße/	'Beobachtun	g; Autor(en)				
ROS-Bildung – Fluoresze sche Enzyme in den redu vermittelte Oxidation zu C dinali et al. (2006) - Erlä	enz-Assay (inaki uzierten Farbsto OCF ist), Behand iuterungen siehe	tive Esterform ff 2′,7′-Dichlo dlungsdauer 2 e Text	12',7'-Dichlordihy rdihydrofluorescei 24 h; menschliche	drofluorescein-Di n, HDCF, umgew Mesothelzell-Lir	acetat, HDCF /andelt, der er iie MeT5A; Flı	-DA, wird du mpfindlich fü uoreszenzin	ırch zytosoli- ır eine ROS- tensität; Car-
Krokydolith, NIEHS, L 10, D 0,27	10		13 % nv /25 µg/cm ²	172	+	+ HNI + HNI	3
Glass wool, L 57,3, D 4,3	10		5 % nv /25 µg/cm ²	162	I	+ dl - HNI	2
Rock wool, L 52,1, D 2,3	10		2,5 % nv /25 µg/cm ²	154,3	+	- HNI - HNI	2
Danish rock wool, L 96,9, D 3,7	10		3 % nv /25 µg/cm ²	164	+	- HNI - HNI	2
Kontrolle			2 % nv /25 µg/cm ²	146			

(Fortsetzung	
Gentoxizität (
Versuche zur	
e: In-vitro-/	
ge Stäube	
Faserförmig	
ab. 3.33	

Tab. 3.33 Faserförmig	ge Stäube: In-vit	ro-Versuche z	zur Gentoxizität (F	ortsetzung)			
Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Rei	erenz
	Masse [µg/cm ²]	F-zahl [F/cm ²]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsysten	n; Messgröße/	Beobachtun	g; Autor(en)				
BrdU-Inkorporation – Eint sothelzell-Linie MeT5A; li reszenz mittels monoklon	bau von Bromde chtmikroskopisc ialer Antikörper)	ssoxyuridin al ch gezählter A Zellkerne; C	s Maß der Zellpro nteil von Zellen m ardinali et al. (200	liferation, Behanc it angefärbtem (z)6) - Erläuterung	llungsdauer 2 .um Nachweis jen siehe Tex	4 h; mensc s von BrdU, t	nliche Me- mmunfluo-
Krokydolith, NIEHS, L 10, D 0,27	5 oder 10		13 % nv /25 µg/cm ²	90,7-93 %	+	+ HNI + HNI	3
Glass wool, L 57,3, D 4,3	5 oder 10		5 % nv /25 µg/cm ²	56-87 %	T	- HNI - HNI	2
Rock wool, L 52,1, D 2,3	5 oder 10		2,5 % nv /25 µg/cm ²	59-82 %	I	- HNI IP +	2
Danish rock wool, L 96,9, D 3,7	5 oder 10		3 % nv /25 µg/cm ²	56,5-75,8 %	T	- HNI - HNI	2
Kontrolle			2 % nv /25 µg/cm ²	57,6-83 %			

Eine ähnliche Problematik wie in dem beschriebenen Fall fünf unbekannter Proben wird in der regulatorischen Toxikologie grundsätzlich auch beim statistischen Prüfen einzelner Probenergebnisse aus Dosisreihen gesehen. Die Problematik wird darin gesehen, dass es in der Regel nur eine einzige Kontrollgruppe gibt, die mehrfach verwendet wird, um die einzelnen Dosisstufen gegen sie zu testen. Es handelt sich formal also um das mehrfache Testen an ein und derselben Probe. Für diesen Fall wurden spezielle statistische Tests entwickelt, z. B. Dunnett's Test. Von manchen Autoren werden für diesen Fall auch weitere so genannte Post-hoc-Tests verwendet (z. B. Scheffe's Test), die allerdings ursprünglich für Situationen wie den oben genannten Fall der fünf unbekannten Proben entwickelt wurden. Es lässt sich zeigen und ist zu erwarten, dass Tests wie Dunnett's Test oder Scheffe's Test im Ergebnis bei gleichem nominellen Signifikanzniveau - weniger empfindlich als Student's t-Test sind, d. h. die gemessenen Unterschiede müssen größer sein, um zum Ergebnis "signifikant" zu führen. Bezogen auf Student's t-Test entspricht dies also tendenziell einem verminderten ("verschärften") Signifikanzniveau. Wohl deshalb ist es in der Literatur zu beobachten, dass die einzelnen Versuchsgruppen von Dosisreihen - anstatt mit einem Post-hoc-Test - mit Student's t-Test mit vermindertem Signifikanzniveau geprüft werden. So ist grundsätzlich auch das Signifikanzniveau von 0,1 % bei Cavallo et al. (2004) zu verstehen.

Meines Erachtens kann aber gerade die Verwendung von Post-hoc-Tests wie z. B. Scheffe's Test - oder eben entsprechend die Verringerung des Signifikanzniveaus von Student's t-Test - bei Dosisreihen zu irreführenden Interpretationen führen. Zunächst ist es bei einer Dosisreihe eines toxikologischen Assay nicht so, dass a priori keine Hypothese über mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen bestünde. In der Regel lautet die Fragestellung zwangsläufig: Nimmt mit steigender Dosis die Effektausprägung zu? Es werden auch nicht willkürlich alle Dosisgruppen miteinander verglichen, sondern die Kontrollgruppe hat von vornherein eine Sonderstellung. Die Problematik kann an der Asbestprobe in dem Comet-Assay ohne Fpg von Cavallo et al. (2004) verdeutlicht werden. Der "Messwert" der Kontrolle beträgt 5. Bei allen Dosen des Asbest ist der Messwert deutlich höher, bei den beiden kleineren Dosen beträgt er jeweils zirka 20 und steigt bei den beiden höheren Dosen auf zunächst knapp 30 und dann über 30 an. Gegenüber einem Kontrollwert von 5 bedeutet ein Anstieg auf 30 eine Erhöhung auf das 6fache. Es erscheint plausibel, dass die Erhöhung einer Effektausprägung um das 6fache statistisch signifikant wäre, wenn man nur diese eine Dosis untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen hätte. Dabei hätte man in der Regel ein Signifikanzniveau von 5 % zugrunde gelegt. Angenommen, der p-Wert (für den Messwert von knapp 30) bei der zweithöchsten Asbestdosis liege bei p = 0,03 und gleichzeitig liege der p-Wert für die höchste Dosis (Messwert knapp über 30) bei p = 0,02, dann wäre das Ergebnis statistisch signifikant, falls nur eine dieser Dosen geprüft worden wäre. Nun gibt es aber die "Philosophie", dass es sich hier um multiples Testen handle und dass deshalb das Signifikanzniveau zu verschärfen sei. Würde man also ein Signifikanzniveau von 1 % anlegen (d. h. signifikant, falls p < 0,01), dann wäre das Ergebnis bei keiner der beiden Dosen signifikant. Hier hätte also der Umstand, dass anstatt von nur einer Dosis mehr als eine Dosis geprüft wurde, dazu geführt, dass "kein Effekt" gefunden worden wäre, obwohl nicht nur bei einer, sondern sogar bei zwei Dosen eine deutliche Veränderung der Effektausprägung gegenüber der Kontrollgruppe stattgefunden hat. Dies ist widersinnig. Aus diesem Grund ist m.E. die Veränderung des üblichen Signifikanzniveaus von 5 % beim statistischen Testen einzelner Gruppen von Dosis-Wirkungsbeziehungen und auch die Verwendung spezieller Tests abzulehnen. Dies gilt erst recht, wenn es um die Auffindung eines so genannten NOAEL geht, also der höchsten Dosis, bei der gerade keine Signifikanz gefunden wird.

Leider lassen sich die tatsächlichen Gründe für das "seltene" Vorliegen von statistischer Signifikanz bei den deutlichen Dosis-Wirkungsbeziehungen der Arbeit von Cavallo et al. (2004) anhand der Veröffentlichung nicht klären. Die Arbeit enthält nämlich - außer dem Sternchensymbol *, das einen p-Wert kleiner als 0,001 anzeigt keine Informationen über die Varianz der Messergebnisse der einzelnen Gruppen. Der Methodenteil der Arbeit enthält die Angabe, dass je Gruppe 50 Kometenschweife ausgewertet wurden und dass daraus der Mittelwert für die Gruppe gebildet wurde. Es findet sich jedoch keine Information über die Varianz oder Standardabweichung je Gruppe. Man steht bei den Ergebnissen von Cavallo et al. (2004) vor einem Rätsel. Die Autoren geben für den Standard-Comet-Assay kein signifikantes Ergebnis für Krokydolith an. Bei den Dosen von 5 und 10 µg/cm² ist, wie gesagt, ein Tail-Moment von rund 30 in der Abbildung in der Publikation zu erkennen, bei einem Tail-Moment der Kontrolle von 5. Angenommen, es handelt sich bei diesen Zahlen um die Mittelwerte von je 50 Bestimmungen und die einzelnen Messwerte wurden mittels t-Test verglichen, dann kann man anhand von Szenarien abschätzen, wie hoch die Standardabweichung sein dürfte, um gerade noch ein signifikantes bzw. nichtsignifikantes Ergebnis zu erbringen. Ein Mittelwert von 5 mit einer Standardabweichung von 8,5 führt im Vergleich mit einem Mittelwert von 30 und einer Standardabweichung von 40 nach Student's t-Test zu einem p-Wert von 0,00007, wäre also auch auf dem 0,1%-Niveau signifikant (Stichprobenumfang jeweils 50). Eine Standardabweichung von 40 bei einem Mittelwert von 30 bedeutet eine ganz erhebliche Streuung der einzelnen Messwerte, z. B. mit mehreren Messwerten von Null sowie gleichzeitig mehreren Messwerten von 150. Falls ein Mittelwert von 30 nicht signifikant von einem Mittelwert von 5 verschieden ist, dann muss die Streuung der Einzelwerte sehr groß sein. Es wäre dann umso problematischer, einzelne Proben als in ihrer Wirkung von den anderen verschieden - bei den geringen relativen Unterschieden - herauszuheben. Daher ist es sehr bedauerlich, dass in einer peer-reviewed-Publikation wie der Arbeit von Cavallo et al. (2004) der Leser keine klareren Informationen nachlesen kann und zu Spekulationen verführt wird.

Die Arbeit von Cardinali et al. (2006) ist in Verbindung mit der Arbeit von Cavallo et al. (2004) zu betrachten. Es handelt sich teilweise um dieselben Autoren, in beiden Studien wurde die Mesothelzell-Linie MeT-5A verwendet, und es wurden die gleichen Stäube geprüft. Anstelle des Comet-Assay wurden von Cardinali et al (2006) eine Reihe anderer In-vitro-Tests durchgeführt. Die Tests dienten vor allem der Beurteilung von oxidativem Stress, der durch die Staubbelastung ausgelöst werden könnte. In der Tab. 3.33 sind exemplarisch die Ergebnisse des TBARS-Assay, der Vitamin-E-Analyse, des HDCF-Assay und zusätzlich der BrdU-Inkorporation aufgeführt (die Publikation enthält noch einige weitere Ergebnisse, die aber letztlich nicht zu anderen Schlussfolgerungen führen). Produkte von Lipidperoxidation (z. B. Malondialdehyd) werden in Form der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) gemessen. Der Vitamin-E-Gehalt dient als Maß der Beanspruchung von Schutzsystemen gegen reaktive Sauerstoffspezies, und die Fluoreszenz des Farbstoffs 2',7'-Dichlordihydrofluorescein (HDCF) soll direkt den Umfang der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies anzeigen. Die BrdU-Inkorporation dient als Maß der Stimulierung der Zellproliferation. Als statistischer Test wurde von Cardinali et al. (2006) wie auch von

Cavallo et al. (2004) Student's t-Test verwendet, jedoch wurde - und das ist bemerkenswert - als Grenze zur statistischen Signifikanz ein p-Wert von 0,05, d. h. das übliche Signifikanzniveau von 5 %, angesetzt. In der Gesamtschau der Ergebnisse ist festzustellen, dass mit allen Staubproben oxidativer Stress der Zellen gefunden wurde. Vor dem Hintergrund der neueren Ergebnisse von Cardinali et al. (2006) ist es plausibel, auch die Ergebnisse von Cavallo et al. (2004) entsprechend den dort veröffentlichten Grafiken als positiv zu bewerten (trotz der Bewertung als "negativ" anhand des 0,1%-Niveaus der Autoren). Zwar waren die Effekte mit der Glass wool massebezogen - tendenziell schwächer als mit den anderen Stäuben, insgesamt sind die Unterschiede zwischen den Proben aber erstaunlich wenig ausgeprägt. Dies steht in einem gewissen Gegensatz zu den Langzeit-Tierversuchen, in denen massebezogen größere Unterschiede der karzinogenen Wirkung (relativ dünner Asbestfasern) zu Mineralwollstäuben mit relativ dicken Fasern gefunden wurden. Die Ergebnisse der BrdU-Inkorporation sind schwierig zu beurteilen, nicht nur weil die genaue Dosis unklar bleibt (bei welchen Stäuben 5 µg/cm², bei welchen 10 µg/cm²?). Ist die Stimulierung der Zellproliferation als Hinweis auf einen Wirkungsmechanismus der Karzinogenität zu sehen? Falls man dies so interpretiert, dann stehen die Ergebnisse insofern im Gegensatz zu Langzeit-Tierversuchen mit intraperitonealer Injektion, in denen auch künstliche Mineralfasern Tumorbildung induziert haben, allerdings mit messbar geringerer Wirkungsstärke als Asbest.

Die Tabelle 3.34 enthält Ergebnisse weiterer In-vitro-Studien mit faserförmigen Stäuben. Howden und Faux (1996) haben Lipidperoxidation und die Bildung fluoreszierender DNA-Addukte untersucht. In der Zusammenfassung ihrer Arbeit heben sie vor allem auf ihre Ergebnisse mit der Ratten-Lungenfibroblasten-Linie RFL-6 ab. Sie sehen einen Zusammenhang mit dem Eisengehalt der Stäube und der Auslösung von oxidativem Stress, der sich in der Bildung von DNA-Addukten äußert. Unter den untersuchten Stäuben befinden sich auch zwei Typen künstlicher Mineralfasern (MMVF21 = rock wool, RCF1 = refractory ceramic fibers), die auch in Langzeit-Inhalationsversuchen geprüft worden waren. Die In-vivo- und In-vitro-Ergebnisse stimmen hier nicht gut überein. In den Inhalationsversuchen haben Krokydolith, Chrysotil und RCF1 ungefähr gleichermaßen deutlich karzinogene Effekte gezeigt, während mit MMVF21 kein klarer Effekt nachgewiesen werden konnte. In den Versuchen von Howden und Faux (1996) haben dagegen Krokydolith und MMVF21 viel deutlichere Effekte als Chrysotil und RCF1 gezeigt.

Kováčiková et al. (2004) berichten für alle von ihnen in vitro untersuchten faserförmigen Stäube positive Befunde im Comet-Assay (Amosit, Wollastonit, Rock wool, Glass fibres; Tab. 3.34). Bemerkenswert ist dabei insbesondere, dass auch Wollastonit ähnlich positive Befunde ergab wie die anderen Stäube. Wollastonit gilt als relativ wenig biobeständig und hat in Langzeitversuchen an Ratten nicht zu Tumoren geführt. Es ist dennoch nicht unplausibel, dass in vitro Effekte gefunden werden, da der In-vitro-Test mit nur 24 Stunden Expositionsdauer eine etwaige Auswirkung von Langzeitbeständigkeit systembedingt nicht ohne weiteres erfassen kann. Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität von Howden und Faux (1996) Tab. 3.34

Substanz	Dos	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Re	ferenz
	Masse	F-zahl		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem	1; Messgröße/	Beobachtunç	3; Autor(en)				
Bildung fluoreszierender [pro µg DNA; Howden und	DNA-Addukte, E d Faux (1996)	3ehandlungsd	auer 24 h; Ratte	n-Lungenfibrobla	sten-Linie RF	L-6; Fluores	szenzintensität
Krokydolith UICC, 149	2 µg/cm ²			~0,01		+ HNI	C
nmol Fe/mg	5 µg/cm ²			0,1	+	IP +	0
Krok., vorbehandelt ^a	5 µg/cm ²			~0,01	I		
MMVF21, 121 nmol	2 µg/cm ²			0,04	+	- HNI	ç
Fe/mg	5 µg/cm ²			0,08	+	IP +	٧
MMVF21, vorbehandelt ^a	5 µg/cm ²			~0,01	I		
Chrysotil UICC, 69 nmol Fe/mg	5 µg/cm ²			~0,01	I	+ dl + HNI	3
RCF1, 10 nmol Fe/mg	5 µg/cm ²			~0,01	I	+ dl + HNI	7
Kontrolle				~0,01			
a mit Docforriovonia		Mobilicion	don Eicone)				

mit Desferrioxamin und Ferrozin (zur Mobilisierung des Eisens)

I. (2004)
it al
Kováčiková e
on l
Gentoxizität v
/ersuche zur
In-vitro-\
Stäube:
Faserförmige
Tab. 3.35

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Re	ferenz
	Masse	F-zahl		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsysten	n; Messgröße/	Beobachtunç	j; Autor(en)				
Comet-Assay, Behandlun "DNA damage"; Kováčikc	ıgsdauer 24 h; . vvá et al. (2004)	Alveolarmakrc	ophagen und Typ	-II-Zellen (Primär	kultur von mä	innl. Fischer	· 344-Ratten);
Wollastonit	15 µg/cm ²			78,3 / 104,6	+ / +	- dl - HNI	0-1
Amosit	15 µg/cm ²			122,2 / 97,5	+/+	+ dl + HNI	3
Rock wool	15 µg/cm ²			96,9 / 96,5	+ / +	+ dl - HNI	2
Glass fibres	15 µg/cm ²			77,5 / 62	+/+	+ dl - HNI	2
Die Angaben in den Spalt ("DNA damage") für die D der jeweiligen Kontrolle (2	ten für Gentoxiz losen 0, 1, 5, 10 Å 15-0), diese M	ität beziehen) und 15 µg/cr /erte sind hier	sich auf die beide n ² angegeben, au als Maß der Wirl	en Zelltypen; von ußerdem die Diffe kungsstärke in ur	den Autoren : erenz zwische ısere Tabelle	sind jeweils en der 15 µg übernomme	Zahlenwerte -Dosis und en.

Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität von Murata-Kamiya et al. (1997; Abkürzungen siehe S. 4) Tab. 3.36

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Rei	ierenz
	Masse	F-zahl		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem	n; Messgröße/	Beobachtunç	g; Autor(en)				
Bildung von 8-Hydroxydes er 18 h; Retikulumzellsarl	soxyguanosin (8 kom-Linie J774	3-OH-dG, nac 8-OH-dG pr	h HPLC elektroch o 10 ⁵ dG; Murati	nemisch gemess a-Kamiya et al. (1	en und quantil 1997)	fiziert), Beha	andlungsdau-
Krokydolith, L 1,3, D 0,2	100 µg/mL			1,04 ± 0,05	+	+ HNI + HI	3
Amosit, L 2,7, D 0,32	100 µg/mL			1,89 ± 0,18	+	+ HNI + HI	3
Chrysotil, L 0,7, D 0,085	100 µg/mL			0,75 ± 0,16	I	+ HNI + HI	3
Keramikfasern, L 29,5, D 1,92	100 µg/mL			0,23 ± 0,03	I	+ HNI + HI	2
Glasfasern, L 12,8, D 0,54	100 µg/mL			0,28 ± 0,01	I	- HNI - H	2
Kaliumoktatitanatfasern, L 2,8, D 0,41	100 µg/mL			0,33 ± 0,06	I	INH (-) IP +	3
Kontrolle				0,56 ± 0,02			

(Fortsetzung)
r Gentoxizität
-Versuche zu
stäube: In-vitro
Faserförmige S
Tab. 3.36

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Rei	ferenz
	Masse	F-zahl		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem	ı; Messgröße/	Beobachtunç	₿; Autor(en)				
Bildung von Tumornekros rata-Kamiya et al. (1997)	efaktor alpha (1	INF_{lpha}), Behan	dlungsdauer 18 h	ı; Retikulumzells	arkom-Linie J	1774; TNF (ng/mL); Mu-
Krokydolith, L 1,3, D 0,2	100 µg/mL			2,81 ± 1,52	I	+ HNI + HI	3
Amosit, L 2,7, D 0,32	100 µg/mL			2,13 ± 1,37	I	+ HNI HP +	3
Chrysotil, L 0,7, D 0,085	100 µg/mL			3,99 ± 0,81	+	+ HNI HP +	3
Keramikfasern, L 29,5, D 1,92	100 µg/mL			3,47 ± 2,06	I	+ HNI HP +	2
Glasfasern, L 12,8, D 0,54	100 µg/mL			3,65 ± 1,51	I	- HNI IP +	2
Kaliumoktatitanatfasern, L 2,8, D 0,41	100 µg/mL			3,87 ± 1,16	I	-) HNI HD +	3
Kontrolle				1,15 ± 0,59			

Auch die Ergebnisse von Murata-Kamiya et al. (1997) müssen mit Blick auf die statistische Bewertungsmethode interpretiert werden. Die Autoren haben die Bildung von 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OH-dG) und von Tumornekrosefaktor (TNF) nach Exposition einer Zelllinie gegenüber verschiedenen faserförmigen Stäuben bestimmt (Tab. 3.36). Die Daten wurden mittels t-Test für gepaarte Stichproben analysiert, das Signifikanzniveau wurde bei 5 % angesetzt. Die 8-OH-dG-Bildung war nur bei Krokydolith und Amosit statistisch signifikant erhöht. Dabei war aber die Effektausprägung relativ zum Kontrollwert nicht sehr hoch, beim krokydolith handelte es sich nur um ungefähr eine Verdopplung des Wertes. In Relation dazu scheint die Streuung der Messwerte, unabhängig von der Behandlung, relativ stark. Denn z. B. bei den Keramikfasern war der 8-OH-dG-Messwert ebenfalls um einen Faktor 2 von der Kontrolle verschieden, aber nach unten. Hier ist also ein relativ geringes "Auflösungsvermögen" des Testmodells festzustellen. Bezüglich der TNF-Bildung schreiben die Autoren: "the level of TNF produced by J774 cells was not different among the fibers. All the samples exposed to fibers, either natural mineral fibers or man-made mineral fibers, increased TNF production as compared with that of the control ... Among them, only in the case of chrysotile was the increase in the level of TNF statistically significant (P < 0.05)". Bei der Bewertung lassen sich diese Autoren hier in erster Linie nicht von der statistischen Signifikanz, sondern von der augenscheinlichen relativen Höhe der Effektausprägung leiten: Bei allen Staubproben ist der Messwert im Mittel um mehr als einen Faktor von 2 höher als bei der Kontrolle; wohl deshalb sprechen die Autoren davon, dass alle Proben die TNF-Produktion erhöht hätten.

Die Art der Bewertung der TNF-Bildung von Murata-Kamiya et al. (1997) unterscheidet sich von der sonst üblichen Bewertungsweise (siehe z. B. auch oben, bei Cavallo et al., 2004), wonach formale statistische Signifikanz als Kriterium für ein positives oder negatives Testergebnis verwendet wird. Zumindest ein Teil des Problems einer wissenschaftlich befriedigenden Entscheidungsfindung scheint auch bei den TNF-Daten von Murata-Kamiya et al. (1997) in einem relativen geringen "Auflösungsvermögen" des Testmodells zu liegen; d. h. es muss einerseits ein relativ deutlicher Unterschied des Mittelwerts zum Kontrollwert vorliegen, um statistische Signifikanz zu erreichen, und andererseits wird auch mit den am stärksten wirksamen Proben keine deutlich stärkere Effektausprägung als mit den schwächer (aber signifikant) wirksamen Proben gefunden. Man kann hier auch von einem "kleinen Messbereich" sprechen. Im Falle der Faserproben von Murata-Kamiya et al. (1997) heißt das konkret: Angenommen, einer der Amphibolasbeste Krokydolith oder Amosit habe bezogen auf die Staubmasse die stärkste Wirksamkeit, dann wäre es mit diesem Testmodell (weder in Bezug auf 8-OH-dG noch TNF) nicht möglich, ein gegebenenfalls vorhandenes Wirkpotential einer Staubprobe nachzuweisen, die nur ein Zehntel der Wirkungsstärke des Amphibolasbests hätte. In der Praxis wäre aber die Karzinogenität eines Stoffs durchaus relevant, auch wenn die Wirkungsstärke um einen Faktor von 10 geringer wäre als die Wirkungsstärke von Blauasbest.

Pelin et al. (1995) berichten ihre Ergebnisse mit dem Mikronucleus-Test in Form einer umfangreichen Tabelle. Sie haben drei verschiedene Zelltypen benutzt: eine menschliche Mesothelzell-Linie, primäre Mesothelzellen und Ratten-Leberepithel-Zellen. In der großen Tabelle der Publikation sind differenziert nach den Zelltypen, nach den Staubproben und den Dosen wiederum differenziert jeweils die Zahlen von Zellen mit 1 Nucleus, mit 2, 3 und mit mehr als 3 Nuclei aufgeführt. Werte, die gemäß Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Pelin et al., 1995); Beispiel der detaillierten Datenstruktur (Experiment I mit der Zell-Linie MeT-5A; siehe Tab. 3.38). Tab. 3.37

Probe	Dosis		Anz	ahl Zell	en mit <i>n</i>	Nuclei		Prozentsatz	Steigung	Mittlere
	[µg/cm ²]	7	2	3	> 3	> 0 (d. h. alle Zellen)	>1	Zellen mit > 1 Nuclei	[% pro µg/cm²]	Steigung [% pro µg/cm²]
Kontrolle		1805	164	19	12	2000	195	9,8		
	0,5	1648	305	31	16	2000	352	17,6	15,7	
Chrysotil	1,0	1588	360	32	20	2000	412	20,6	10,9	11
	2,0	1506	414	47	33	2000	494	24,7	7,5	
	0,5	1705	241	37	17	2000	295	14,8	10,0	
Krokydolith	1,0	1617	303	53	27	2000	383	19,2	9,4	10
	2,0	1331	493	100	76	2000	699	33,5	11,9	

1995)
(Pelin et al.,
Gentoxizität
ersuche zur
In-vitro-V
Stäube:
Faserförmige
Tab. 3.38

Substanz	Dos	is	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Re	ferenz
	µg/cm²	F-zahl		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem); Messgröße/	Beobachtunç	g; Autor(en)				
Multinucleus-Assay, Beha und > 3 Nuclei unter ca. 2	Indlungsdauer	48 h; immorta ten Zellen; P€	llisierte menschlid elin et al. (1995)	che Mesothelzell-	Linie MeT-5A	; Anzahl Ze	llen mit 2, 3
Chrysotil, Experiment I	0,5-2,0			11	÷		
Krokydolith, Exp. I	0,5-2,0		non-toxic	10	+	+ HNI	c
Chrysotil, Exp. II	0,5-1,0		bis 1 µg/cm²	ω	+	+ 4	o
Krokydolith, Exp. II	0,25-1,0			10	+		
Glaswolle, dünn, Exp. III	1,0-5,0			2	+	- HNI	° r
Steinw., dünn, Exp. III	1,0-5,0			7	+	+ 	C-7
Glasw., gemahlen, E.IV	1,0-5,0			0,2	(+)		C
Steinw., gemahlen, E.IV	1,0-5,0			0,6	(+)	-/+ _	. .
TiO ₂ , Exp. IV	1,0-5,0		<i>non-toxic</i> bis 1 µg/cm²	0,2	+	+ HNI - GI	۲
Kontrolle, Exp. I				9,8 %			
Kontrolle, Exp. II				8,6 %			
Kontrolle, Exp. III				5,4 %			
Kontrolle, Exp. IV				6,6 %			
Die Spalte "Gentoxizität" Kern pro µg/cm² (als Ausv satz an Zellen mit mehr al	enthält hier bei wertung der um s 1 Kern angeg	den Staubprol fangreichen T jeben.	ben die mittlere Z abellen der Auto	unahme des Pro: ren; siehe Text); l	zentsatzes an oei den Kontro	ı Zellen mit ı ollen ist hier	mehr als 1 der Prozent-

(Fortsetzung)
Gentoxizität
-vitro-Versuche zur
Faserförmige Stäube: In
Tab. 3.38

Substanz	Dos	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Re	ferenz
	µg/cm ²	F-zahl		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem	; Messgröße/	Beobachtung	3; Autor(en)				
Multinucleus-Assay, Beha ca. 2000 ausgezählten Ze	andlungsdauer	48 h; mensch I. (1995)	liche primäre Me	sothelzellen; An:	zahl Zellen mi	t 2, 3 und >	3 Nuclei unter
Chrysotil, Experiment I	0,5-2,0			9	+	+ HNI	ç
Krokydolith, Exp. I	0,5-2,0			2	+	+ 4	D
Glaswolle, dünn, Exp. I	1,0-5,0			1,3	+	- HNI	с с
Steinw., dünn, Exp. I	1,0-5,0			1,3	+	+ 4	C-7
Chrysotil, Exp. II	0,25-0,5		well tolerated"	7	+	+ HNI	ç
Krokydolith, Exp. II	0,25-1,0			1,4	+	+ 4	n
Glasw., gemahlen, E. II	1,0-5,0			-0,1	-	/ T	ç
Steinw., gemahlen, E. II	1,0-5,0			6'0-	-	-/+ _	. .
TiO ₂ , Exp. II	1,0-5,0			-0,3	I	- di + HNI	٢
Kontrolle I				4,3 %			
Kontrolle II				8,9 %			
Die Spalte "Gentoxizität" e Kern pro µg/cm² (als Ausv satz an Zellen mit mehr al	enthält hier bei wertung der um s 1 Kern angeg	den Staubprol fangreichen T Jeben.	ben die mittlere Z abellen der Auto	unahme des Pro ren; siehe Text);	zentsatzes an bei den Kontr	n Zellen mit i ollen ist hier	mehr als 1 der Prozent-

(Fortsetzung)
- Gentoxizität
-Versuche zui
Stäube: In-vitro
Faserförmige S
Tab. 3.38

Substanz	Dos	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Rei	ferenz
	µg/cm²	F-zahl		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem	ı; Messgröße/	Beobachtung	3; Autor(en)				
Multinucleus-Assay, Beha 1000 ausgezählten Zellen	indlungsdauer 4 ; Pelin et al. (1	48 h; Ratten-I 995)	_eberepithelzelle	n (RLE); Anzahl	Zellen mit 2, 3	3 und > 3 Nu	uclei unter ca.
Chrysotil, Experiment I	0,5-2,0			11	+	+ HNI	ç
Krokydolith, Exp. I	0,5-2,0			4	+	+ 	o
Glaswolle, dünn, Exp. I	1,0-5,0			1,0	(+)	- HNI	с с
Steinw., dünn, Exp. I	1,0-5,0			0,8	(+)	+ 	C-7
Chrysotil, Exp. II	0,5-1,0		well tolerated"	7	+	+ HNI	ç
Krokydolith, Exp. II	0,5-1,0			4	+	+ 	n
Glasw., gemahlen, E. II	1,0-5,0			0,3			c
Steinw., gemahlen, E. II	1,0-5,0			0,3		-/+ L	ς.
TiO ₂ , Exp. II	1,0-5,0			0,2	ı	- HNI	1
Kontrolle I				3,3 %			
Kontrolle II				1,6 %			
Die Spalte "Gentoxizität" e Kern pro µg/cm² (als Ausv satz an Zellen mit mehr al	enthält hier bei vertung der um s 1 Kern angeg	den Staubprol lfangreichen T jeben.	ben die mittlere Z abellen der Auto	unahme des Pro ren; siehe Text);	zentsatzes an bei den Kontr	ı Zellen mit ı ollen ist hier	nehr als 1 der Prozent-

Fisher's Exact Test signifikant von den Kontrollwerten verschieden sind, wurden dabei mit Sternchensymbolen versehen (* für p < 0,05). Für die Präsentation und Bewertung im vorliegenden Bericht habe ich diese umfangreichen Daten komprimiert, indem ich zunächst je Dosis die Zellzahlen mit 2, 3 und > 3 Nuclei addiert und dann den Prozentsatz bezogen auf die Gesamtzahl der jeweils ausgezählten Zellen berechnet habe. Eine solche Zusammenfassung erscheint berechtigt, weil die Zahl der Zellen mit mehr als 2 Nuclei relativ gering ist (der Anteil der Zellen mit 2 Nuclei unter allen mehrkernigen Zellen ist in keinem Fall geringer als 73 %, häufig keine Zellen mit mehr als 3 Kernen) und weil aus der Arbeit keine besondere Bedeutung von Zellen mit mehr als 2 Nuclei im Vergleich zu Zellen mit genau 2 Nuclei offenbar wird. Daher habe ich zur weiteren vereinfachenden und interpretierbaren Darstellung von den Werten jeder Staubdosis die entsprechenden Kontrollwerte subtrahiert und dann den Quotienten aus dem erhaltenen Prozentsatz und der Staubdosis gebildet. In Tab. 3.37 habe ich diesen Prozentsatz als "Steigung [% pro µg/cm²]" bezeichnet; zur weiteren Verdichtung habe ich dann den Mittelwert aus den "Steigungen" der einzelnen Dosen gebildet. Dieser Mittelwert ist in Tab. 3.37 als "Mittlere Steigung [% pro µg/cm²]" bezeichnet und er ist für alle Staubproben in Tab. 3.38 als "Messwert" der Gentoxizität verwendet. In der Spalte "Gentox. +/-" habe ich in Tab. 3.38 immer dann ein + (Pluszeichen) eingetragen, wenn die Autoren mindestens bei einer Dosis des jeweiligen Staubs ein signifikantes Ergebnis festgestellt haben. Ich habe das Pluszeichen in Klammern gesetzt, wenn die Signifikanz beim jeweiligen Staub nur vereinzelt bei einer Dosis bzw. einem Messwert aufgetreten ist.

Pelin et al. (1995) haben drei Zelltypen verwendet, um unter anderem erstens einen etwaigen Unterschied zwischen primären Zellen und immortalisierten Zell-Linien und zweitens einen etwaigen Empfindlichkeitsunterschied zwischen menschlichen Zellen und Zellen von Ratten zu untersuchen. Nach ihrer Diskussion sehen die Autoren offenbar dort nennenswerte Unterschiede. Gemäß der Darstellung in unserer Tab. 3.38 ist auf eher geringe Unterschiede zu schließen. In recht guter Übereinstimmung zwischen allen Ansätzen von Pelin et al. (1995) ist die Wirkungsstärke bezogen auf die Staubmasse bei den Asbesten am größten und dabei zwischen den beiden Asbestarten ähnlich. Eine Wirkung ist auch mit den beiden Typen von "dünnen" glasigen künstlichen Mineralfasern feststellbar, bezogen auf die Masse um ungefähr einen Faktor 5 niedriger als bei den Asbesten. Das Mahlen der künstlichen Mineralfaserproben reduziert ihre Wirkungsstärke soweit, dass man an die Grenze der Nachweiskraft des In-vitro-Modells kommt. Ähnliches gilt für die Probe des granulären TiO₂. Beim TiO₂ und bei den gemahlenen Fasern scheint grundsätzlich noch eine Wirkung in dem Multinucleus-Test nachweisbar, mit einer um einen Faktor von ungefähr 10 niedrigeren Wirkungsstärke als beim Asbest ist der Nachweis nicht mehr sicher reproduzierbar. Der größte in der Versuchsreihe von Pelin et al. (1995) zu findende "Steigungswert" liegt bei 15,7 % (Zellen mit mehr als 1 Kern) pro µg Staub/cm² (Chrysotil, Tab. 3.38), der kleinste signifikante Steigungswert liegt bei 0,2 % pro µg/cm² (132 zweikernige Zellen bei 5 µg/cm² gemahlene Glaswolle). Damit liegen die kleinste und größte nachgewiesene Wirkungsstärke um einen Faktor von knapp 80 auseinander. Dies ist im Vergleich mit anderen hier referierten In-vitro-Modellen zur Fasertestung ein relativ gutes "Auflösungsvermögen" des Modells. (Im Vergleich mit dem Lebenszeit-Intraperitonealtest ist es gleichwohl relativ gering. Im Intraperitonealtest wurden sowohl mit 0,01 µg Aktinolithasbest einerseits als auch mit 1000 mg relativ unbeständigen Glasfasern andererseits ohne störende sonstige Toxizität erhöhte Tumorhäufigkeiten klar nachgewiesen. Der Unterschied dieser Dosen liegt bei einem Faktor von 100.000; mit jenem In-vivo-Modell lassen sich also Wirkungsstärken differenzieren, die sich um einen Faktor von 100.000 unterscheiden können.)

Wang et al. (1999) prüften 10 Proben von künstlichen Mineralfasern mit dem Cometassay und auf strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen. Alle Proben ergaben positive Befunde (DNA-Strangbrüche und DNA-DNA-Crosslinks) im Cometassay (Tab. 3.39). Die Autoren weisen darauf hin, dass die Effekte schwächer waren als bei dem ebenfalls geprüften Chrysotil, die geringere Wirkungsstärke bezieht sich aber auf die Massendosis. Bemerkenswert ist, dass auch Wollastonit Effekte zeigte, bei den Chromosomenaberrationen z. B. stärker als die Mikroglasfasern. Wegen seiner relativ geringen Biobeständigkeit wurden mit Wollastonit bisher keine karzinogenen Effekte im Langzeit-Tierversuch nachgewiesen. Hier zeigt sich das Problem, die verschiedenen physikalisch/chemischen Einflussparameter - einschließlich der Biobeständigkeit - in einem einzelnen (Kurzzeit-)In-vitro-Modell zu erfassen.

Es ist nicht das Ziel dieses Berichts, die bisher insgesamt veröffentlichten In-vitro-Versuche zur Zytotoxizität von Stäuben vollständig darzustellen. Der Schwerpunkt liegt auf solchen In-vitro-Daten, die mit Blick auf mögliche karzinogene Wirkungen erhoben wurden. Informationen zur Zytotoxizität sind in den Tabellen 3.27 - 3.39 vor allem im Hinblick auf die Beurteilung der Gentoxizitätsdaten enthalten. Es liegt aber eine Veröffentlichung von Watanabe et al. (2002) mit Schwerpunkt allein auf Zytotoxizität vor, die gleichwohl hier mit aufgenommen wurde (Tab. 3.40). Die Arbeit erscheint deshalb besonders interessant, weil dort eine faserförmige und eine granuläre Variante von Titandioxid geprüft wurden. Es war mir bisher nicht bekannt, dass Fasern aus Titandioxid hergestellt werden. In dem Versuch wurden zwei Proben eines chemisch definierten Materials relativ einfacher Elementzusammensetzung verwendet, die als chemisch sehr ähnlich anzusehen sind. Die Reinheit betrug bei beiden Proben mehr als 99 %, bei der faserigen Variante war sie höher als bei der granulären. Watanabe et al. (2002) fanden zwischen den Proben einen deutlichen Unterschied in der LDH-Freisetzung von Alveolarmakrophagen, insofern als bei den verwendeten Dosen nur die faserförmige TiO₂-Variante Zytotoxizität zeigte.

1999)
(Wang et al.,
Gentoxizität
ersuche zur
: In-vitro-V
e Stäube
Faserförmig
ab. 3.39

Tab. 3.39 Faserförmige Stäube:	In-vitro-Versuche	zur Gentoxizität	(Wang et al., 1999	()		
Substanz	Dosis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refei	renz
	[µg/mL] / [µg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem; Messg	röße/Beobachtuı	ng; Autor(en)				
Comet-Assay (Single-cell gel electr Quotient Schweiflänge/Gesamtläng	ophoresis, SCGE) le; Wang et al. (1), Behandlungsda 999)	auer 1 h; menschli	che Lungenel	pithelzell-Linie	A549;
Chrysotil UICC	200 / 40		0,60	+	INH+,IP+	3
Glass wool GW1	200 / 40		0,32	+	INH-, IP+	2
Rock wool RW1	200 / 40		0,27	+	INH-, IP+	2
Micro glass fiber MG1	200 / 40		0,48	+	INH+,IP+	3
Refractory (ceramic) fiber RF1	200 / 40		0,33	+	INH+,IP+	3
Refractory (ceramic) fiber RF2	200 / 40		0,42	+	INH+,IP+	3
Refractory (mullite) fiber RF3	200 / 40		0,45	+	ć	ذ
Kaliumtitanatwhisker PT1	200 / 40		0,55	+	INH(-), IP+	3
Siliziumkarbidwhisker. SC1	200 / 40		0,50	+	INH+, IP+	3
Titanoxidwhisker TO1	200 / 40		0,47	+	ć	ذ
Wollastonit WO1	200 / 40		0,47	+	INH-, IP -	0-1
Kontrolle			0,13			

\sim	
9; Fortsetzung	
g et al., 199	
zität (Wanç	
zur Gentoxi	
: In-vitro-Versuche z	
Faserförmige Stäube	
Tab. 3.39	

		-				
Substanz	Dosis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refei	enz.
	[µg/mL] / [µg/cm ²]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem; Messgi	röße/Beobachtuı	ng; Autor(en)				
Comet-Assay auf DNA-DNA-crosslii menschliche Lungenepithelzell-Linie	nks (kombinierte l e A549; Quotient	Behandlung mit N Schweiflänge/Ge	Methylmethansulph ssamtlänge; Wang	onat, MMS), I et al. (1999)	Behandlungsd	auer 1 h;
Chrysotil UICC	200 / 40		0,51	+	HHH,IP+	с
Glass wool GW1	200 / 40		0,67	+	INH-, IP+	7
Rock wool RW1	200 / 40		0,57	+	INH-, IP+	7
Micro glass fiber MG1	200 / 40		0,57	+	INH+,IP+	с
Refractory (ceramic) fiber RF1	200 / 40		0,62	+	HH+,IP+	S
Refractory (ceramic) fiber RF2	200 / 40		0,65	+	HH+,IP+	£
Refractory (mullite) fiber RF3	200 / 40		0,58	+	ć	ż
Kaliumtitanatwhisker PT1	200 / 40		0,55	+	INH(-), IP+	S
Siliziumkarbidwhisker. SC1	200 / 40		0,56	+	INH+, IP+	S
Titanoxidwhisker TO1	200 / 40		0,59	+	ذ	ذ
Wollastonit WO1	200 / 40		0,63	+	INH-, IP -	0-1
Kontrolle / MMS			0,13 / 0,74			

<u>g</u>
n
etz
rts
БO
Ó
66
~
<u>ש</u>
et
p
/ar
S
ät
<u>izi</u>
ŏ
ent
Q
Ľ
N (1)
ç
su
/er
~
itro
Ę
=
lbe
äu
Ś
ge
Ē
ĝ
Ser
ğ
-
~
ы. С
ς. Έ
ab
F

Substanz	Dosis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refer	enz
	[µg/mL]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem; Messgi	röße/Beobachtuı	ng; Autor(en)				
Chromosomenaberrationen (lichtmil zentsatz von Zellen mit Chromosom	kroskopisch), Beh ienaberrationen (andlungsdauer 2 strukturell und nu	24 h; menschliche (imerisch); Wang et	embryonale L t al. (1999)	ungenzellen (I	HEL); Pro-
Chrysotil UICC	2,5 / 5,0		6 / 22	+	INH+,IP+	3
Glass wool GW1	2,5 / 5,0		2/6	-	INH-, IP+	2
Rock wool RW1	2,5 / 5,0		2/5	-	INH-, IP+	2
Micro glass fiber MG1	2,5 / 5,0		4/9	+	INH+,IP+	3
Refractory (ceramic) fiber RF1	2,5 / 5,0		1/5	-	INH+,IP+	с
Refractory (ceramic) fiber RF2	2,5 / 5,0		5 / 13	+	INH+,IP+	3
Refractory (mullite) fiber RF3	2,5 / 5,0		4 / 10	+	ذ	ċ
Kaliumtitanatwhisker PT1	2,5 / 5,0		3/9	+	INH(-), IP+	3
Siliziumkarbidwhisker. SC1	2,5 / 5,0		8 / 16	+	INH+, IP+	3
Titanoxidwhisker TO1	2,5 / 5,0		3/9	+	ذ	ć
Wollastonit WO1	2,5 / 5,0		4 / 12	+	INH-, IP -	0-1
Kontrolle			7			

Faserförmige Stäube: In-vitro-Versuch zur Zytotoxizität (Watanabe et al., 2002) Tab. 3.40

Substanz	Dosis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Zytotox.	Rei	erenz
	[Jug/mL]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsysten	n; Messgröße/Beobachtun	g; Autor(en)				
Freisetzung von Laktatde (frisch gewonnen durch B Angabe in Prozent von <i>"t</i> c	hydrogenase (LDH), Behand AL nach Entbluten der Tiere) <i>ital LDH</i> "; Watanabe et al. (2	lungsdauer 18 h; ; LDH-Aktivität ir 2002)	Alveolarmakropl 50 µL zellfreiem	nagen männli Überstand na	cher F344/N ach Triton X	-Ratten -100-Lyse,
TiO ₂ , faserförmig, Ja-	20	16		I		
Research Association,	40	20		+		
99,790 % Keinneit, L 5,46 µm, D 0,70 µm	09	25		+		
TiO ₂ , granulär, Titan	20	13		I		
9,328 % Reinheit, D	40	12		I		
1,8 µm	60	12		I		
Kontrolle		13				

Im Gegensatz zu Watanabe et al. (2002) vermuten manche Autoren eine wesentliche Bedeutung bestimmter Ionen, insbesondere Eisen (Fe), für die Toxizität bzw. Karzinogenität von Asbest bzw. faserförmigen Stäuben, z. B. Howden und Faux (1996; Tab. 3.34). Eine besondere Gelegenheit, entsprechende In-vitro-Ergebnisse mit Invivo-Daten zu vergleichen, bietet eine Versuchsreihe von Costa et al. (1989) und Pezerat et al. (1989). Es handelt sich dort um eine spezielle (zellfreie) In-vitro-Methode zur Bestimmung der Freisetzung reaktiver Spezies (Radikalbildung). Die Hypothese hinter den In-vitro-Versuchen war seinerzeit, dass in der Oberflächenschicht der festen Phase gebundenes Eisen für Valenzwechsel zur Verfügung steht und in der Art einer Fenton-Reaktion Hydroxylradikale im biologischen Gewebe freigesetzt werden können. Für die zellfreien Versuche, die Costa et al. (1989) im Zusammenhang mit dieser Hypothese durchführten, wurden 5,5'-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) und Natriumformiat verwendet. Das entstehende Radikaladdukt (DMPO, CO₂-)' wurde über die Signalintensität in ESR-Spektren quantifiziert. Mit dieser Methode wurden mehrere eisenhaltige Mineralien bzw. Gesteinsproben untersucht, im Hinblick auf die erhöhten Lungenkrebsrisiken im Lothringischen Eisenerz-Bergbau auch Proben aus französischen Bergwerken. Die Intensität des Signals von (DMPO, CO₂-) wurde als Maß der radikalbildenden Aktivität der Probe betrachtet (das Mahlen von 45 mg Probe und das sofortige Einbringen in das Reaktionsgefäß bezeichneten die Autoren dabei als typische Verfahrensweise).

Die besondere Vergleichbarkeit mit In-vivo-Daten ergibt sich dabei aus dem Umstand, dass nach meinen Recherchen mit dieser Methode etliche Stäube untersucht wurden, die sehr ähnlich waren Stäuben, die im intraperitonealen Karzinogenitätstest untersucht worden waren, wobei es sich teilweise sogar um die identischen Stäube gehandelt haben kann (Austausch von Proben zwischen F. Pott und H. Pezerat). Die Daten der Stäube, für die aus beiden Versuchsmodellen Ergebnisse vorlagen, sind in Tab. 3.41 zusammengestellt. Bei den In-vitro-Versuchen wurden 5,5'-Dimethyl-1pyrrolin-N-oxid (DMPO) und Formiat benutzt; es wurde das Radikaladdukt (DMPO, CO₂-)' gemessen und in willkürlichen Einheiten im Bereich von 0 bis etwa 2000 angegeben. In den Karzinogenitätsversuchen wurde nach Lebenszeit-Bobachtung die Häufigkeit von Mesotheliomen/Sarkomen im Bauchraum von Wistar-Ratten ausgewertet (Tab. 3.4). Für beide Versuchsmodelle sind quantitative Angaben zur Wirkungsstärke der Stäube vorhanden, daher kann eine Korrelationsanalyse der Wirkungsstärken vorgenommen werden. Abb. 3.5 zeigt ein Korrelationsdiagramm für die In-vitro- und In-vivo-Daten von Tab. 3.41.

Tab. 3.41 Vergleich von Versuchen zur Radikalbildung durch eisenhaltige Stäube und durch Kontrollstäube im zellfreien System (Costa et al., 1989; Pezerat et al., 1989) mit Ergebnissen von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer Injektion bei Ratten (Tab. 3.4).

Staub	Karzinog	enität intraj	peritoneal	Radik	albildung ii	n vitro
	Potenz i.p. (% pro µg) ^a	Ergebnis semi- quanti- tativ	Potential ^b i.p.	Mittelwert, dimensi- onsloses Effektmaß	Ergebnis semi- quanti- tativ	Potential ^b in vitro
Chrysotil UICC/B	0,667	++	1	900	++	1
Erionit, Oregon	0,0968	++	1	32,5	-	0
Glasfasern JM104/475	0,0333	++	1	32,5	-	0
Nemalith	0,0378	++	1	1600	++	1
Krokydolith UICC	0,0192	++	1	32	-	0
Kaliumtitanat- fasern	0,0153	++	1	7	-	0
Chrysotil UICC/A	0,0123	++	1	27,5	-	0
Amosit	0,0018	+	1	40	-	0
Quarz, DQ12	0,0005	+	1	20	-	0
Hämatit 1	0,00007	-	0	100	±	0
Magnetit 1	0,0	-	0	167,5	+	1
Chlorit	0,00005	-	0	1500	++	1
Hämatit 2	0,0	-	0	100	±	0
Hämatit 3	0,0	-	0	100	±	0
Biotit	0,0	-	0	750	++	1
Magnetit 2	0,00004	-	0	167,5	+	1
Hämatit 4	0,0	-	0	100	±	0

^a Das Potenzmaß wurde durch lineare Berechnung der Steigung vom Nullpunkt zum dosisbedingten Risiko erhalten, es gibt das Risiko pro µg injiziertem Staub an. Es sind hier jeweils die Werte der niedrigsten Dosis mit erhöhter Tumorhäufigkeit verwendet (Tab. 3.4).

^b Im Unterschied zur Potenz ist das Potential hier das Ergebnis einer dichotomisierenden Bewertung: Ja / Nein, 0 / 1. Die Empfindlichkeit einer Methode ist durch die Wahl des cut-off-Punktes zu beeinflussen; für die In-vivo-Methode ist hier die statistische Signifikanz des Tumorergebnisses als cut-off verwendet, für die In-vitro-Methode ist die Grenze des "Rauschens" bei 100 Einheiten angesetzt (Potential = 0 für Effektmaß ≤ 100, Potential = 1 für Effektmaß > 100).



Abb. 3.5 Korrelation der Ergebnisse eines zellfreien In-vitro-Modells zur Radikalbildung durch Stäube mit den Ergebnissen der intraperitonealen Karzinogenitätsprüfung dieser Stäube (Daten s. Tab. 3.41); Auftragung im doppelt-logarithmischen Maßstab, Werte von 0 für die karzinogene Potenz aus Gründen der Darstellbarkeit gleich 10⁻⁶ gesetzt. Es besteht keine signifikante Korrelation (p = 0,284).

Die Übereinstimmung in Bezug auf die positiven bzw. negativen Befunde, d. h. im "Potential", zwischen den beiden Versuchsmodellen gemäß Tab. 3.41 erscheint nicht gut. Abb. 3.5 verdeutlicht die schlechte Korrelation der Ergebnisse mit dem zellfreien Modell der Radikalfreisetzung in Bezug zur Karzinogenität der Stäube im Bauchraum von Ratten.

3.2.1.2 <u>Vergleich der Ergebnisse von In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität von</u> <u>faserförmigen Stäuben mit den Ergebnissen aus Karzinogenitäts-</u> <u>versuchen an Ratten</u>

In der Tab. 3.42 sind in Kurzform nochmals die Ergebnisse der in den Tabellen 3.27 bis 3.41 in Bezug genommenen In-vitro-Versuche zusammengefasst. Dabei ist nicht nach einzelnen Dosen differenziert, sondern es geht nur um die Ja/Nein-Antworten für die Staubproben mit Blick auf die Berechnung von Sensitivität und Spezifität. Deshalb sind in Tab. 3.42 auch nur diejenigen Staubproben berücksichtigt, für die auch Daten gleicher oder zumindest ähnlicher (äquivalenter) Stäube aus zumindest einem der beiden In-vivo-Modelle der Inhalation und der intraperitonealen Injektion vorhanden sind. Die Plussymbole in der Spalte der In-vitro-Versuche in Tab. 3.42 bedeuten, dass gemäß der Interpretation der jeweiligen Studienautoren ein Effekt nachgewiesen wurde. Die Plussymbole in den beiden Spalten der In-vivo-Versuche stützen sich zusätzlich auf die Signifikanzberechnungen, wie in Abschnitt 2.3

Tab. 3.42 Faserförmige Stäube: Vergleich von Ergebnissen aus In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität bzw. Zelltransformation mit Ergebnissen von Karzinogenitätsversuchen mit Inhalation und mit intraperitonealer Injektion bei Ratten.

In-vitro-Testmodell,	Staub	Er	gebnis +	/_
Prüfsystem, Autor(en)		in vitro	in v	'ivo
			Inhal.	i.p.
Transformationstest,	Chrysotil	+	+	+
Syrian hamster embryo	Krokydolith	+	+	+
und Barrett (1984)	Chrysotil 2. Exp.	+	+	+
	Quarz	+	+	+
	Glasfasern Code 100 Exp. 1	+	+	+
	Glasfasern Code 100 Exp. 2	+	+	+
	Glasfasern Code 100 Exp. 3	+	+	+
	Glasfasern Code 110 Exp. 3	+	-	+
Transformationstest,	Chrysotil	+	+	+
Syrian hamster epithe-	Krokydolith	+	+	+
Riebe-Imre et al. (1994)	Erionit	+	+	+
	Glasf. JM	-	+	+
	Glasf. B1	-	-	+
	Glasf. B3	-	n.g.	-
	SiC	+	+	+
	TiO ₂ granulär	-	+	-
	NiO granulär	+	+	+
	Nickel granulär	+	n.g.	+
Transformationstest,	Chrysotil	+	+	+
mesothelial cells from	Krokydolith	+	+	+
Wistar rats (RaD/C1),	Erionit	+	+	+
Riebe-Imre et al. (1994)	Glasf. JM	+	+	+
	Glasf. B-1	+	-	+
	Glasf. B-3	+	n.g.	-
	SiC	-	+	+
	TiO ₂ granulär	-	+	-
	NiO granulär	-	+	+
	Nickel granulär	+	n.g.	+

Tab. 3.42Faserförmige Stäube: Vergleich von Ergebnissen aus In-vitro-Ver-
suchen mit Ergebnissen von Karzinogenitätsversuchen (Fortsetzung).

In-vitro-Testmodell,	Staub	Er	gebnis +/-	
Prüfsystem, Autor(en)		in vitro	in v	'ivo
			Inhal.	i.p.
Induktion von c-fos- und	Krokydolith	+	+	+
c-jun-Proto-Onkogenen, Ratten-Pleurameso-	MMVF10	-	-	+
theliomzellen (RPM),	RCF1	-	+	+
Janssen et al. (1994)	Erionit	+	+	+
Comet-Assay, mensch-	Krokydolith	-	+	+
liche Mesothelzell-Linie	Glass wool	-	-	+
(2004)	Rock wool	-	-	+
	Danish rock wool	-	_	+
	Refractory ceramic fibers	+	+	+
Comet-Assay mit Fpg-	Krokydolith	+	+	+
Enzymbehandlung, menschl. Mesothelzell- Linie MeT-5A, Cavallo et al. (2004)	Glass wool	-	-	+
	Rock wool	+	-	+
et al. (2004)	Danish rock wool	-	-	+
	Refractory ceramic fibers	-	+	+
Analyse Thiobarbitur-	Krokydolith	+	+	+
säure-reaktiver Sub- stanzen menschl Me-	Glass wool	-	-	+
sothelzell-Linie MeT5A,	Rock wool	+	-	+
Cardinali et al. (2006)	Danish rock wool	+	-	+
Vitamin E-Analyse,	Krokydolith	+	+	+
menschliche Mesothel-	Glass wool	+	-	+
dinali et al. (2006)	Rock wool	+	-	+
	Danish rock wool	+	-	+
ROS-Bildung – Fluores-	Krokydolith	+	+	+
zenz-Assay, menschl.	Glass wool	-	-	+
MeT5A, Cardinali et al.	Rock wool	+	-	+
(2006)	Danish rock wool	+	-	+

Tab. 3.42Faserförmige Stäube: Vergleich von Ergebnissen aus In-vitro-Ver-
suchen mit Ergebnissen von Karzinogenitätsversuchen (Fortsetzung).

In-vitro-Testmodell,	Staub	Er	gebnis +/	-
Prüfsystem, Autor(en)		in vitro	in v	ivo
			Inhal.	i.p.
BrdU-Inkorporation,	Krokydolith	+	+	+
menschliche Mesothel-	Glass wool	-	-	+
dinali et al. (2006)	Rock wool	-	-	+
	Danish rock wool	-	-	+
Bildung fluoreszieren-	Krokydolith	+	+	+
der DNA-Addukte, Rat-	MMVF21	+	-	+
Linie RFL-6, Howden u.	Chrysotil	-	+	+
Faux (1996)	RCF1	-	+	+
Comet-Assay, Alveolar-	Wollastonit	+	-	-
makrophagen (von	Amosit	+	+	+
Ratten), Kováčiková et	Rock wool	+	-	+
al. (2004)	Glass fibres	+	-	+
Comet-Assay, Typ-II- Zellen (von männl. Fi- scher 344-Ratten), Ko- váčiková et al. (2004)	Wollastonit	+	-	-
	Amosit	+	+	+
	Rock wool	+	-	+
	Glass fibres	+	-	+
Bildung von 8-	Krokydolith	+	+	+
Hydroxydesoxyguano-	Amosit	+	+	+
Hydroxydesoxyguano- sin (8-OH-dG), Retiku- lumzellsarkom-Linie	Chrysotil	-	+	+
J774, Murata-Kamiya et	Keramikfasern	-	+	+
al. (1997)	Glasfasern	-	-	+
	Kaliumoktatitanatfasern	_	-	+
Bildung von Tumor-	Krokydolith	_	+	+
nekrosefaktor alpha	Amosit	-	+	+
zellsarkom-Linie J774,	Chrysotil	+	+	+
Murata-Kamiya et al.	Keramikfasern	_	+	+
(1997)	Glasfasern	_	-	+
	Kaliumoktatitanatfasern	-	-	+

Tab. 3.42	Faserförmige	Stäube:	Vergleich	von	Ergebnissen	aus	In-vitro-Ver-
	suchen mit Erg	gebnisser	n von Karzii	noger	nitätsversuche	n (Fo	rtsetzung).

In-vitro-Testmodell,	Staub	Er	gebnis +/	-
Prüfsystem, Autor(en)		in vitro	in v	ivo
			Inhal.	i.p.
Multinucleus-Assay,	Chrysotil Exp. I	+	+	+
menschliche Mesothel-	Krokydolith Exp. I	+	+	+
et al. (1995)	Chrysotil Exp. II	+	+	+
	Krokydolith Exp. II	+	+	+
	Glaswolle dünn Exp. III	+	-	+
	Steinw. dünn Exp. III	+	-	+
	TiO ₂ Exp. IV	+	+	-
Multinucleus-Assay,	Chrysotil Exp. I	+	+	+
menschliche primäre Mesothelzellen, Pelin et	Krokydolith Exp. I	+	+	+
al. (1995)	Glaswolle dünn Exp. I	+	-	+
	Steinw. dünn Exp. I	+	-	+
	Chrysotil Exp. II	+	+	+
	Krokydolith Exp. II	+	+	+
	TiO ₂ Exp. II	-	+	-
Multinucleus-Assay,	Chrysotil Exp. I	+	+	+
Ratten-Leberepithel-	Krokydolith Exp. I	+	+	+
(1995)	Glaswolle dünn Exp. I	+	-	+
	Steinw. dünn Exp. I	+	-	+
	Chrysotil Exp. II	+	+	+
	Krokydolith Exp. II	+	+	+
	TiO ₂ Exp. II	-	+	-
Comet-Assay, mensch-	Chrysotil	+	+	+
liche Lungenepithelzell-	Glass wool	+	-	+
(1999)	Rock wool	+	-	+
	Micro glass fiber	+	+	+
	Refractory (ceramic) fiber 1	+	+	+
	Refractory (ceramic) fiber 2	+	+	+
	Kaliumtitanatwhisker	+	-	+
	Siliziumkarbidwhisker	+	+	+
	Wollastonit	+	_	-

Tab. 3.42	Faserförmige	Stäube:	Vergleich	von	Ergebnissen	aus	In-vitro-Ver-
	suchen mit Erg	gebnisser	n von Karzii	noger	nitätsversuche	n (Fo	rtsetzung).

In-vitro-Testmodell,	Staub	Er	gebnis +/-		
Prüfsystem, Autor(en)		in vitro	in v	in vivo	
			Inhal.	i.p.	
Comet-Assay auf DNA-	Chrysotil	+	+	+	
DNA-crosslinks (kombi-	Glass wool	+	-	+	
Methylmethan-	Rock wool	+	-	+	
sulphonat, MMS),	Micro glass fiber	+	+	+	
epithelzell-Linie A549,	Refractory (ceramic) fiber 1	+	+	+	
Wang et al. (1999)	Refractory (ceramic) fiber 2	+	+	+	
	Kaliumtitanatwhisker	+	-	+	
	Siliziumkarbidwhisker	+	+	+	
	Wollastonit	+	-	-	
Chromosomen-	Chrysotil	+	+	+	
aberrationen (lichtmik- roskopisch), menschl. embryonale Lungenzel-	Glass wool	-	-	+	
	Rock wool	-	-	+	
len (HEL), Wang et al.	Micro glass fiber	+	+	+	
(1999)	Refractory (ceramic) fiber 1	-	+	+	
	Refractory (ceramic) fiber 2	+	+	+	
	Kaliumtitanatwhisker	+	-	+	
	Siliziumkarbidwhisker +		+	+	
	Wollastonit	+	-	-	

Tab. 3.42Faserförmige Stäube: Vergleich von Ergebnissen aus In-vitro-Ver-
suchen mit Ergebnissen von Karzinogenitätsversuchen (Fortsetzung).

In-vitro-Testmodell,	Staub	Ergebnis +/-		/-	
Prüfsystem, Autor(en)		in vitro	in v	in vivo	
			Inhal.	i.p.	
Radikalbildung, zellfrei,	Chrysotil UICC/B	+	+	+	
Costa et al. (1989), Pe-	Erionit	-	+	+	
	Glasfasern JM104/475	-	+	+	
	Nemalith	+	n.g.	+	
	Krokydolith	-	+	+	
	Kaliumtitanatfasern -		-	+	
	Chrysotil UICC/A -		+	+	
	Amosit	- +		+	
	Quarz DQ12	-	+	+	
	Hämatit 1	-	n.g.	-	
	Magnetit 1	+	n.g.	-	
	Chlorit	+	n.g.	-	
	Hämatit 2	-	n.g.	-	
	Hämatit 3	-	n.g.	-	
	Biotit	+	n.g.	-	
	Magnetit 2	+	n.g.	-	
	Hämatit 4	-	n.g.	-	

Tab. 3.43 Faserförmige Stäube: Sensitivität und Spezifität von Ergebnissen aus In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität bzw. Zelltransformation mit Ergebnissen von Karzinogenitätsversuchen mit Inhalation bei Ratten. Man beachte: Die Zahlen besitzen nur sehr eingeschränkte Aussagekraft (siehe Text).

Anzahl untersuchter Staubproben	positiv in vivo (Inhalation)	negativ in vivo (Inhalation)	Summe	
positiv in vitro	58	33	91	
negativ in vitro	24 19		43	
Summe	82 52		134	
Sensitivität in vitro	58 / 82 = 70,7 %			
Spezifität in vitro	19 / 52 = 36,5 %			
Konkordanz in vitro	(58 + 19) / 134 = 57,5 %			

Tab. 3.44 Faserförmige Stäube: Sensitivität und Spezifität von Ergebnissen aus In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität bzw. Zelltransformation mit Ergebnissen von Karzinogenitätsversuchen mit intraperitonealer (i.p.) Injektion bei Ratten.

Anzahl untersuchter Staubproben	positiv in vivo (i.p.)	negativ in vivo (i.p.)	Summe	
positiv in vitro	88	11	99	
negativ in vitro	/itro 39 9		48	
Summe	127 20		147	
Sensitivität in vitro	88 / 127 = 69,3 %			
Spezifität in vitro	9 / 20 = 45,0 %			
Konkordanz in vitro	(88 + 9) / 147 = 66,0 %			

beschrieben. Die Abkürzung "n.g." (nicht geprüft) in Tab. 3.42 bedeutet, dass keine geeigneten Daten aus dem jeweiligen Modell vorliegen. Die Tab. 3.43 enthält die Ergebnisse einer Berechnung von Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Test zur Frage

der Gentoxizität faserförmiger Stäube unter Bezug auf Inhalationsversuche mit Ratten. Entsprechend sind die Ergebnisse unter Bezug auf Karzinogenitätsversuche mit intraperitonealer Injektion bei Ratten in Tab. 3.44 aufgeführt. Beides sind formale statistische Aussagen.

Wichtig: Die Ergebnisse der Tab. 3.43 sollten keinesfalls als aussagekräftige Information über die Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Gentoxizität hinsichtlich des Krebsrisikos des Menschen fehlinterpretiert werden. Nach der Gesamtheit der bekannten Information, wie bereits in Abschnitt 2.2 erläutert, ist eine solche Aussage über die Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Gentoxizität hinsichtlich des Krebsrisikos des Menschen aus einem Vergleich mit den Ergebnissen von Inhalationsversuchen an Ratten nicht möglich. Dies lässt sich unter anderem und besonders am Beispiel des Asbests verdeutlichen. Die gesetzlichen Unfallversicherungen der Arbeitgeber in Deutschland - die so genannten Berufsgenossenschaften - haben anerkannt, dass eine 25jährige Exposition am Arbeitsplatz mit einer Asbestkonzentration von durchschnittlich 1 F/mL zu einer Verdoppelung des Lungenkrebsrisikos bei Männern führen kann (HVBG, 1994). Eine Verdoppelung des Lungenkrebsrisikos bei Männern entspricht einem zusätzlichen expositionsbedingten Lungenkrebsrisiko in Höhe von 4 bis 8 % (Erläuterungen bei Roller, 2006, 2008) - hier also assoziiert mit einer Asbestkonzentration am Arbeitsplatz von 1 F/mL. Dagegen hat eine inhalative Exposition von Ratten über einen Zeitraum (10 Monate), der bezogen auf die Lebenserwartung ungefähr 25 Jahren beim Menschen entspricht, gegenüber einer Asbestkonzentration von 1600 F/mL nur zu einem zusätzlichen Krebsrisiko von 14 % geführt (McConnell et al., 1995). Es handelte sich dabei um einen besonders langfaserigen - und damit besonders "potenten" - Krokydolithasbest. Aufgrund der Gesamtheit der Ergebnisse aus Inhalationsversuchen an Ratten ist nicht zu erwarten, dass Asbestkonzentrationen von 1 oder 10 F/mL bei Ratten überhaupt zu einem erkennbar erhöhten Lungenkrebsrisiko führen (Pott und Roller, 1993). Bezogen auf die langfristig einwirkende Expositionskonzentration sind Ratten als weniger empfindlich gegenüber der Karzinogenität inhalierter Asbestfasern anzusehen als Menschen um mindestens einen Faktor von 100. Diese Erkenntnis wurde nach umfangreichen Beratungen auch im Arbeitskreis "Fasern und Staub" im Bereich des Ausschusses für Gefahrstoffe bestätigt (Wardenbach et al., 2005).

In den *State-of-the-art*-Versuchen der RCC wurden Expositionskonzentrationen von künstlichen Mineralfasern (KMF) im Bereich von zirka 200 F/mL eingesetzt (Tab. 3.1). Im Vergleich zu der Tumorhäufigkeit von 14 % bei 1600 Krokydolithfasern pro mL sind bei 200 F/mL keine signifikant erhöhten Tumorhäufigkeiten zu erwarten, auch dann nicht, wenn die KMF dieselbe karzinogene Potenz hätten wie Krokydolith - und bei Krokydolith ist von einer mehr als 100fach niedrigeren Empfindlichkeit der Rattenlunge im Vergleich zum Menschen auszugehen. Diese Zusammenhänge sind unbedingt bei der Interpretation der Tab. 3.43 zu berücksichtigen. Nach Tab. 3.43 ist vor allem die Spezifität der In-vitro-Tests mit nur 36 % recht schlecht. Anders ausgedrückt: Rund 65 % dieser In-vitro-Befunde scheinen nach dieser Rechnung "falschpositiv". Es liegt auf der Hand, dass ein Teil dieses Ergebnisses, darauf zurückzuführen ist, dass In-vitro-Tests mit KMF positiv waren und mit den negativen Inhalationsversuchen zu vergleichen waren.

Die Ergebnisse in Tab. 3.43 hängen stark davon ab, wieviele KMF-Proben in vitro geprüft wurden. Nach den Ergebnissen der bisherigen In-vitro-Tests ist zu erwarten,

dass relativ viele KMF-Proben auch in Zukunft positive Ergebnisse in vitro liefern werden. Bei der Berechnung der Spezifität wären diese Ergebnisse aber stets an den negativen Befunden aus den Inhalationsversuchen zu messen. Je mehr Glasfaserproben also mit In-vitro-Gentoxizitätstests geprüft werden - und je mehr positive Befunde deshalb erwartungsgemäß produziert würden, umso geringer wäre die "Spezifität" der In-vitro-Tests. Letztlich sind die Zahlen der Tab. 3.43 daher ohne vernünftigen - verallgemeinerbaren - Informationsgehalt.

Bemerkenswert ist allerdings, dass die Konkordanz der In-vitro-Ergebnisse in Bezug auf die I.p.-Versuche auch nicht deutlich besser ist als bei den Inhalationsversuchen. Die Aussagekraft der I.p.-Ergebnisse für den Menschen wird ihrerseits in der Literatur bezweifelt, sie wurde aber im Bereich des Arbeitsschutzes in Deutschland "amtlich anerkannt" (TRGS 905; auf diesen Gesichtspunkt wird in der abschließenden "Diskussion" zurückgekommen). Auch im Vergleich mit den I.p.-Daten ist die Spezifität der In-vitro-Ergebnisse nicht gut. Dies mag auch daran liegen, dass für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität nicht nur die Ergebnisse mit Faserproben verwendet wurden, sondern auch die Ergebnisse der granulären Kontrollgruppen. Granuläre Partikel ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität führen nach intraperitonealer Injektion bei Ratten in der Regel nicht zu signifikant erhöhten Tumorraten. Zu solchen Staubarten zählen z. B. verschiedene TiO₂-Stäube. Diese sind aber in der Rattenlunge karzinogen (Baan, 2007). Auch die Zahlen der Tab. 3.44 spiegeln daher nicht die Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Gentoxizitätstests in Bezug auf die Gefährdung des Menschen wider.

Ein weiterer Grund für falsch-positive Ergebnisse von In-vitro-Gentoxizitätstests kann darin liegen, dass die Tests über sehr kurze Zeiträume laufen und daher die Biobeständigkeit der Partikel nicht erfassen. Tatsächlich haben Wang et al. (1999) sowie Kováčiková et al. (2004) positive Ergebnisse mit Wollastonit erhalten. Dagegen wurde nach intraperitonealer Injektion bei Ratten mit Wollastonit keine erhöhte Tumorhäufigkeit gefunden, was mit der bekannten geringen Biobeständigkeit von Wollastonit erklärt wurde. Dementsprechend wurde Wollastonit z. B. von der MAK-Kommission nicht wie andere Faserstäube als krebserzeugend bewertet (DFG, 2009). Die Frage ist zu stellen, ob sich durch Kombination der Informationen aus Invitro-Gentoxizitätstests und In-vitro-Beständigkeitsuntersuchungen nützliche Information zur Prädiktivität der In-vivo-Gefährdung hinzugewinnen lässt. Im nächsten Abschnitt wird daher auf In-vitro-Beständigkeitsuntersuchungen eingegangen.

3.2.1.3 In-vitro-Versuche zur Biobeständigkeit von faserförmigen Stäuben

Zu Beginn der 90er Jahre stimulierte die These, dass die karzinogene Potenz faserförmiger Stäube von der Biobeständigkeit des Materials abhänge, intensivierte Forschungstätigkeiten. Man versuchte gezielt, auch mit In-vitro-Untersuchungen, insbesondere zellfrei, die In-vivo-Beständigkeit von Mineralfasern zu erfassen. Am Anfang einer Reihe von Publikationen ist dabei die Arbeit von Potter und Mattson (1991) zu sehen. Dort wurden ausführlich theoretische Grundlagen beschrieben, mit Hilfe eines zellfreien Durchfluss-Systems eine Löslichkeitsrate (*dissolution rate constant*) als eine Art relevanter Materialkonstante glasiger Fasern zu ermitteln. Diese Konstante k (in ng cm⁻² h⁻¹) wird folgendermaßen definiert:

dM/dt = k A

In dieser Differentialgleichung ist M die Masse der Fasern, t ist die Zeit und A ist die Oberflächenausdehnung der Fasern. Die Lösung dieser Differentialgleichung und die weiteren mathematischen und experimentellen Details der Ermittlung von k müssen hier nicht wiedergegeben werden. Es sei nur erwähnt, dass Potter und Mattson (1991) Werte von k für 30 Typen von Glasfasern angeben, sie reichen von 0,9 Nanogramm pro cm² Faseroberfläche pro Stunde (ng cm⁻² h⁻¹) für ein schlecht lösliches Material bis zu 886,9 ng cm⁻² h⁻¹ für ein relativ gut lösliches Material, umspannen mithin einen Bereich über drei Größenordnungen. Die Glassorten sind in der Publikation mit Zahlencodes durchnummeriert und für mich einzelnen in vivo geprüften Stäuben nicht zuordenbar. In späteren Publikationen werden aber Daten genannt, die nach den Angaben Fasertypen zuzuordnen sind, die auch im Tierversuch geprüft wurden (Tab. 3.45-3.52).

Tab. 3.45Ergebnisse von Thelohan und de Meringo (1994) zur In-vitro-Löslichkeit
künstlicher Mineralfasern in Flüssigkeit, die das extrazelluläre Milieu der
Lunge simulieren soll: Löslichkeitskonstante k in Abhängigkeit vom Ver-
hältnis Stauboberfläche/Flüssigkeitsvolumen SA/V (in Durchfluss-
Systemen seinerseits abhängig von der Flussrate, der Staubmasse und
dem Faserdurchmesser)

SA/V [cm ⁻¹ h]	Löslichkeitskonstante k [ng cm ⁻² h ⁻¹]			
	MMVF10	MMVF11	MMVF21	MMVF22
16				147
37	131			
53		46		
71		69		
182			12,1	
198	91			43
284		33		
1370			6,3	
1480	32			25
2130		22		

Anstatt der Größe, die in den englischsprachigen Publikationen als *dissolution rate constant* bezeichnet wird, was ich hier mit Löslichkeitsrate oder Löslichkeitskonstante übersetzt habe, werden in manchen Arbeiten auch andere Kenngrößen angegeben, die mit der Löslichkeitskonstante k in Verbindung stehen. So beschreiben z. B. Thelohan und de Meringo (1994) sowie Guldberg et al. (1995) die Verringerung des Durchmessers der Fasern in der Flüssigkeit und geben zusätzlich zur Konstante k
Tab. 3.46 Ergebnisse von Bauer et al. (1994) zur In-vitro-Löslichkeit künstlicher Mineralfasern in Flüssigkeiten, die das extrazelluläre Milieu der Lunge (pH 7,6) und das Milieu in Phagolysosomen (pH 4) simulieren sollen: Löslichkeitskonstante k in Abhängigkeit vom pH.

Faserart	Löslichkeitskonstante k [ng cm ⁻² h ⁻¹]				
	pH = 4	pH = 7,6			
MMVF11	3,7	85			
MMVF22	280	8,9			
RCF-1	1,4	0,31			

Tab. 3.47 Ergebnisse von Guldberg et al. (1995) zur In-vitro-Löslichkeit künstlicher Mineralfasern in Flüssigkeiten, die das extrazelluläre Milieu der Lunge (pH 7,5) und das Milieu in Phagolysosomen (pH 4,5) simulieren sollen: Bereiche für die Lösungsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit vom pH.

Faserart	Lösungsgeschwindigkeit v [nm/d]				
	pH = 7,5	pH = 4,5			
MMVF21	2 - 4	4 - 8			
MMVF11/TL	11 - 17	0,5 - 1,5			
HT-Faser	3 - 8	35 - 50			
MMVF22	20 - 25	35 - 45			
Exp. 3	120 - 140	40 - 60			
Krokydolith	0,01 - 0,05	0,01 - 0,05			

Tab. 3.48 Ergebnisse von Guldberg et al. (1995) zur In-vitro-Löslichkeit künstlicher Mineralfasern in Flüssigkeiten, die das extrazelluläre Milieu der Lunge (pH 7,5) und das Milieu in Phagolysosomen (pH 4,5) simulieren sollen: Lösungsgeschwindigkeit v und Löslichkeitskonstante k in Abhängigkeit vom pH.

Faserart	v [nr	n/d]	k [ng cm ⁻² h ⁻¹]		
	pH = 7,5	pH = 4,5	pH = 7,5	pH = 4,5	
MMVF21	3	6	33	65	
MMVF11	14	1	150	8	

Tab. 3.49Ergebnisse eines Laborvergleichs nach Zoitos et al. (1997) zur In-vitro-
Löslichkeit künstlicher Mineralfasern: Mittelwerte und Standardabwei-
chungen der Messergebnisse verschiedener Labors.

Faserart	Löslichkeitskonsta	Anzahl La- bors	
	Mittelwert Standardabw.		
MMVF10	259	75	4
MMVF11	142	39	4
MMVF21	23	11	4
MMVF22	119	41	4
RCF-1	8		1
Krokydolith	0,3	0,1	2

Tab. 3.50 Ergebnisse von Searl et al. (1999) zur In-vitro-Löslichkeit künstlicher Mineralfasern in Flüssigkeiten, die das extrazelluläre Milieu der Lunge (pH 7) und das Milieu in Phagolysosomen (pH 4,6) simulieren sollen: Lösung von Silizium in Na-Oxalat-Lösung (stationär) in Abhängigkeit vom pH sowie Löslichkeitskonstante k (Durchfluss-System, pH 7).

Faserart	% SiO₂ gelöst	k [ng cm ⁻² h ⁻¹]	
	рН 4,6	рН 7	
Amosit	0,9	1,7	
100/475	6,3	5,9	9,1
SiC	0,1	0,1	
MMVF10	30,7	15,3	122,4
MMVF21	1,6	2,8	28,9
MMVF22	51,3	52,7	52,8
RCF1	0,3	0,4	4,4
RCF2	0,2	0,4	3,1
RCF4	0,1	0,2	0,5

Tab. 3.51Zitat (Übersetzung aus dem Englischen) einer Tabelle von Hesterberg
und Hart (2000) zu einem Vergleich von Informationen über Biobestän-
digkeit und Pathogenität künstlicher Mineralfasern

Faserart	Kategorie	Elimina-	k [ng	Lungenpathogenität	
		tion in vivo WT1/2	cm ⁻ ² h ⁻ '] pH 7,4	Fibrose	Tumoren
Krokydolith	Asbest	817	<1	+	+
Amosit	Asbest	418	<1	+	+
JM E-Glas	Glasfasern f. beson- dere Anwendungen	79	9	+	+
RCF1	Keramikfasern	55	3	+	+
JM 475-Glas	Glasfasern f. beson- dere Anwendungen	49	12	+	+/-
Rock wool	Mineralwolle	67	20	+	-
JM 901-Glas (MMVF10)	Glasfasern f. Ge- bäudeisolierung	15	300	-	-
CT Glas	Glasfasern f. Ge- bäudeisolierung	9	100	-	-
Schlackenwolle	Mineralwolle	9	400	-	-
HT-Steinwolle	Mineralwolle	6	59	-	-

eine Größe an, die sie ebenfalls als *dissolution rate* bezeichnen, die aber die Einheit Nanometer pro Tag (nm/d) hat. Diese Größe v steht in folgender Beziehung zur Rate k:

k = v ρ / 0,24, mit ρ = Materialdichte der Fasern.

Searl et al. (1999) haben neben einem Durchfluss-System auch ein stationäres System benutzt, d. h. sie haben das Fasermaterial einfach in eine Natriumoxalat-Lösung gegeben und nach bestimmten Zeiten die Menge des gelösten Siliziums bestimmt. Im Hinblick auf das Verhalten glasigen Fasermaterials in physiologischen Flüssigkeiten wurden neben einem "einfachen Auflösen" auch komplexere Vorgänge beschrieben, insbesondere das so genannte *leaching*. Demnach würden aus der Materialschicht, die mit der Flüssigkeit in Berührung steht, bestimmte Ionen "herausgelaugt", ohne dass sich diese Schicht zunächst komplett auflöst. Diese Auslaugung wird als biologisch bedeutsam angesehen, weil solchermaßen "geschwächte" Fasern im Gewebe auseinanderbrechen könnten. Potter (2000) benutzt für die verschiedenen Arten der Glasfaserauflösung die Begriffe *congruently dissolving* (gleichmäßige Auflösung) und *incongruently dissolving* (Auflösung, der zunächst ein *leaching* vorausgeht).

Tab. 3.52Ergebnisse von Potter (2000) zur In-vitro-Löslichkeit künstlicher Mine-
ralfasern: Zeit [d/µm] zur Auflösung in Anhängigkeit von der Messme-
thode. Zur Bedeutung von t_{dis}, t_n, t_l sowie zur Berechnung der Löslich-
keitskonstante k siehe Text.

Probe	Bezeichnung	d₀	Dichte	optische Methode		ode
Nr.				t _{dis}		k
1	7753	11,99	2,47	5,57		923,85
2	B-01	9,52	2,60	0,76		7127,19
3	MMVF11	10,59	2,48	37,79		136,72
4	MMVF10	14,19	2,51	28,41		184,06
5	MMVF10	2,46	2,55	11,79		450,59
6	MMVF10a	2,30	2,55	13,78		385,52
39	MMVF22	7,46	2,92	17,70		343,69
40	MMVF22	1,73	2,92	76,25		79,78
				Masser	nverlust-Me	ethode
				t _{dis}	t _n	tı
1	7753	11,99	2,47	5,88		
2	B-01	9,52	2,60	0,97		
3	MMVF11	10,59	2,48	66,75		
4	MMVF10	14,19	2,51	39,02		
5	MMVF10	2,46	2,55	23,52		
6	MMVF10a	2,30	2,55	18,95		
40	MMVF22	1,73	2,92		71,73	7,71
				Analy	vse der Lös	ung
				t _{dis}	t _n	tı
1	7753	11,99	2,47	6,00		
2	B-01	9,52	2,60	1,62		
3	MMVF11	10,59	2,48	61,73		
4	MMVF10	14,19	2,51	43,58		
5	MMVF10	2,46	2,55	20,01		
6	MMVF10a	2,30	2,55		37,50	9,83
39	MMVF22	7,46	2,92		14,17	0,24
40	MMVF22	1,73	2,92		58,77	6,63

Er hat vorgeschlagen, als Maß der Beständigkeit des Fasermaterials die Zeit bis zur Auflösung einer Faser mit einem Durchmesser von 1 μ m anzugeben (in der Einheit Tage pro Mikrometer, d/ μ m). Dabei unterscheidet er zwischen folgenden 3 Größen:

- t_{dis}: time to completely dissolve, congruently, a 1 µm diameter fiber
- t_i: time to completely leach a 1 μm diameter fiber
- t_n: time to completely dissolve, incongruently, a 1 μm diameter fiber

Potter (2000) gibt Ergebnisse für zahlreiche Fasertypen; davon sind hier in Tab. 3.52 nur Ergebnisse von Fasertypen übernommen, für die ich auch In-vivo-Daten zuordnen konnte. Für die t_{dis} -Ergebnisse der "optischen Methode" habe ich für einen Vergleich mit den Ergebnissen der anderen Autoren die Löslichkeitskonstante k berechnet, die nach Potter (2000) gemäß folgender Formel in Beziehung zu der Auflösungsdauer t_{dis} steht:

 $k = 10^5 \rho / (48 t_{dis}),$ mit ρ = Materialdichte der Fasern.

Aus den zahlreichen Publikationen geht klar hervor, dass die Ergebnisse von Messungen der In-vitro-Beständigkeit bzw. Löslichkeit glasiger Fasern von mehreren Faktoren abhängen. Thelohan und de Meringo (1994) haben diesbezüglich umfangreiche Messungen zur Bedeutung des Verhältnisses der Stauboberfläche zum Flüssigkeitsvolumen (SA/V) in einem Durchfluss-System durchgeführt (Tab. 3.45). Dieses SA/V-Verhältnis hängt seinerseits ab von der Flussrate, der Staubmasse und dem Faserdurchmesser. Die Tab. 3.45 zeigt, dass für dasselbe Fasermaterial abhängig vom Versuchsaufbau durchaus unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden.

Besondere Bedeutung wird dem pH beigemessen. Der pH der extrazellulären Flüssigkeit in der Lunge wird im neutralen Bereich bei ungefähr pH 7 angesetzt. Der pH in den Phagolysosomen von Alveolarmakrophagen ist im leicht sauren Bereich bei ungefähr pH 4 anzusetzen. Nach den Daten z. B. von Bauer et al. (1994) und Guldberg et al. (1995) kann sich dabei die Löslichkeit bestimmter Glasarten umkehren (Tab. 3.46-3.48). Während z. B. die (glasige) Steinfaser MMVF21 bei pH 7 schlechter löslich ist als die "Glasfaser" MMVF11, haben Guldberg et al. (1995) eine im Vergleich zur MMVF11 bessere Löslichkeit der MMVF21 im sauren Milieu gefunden. Daraus ergab sich die Frage, welche Bedeutung z. B. die Aufnahme relativ kurzer Fasern in Makrophagen oder die partielle Phagozytose längerer Fasern für die Biobeständigkeit des Faserstaubs in der Lunge und mithin seine Pathogenität haben könnte. Im Unterschied zu anderen Autoren haben Searl et al. (1999) keine deutliche Auswirkung verschiedener pH-Werte auf die Löslichkeit festgestellt (Tab. 3.50).

Zoitos et al. (1997), Hesterberg und Hart (2000) sowie Potter (2000) haben offensichtlich gewisse Standards der Versuchsbedingungen vorausgesetzt, wodurch auch eine größere Zahl von Fasermaterialien zusammenfassend verglichen werden konnte. Solche vergleichenden Angaben sind z. B. auf einen praktisch neutralen pH bezogen. Bei Zoitos et al. (1997) sind die Ergebnisse eines Laborvergleichs beschrieben, an dem bis zu 4 Labors (verschiedene Faserhersteller) teilgenommen haben (Tab. 3.49). Hesterberg und Hart (2000) haben zurückblickend die Ergebnisse von Langzeit-Inhalationsversuchen mit Daten zur In-vivo- und In-vitro-Beständigkeit des Materials verglichen. Die Tab. 3.51 ist ein Zitat einer Tabelle aus der Publikation von Hesterberg und Hart (2000). Thomas Hesterberg war damals Mitarbeiter von Johns Manville, dem Hersteller z. B. der Faserarten MMVF10 und MMVF11. Er hat in den 90er Jahren die Langzeit-Inhalationsversuche als Goldstandard bezeichnet. Nach den Daten, die in der Tab. 3.51 zusammengefasst sind, scheint es daher nahe zu liegen, ungefähr auf der Höhe der Rock wool MMVF21 so etwas wie eine Relevanzgrenze der Biobeständigkeit glasiger Isolierwollen für adverse Effekte zu sehen. In einem weiteren Review haben Hesterberg und Hart (2001) Folgendes geschrieben (SVF = synthetic vitreous fibers, d. h. künstliche Mineralfasern aus glasigem Material, also z. B. glass wool, rock wool, slag wool): "In contrast to asbestos, most of the SVFs tested in rodent inhalation studies cleared rapidly from the lung (were nonbiopersistent) and were innocuous". Hier wird der Begriff innocuous (harmlos, unschädlich) in Bezug auf die "negativen" Befunde in den Karzinogenitätsversuchen mit Inhalation bei Ratten und Hamstern verwendet. Einer etwaigen Interpretation, wonach die Biobeständigkeit - ermittelt in vivo oder in vitro - von Mineralwollen wie etwa dem Typ MMVF11 unterhalb einer "Relevanzgrenze" für Fibrogenität und Karzinogenität nach Inhalation beim Menschen liegt, ist aus meiner Sicht nicht zuzustimmen. Auf die Gründe wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

Tab. 3.53	Zusammenstellung verschiedener Ergebnisse zur In-vitro-Löslichkeit
	künstlicher Mineralfasern (Löslichkeitskonstante k) im Vergleich mit der
	karzinogenen Potenz im Langzeit-Intraperitonealtest.

Faserart	Löslichkeitskonstante k [ng cm ⁻² h ⁻¹]						Karzinogene
	Bauer et al. (1994)	Guld- berg et al. (1995)	Zoitos et al. (1997)	Searl et al. (1999)	Hester- berg & Hart (2000)	Potter (2000)	Potenz i.p. [% / mg]
B-01						7127,2	0,03
MMVF10			259	122,4	300	184,1; 450,6	
MMVF11	85	150	142			136,7	0,43
MMVF21		33	23	28,9	20		1,62
MMVF22	8,9		119	52,8	400	343,7; 79,8	0,40
RCF-1	0,31		8	4,4	3		3,00
Krokydolith			0,3		< 1		156,26

3.2.1.4 Zwischenfazit zur Prädiktivität von In-vitro-Gentoxizitätstests von Stäuben (Schwerpunkt faserförmige Stäube)

Es ist unendlich schwierig, Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Methoden im Hinblick auf Karzinogenität faserförmiger Stäube objektiv zu ermitteln. Bereits in den 1970er Jahren wurde die Faserhypothese entwickelt, wonach die langgestreckte Gestalt biobeständiger Partikel ein besonderes karzinogenes Agens bedingt (Pott et al., 1976; Stanton et al., 1981). Demnach hängt die karzinogene Potenz der Fasern insbesondere von der Länge und von der Biobeständigkeit ab. Die Faserhypothese ist heute "im Kern" fast unumstritten. Zwar gibt es noch einzelne Autoren, die im Eisengehalt oder in bestimmten Bindungsformen des Eisens die ganz wesentliche Komponente für die Pathogenität faserförmiger Stäube sehen, diese These ist aber insgesamt empirisch nicht gut belegt (siehe z. B. Tab. 3.34, Howden und Faux, 1996). So hat auch die Analyse der In-vitro-Ergebnisse von Costa et al. (1989) sowie Pezerat et al. (1989) keine sinnvolle Korrelation mit In-vivo-Befunden ergeben (Tab. 3.41; Abb. 3.5). Dagegen beschreiben zahlreiche Autoren einheitlich Faserlänge und Biobeständigkeit als wesentliche Einflussgrößen der karzinogenen Potenz von Fasern mit Durchmessern von höchstens 2 oder 3 µm. Uneinheitlich ist aber die Bewertung dessen, was man vielleicht am treffendsten mit dem Begriff "Relevanz" bzw. "Humanrelevanz" charakterisieren kann. Dies lässt sich z. B. an der Frage verdeutichen "Weisen atembare Stäube aus Dämmwollen vom Typus MMVF10, MMVF11 oder MMVF21 eine humanrelevante Karzinogenität auf?". Die Tumorhäufigkeiten, die in den Lungen von Ratten in der großen Serie von Inhalationsversuchen bei RCC mit MMVF11 und MMVF21 auftraten, waren insgesamt zwar höher als in den kombinierten Kontrollgruppen dieser Serie, sie waren im Einzelvergleich der Gruppen mit den jeweils mitlaufenden Kontrollen aber nicht statistisch signifikant erhöht (Tab. 3.1). Die Ergebnisse wurden von den Autoren daher als "negativ" bewertet. Gleichzeitig wurden diese Inhalationsversuche von manchen Autoren als Goldstandard betrachtet.

Die so genannten Keramikfasern RCF1, RCF2 und RCF3 waren im Unterschied zu den Dämmwollen MMVF10, MMVF11 und MMVF21 in den RCC-Versuchen mit eindeutig statistisch signifikant erhöhten Tumorhäufigkeiten verbunden. Dies wurde von den Autoren der MMVF10/11-Hersteller offensichtlich auch als Beleg für die Humanrelevanz dieser Ergebnisse anerkannt (Hesterberg und Hart, 2000, 2001). Man kann den Schluss ziehen, dass in Übereinstimmung mit der Interpretation dieser Autoren zwar RCF-Stäube, aber nicht MMVF10/11-Stäube grundsätzlich eine humanrelevante Karzinogenität besitzen. Autoren, die für die RCF-Hersteller arbeiteten, haben dagegen eine andere Interpretation der Ergebnisse veröffentlicht. Brown et al. (2005) haben ausgeführt, dass nach ihrer Einschätzung, gestützt durch verschiedene Daten, RCF-Fasern nicht für die Tumorhäufigkeiten in den Inhalationsversuchen verantwortlich zu machen seien, weil granuläre Staubbestandteile durch Partikelüberladung der Lungen wahrscheinlich das Ergebnis verfälscht hätten. Brown (2009) hat demzufolge auch die Einstufung der EU, wonach RCF im Unterschied zu anderen KMF in Kategorie 2 eingestuft wurden, als Fehler bezeichnet.

Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Tests faserförmiger Stäube hängen daher unter anderem auch davon ab, wo man die Grenze der Relevanz von Fasereigenschaften und von experimentellen In-vivo-Daten für eine humanrelevante Karzinogenität ansetzt. Umgekehrt mögen In-vitro-Daten Bestandteil des Datenpools sein, die man für die Ermittlung der Humanrelevanz zugrunde gelegt hat, insgesamt eine komplexe

Situation. Im vorliegenden Bericht lege ich diejenige Einschätzung der Faserkarzinogenität zugrunde, die sich in der TRGS 905 zumindest bis zum Stand des Jahres 2008 widerspiegelt. Demnach sind Faserstäube als karzinogen beim Menschen anzusehen, wenn sich eine Dosis von 10⁹ Fasern der so genannten WHO-Definition im Intraperitonealtest an Ratten als tumorerzeugend gezeigt hat. Wesentlich dabei ist, dass Ergebnisse des intraperitonealen Karzinogenitätstests grundsätzlich als aussagefähig im Hinblick auf ein krebserzeugendes Potential beim Menschen angesehen werden. Dabei erscheint deshalb keine Differenzierung nach mesotheliomerzeugender und lungenkrebserzeugender Wirkung erforderlich, weil epidemiologische Daten sowohl für eine lungenkrebserzeugende als auch für eine mesotheliomerzeugende Wirkung ganz verschiedener faserförmiger Mineralien sprechen: mehrere Asbestarten und Erionit, wobei die Sammelbezeichnung "Asbest" chemisch unterschiedliche Mineralien nicht gemäß ihrer chemischen Zusammensetzung, sondern gemäß ihrer technischen Verwendung bzw. aus historischen Gründen terminologisch zusammenfasst. Außerdem haben sich weitere faserförmige Stäube (SiC, special-purpose glass fibers) sowohl in der Lunge als auch an der Serosa von Ratten als krebserzeugend erwiesen. Daher ist die Annahme nicht plausibel, dass es bestimmte Fasereigenschaften gibt, die einer Gruppe von Fasern nur lungenkrebserzeugende Wirkung verleiht, einer anderen nur mesotheliomerzeugende und einer dritten Gruppe sowohl lungenkrebserzeugende als auch mesotheliomerzeugende. Nach dieser Einschätzung sind Inhalationsversuche mit faserförmigen Stäuben kein Goldstandard, weil das Krebsrisiko durch Asbestinhalation beim Menschen expositionsbezogen gemäß epidemiologischen Daten als zwei bis drei Größenordnungen höher anzusehen ist als bei der Ratte (Wardenbach et al., 2005). In den RCC-Versuchen war mit einer Expositionskonzentration an besonders potenten Krokydolithasbestfasern von 1600 F/mL (WHO-Definition) ein Tumorrisiko von 14 % verbunden (Tab. 3.1). KMF wurden in Konzentrationen von maximal rund 200 F/mL geprüft. Dies bedeutet, dass mit diesen KMF selbst dann kein Nachweis einer erhöhten Tumorhäufigkeit zu erwarten ist, wenn ihre Potenz genauso groß ist wie diejenige von Asbestfasern. Es kann mit diesem Versuchsmodell der Langzeit-Inhalation mithin nicht unterschieden werden, ob ein bestimmter Fasertyp eine karzinogene Potenz von z. B. einem Fünftel der karzinogenen Potenz von Asbestfasern besitzt oder ob er überhaupt kein karzinogenes Potential besitzt. Ein "negatives" Ergebnis schließt - für sich alleine - keine dieser beiden Möglichkeiten aus und ist deshalb - vor dem Hintergrund der genannten sonstigen Erkenntnisse - nicht als "valide negativ" einzuschätzen.

In der Tab. 3.43 sind die Prädiktivitätswerte für die ausgewerteten In-vitro-Tests zur Gentoxizität bzw. Zelltransformation durch faserförmige Stäube aufgeführt. Die relativ schlechte Konkordanz von nur 57 % beruht zum Teil darauf, dass einige In-vitro-Tests offensichtlich nicht empfindlich genug waren, um Hinweise auf ein karzinogenes Potential zu geben, das sich im Langzeit-Tierversuch am Peritoneum von Ratten gezeigt hat. Andere Tests, z. B. der Multinucleus-Assay von Pelin et al. (1995) und der Comet-Assay von Wang et al. (1999) haben durchgängig positive Befunde mit einer größeren Zahl unterschiedlicher Faserstäube ergeben. Diese Befunde waren in der Regel auch deutlicher als etwaige positive Befunde mit granulären Kontrollstäuben. Diese Versuche, ebenso wie die Zelltransformationstests von Hesterberg und Barrett (1984) sowie von Riebe-Imre et al. (1994) bestätigen, dass die Fasergestalt als ein besonderes toxisches (hier: gentoxisches bzw. karzinogenes) Agens anzusehen ist.

Allgemein fällt jedoch bei diesen In-vitro-Tests ein relativ geringer "Messbereich" auf. Das heißt, dass der Quotient zwischen dem Messwert des stärksten Effekts und des kleinsten signifikanten Effekts relativ klein ist. Dieser geringe Unterschiedsfaktor zwischen schwächstem und stärkstem Effekt macht es schwierig, quantitative Unterschiede zu erfassen, und kann es auch schwierig machen, gentoxisches Potential relativ schwach wirksamer Stäube überhaupt zu erkennen. So liegt z. B. der Kontrollwert des Comet-Assay von Wang et al. (1999) bei 0,13. Chrysotilasbest mit der höchsten Wirksamkeit ergab dabei den Wert 0,60 und Rock wool RW1 mit der niedrigsten Wirksamkeit ergab den Wert 0,27. Nach Abzug des Kontrollwertes von beiden Probenwerten erhält man ein Verhältnis zwischen höchstem und niedrigstem Wert von 0.47 / 0.14 = 3.4. In diesem "eigentlich" relativ empfindlichen Test (alle Faserstäube positiv) ergibt sich somit ein Messbereich von nur ungefähr einem Faktor 3 oder 4. Zum Vergleich: Der Potenzunterschied zwischen der im Intraperitonealtest gemäß Tab. 3.4 massebezogen am stärksten wirksamsten Chrysotilprobe und der Rockwool-Probe MMVF21 liegt bei 667 / 1,6 = 417, beträgt also mehr als zwei Zehnerpotenzen.

Bei den In-vitro-Löslichkeitstests sind die Messbereiche größer. Bei Potter und Mattson (1991) umspannen die k-Werte von 30 Typen von Glasfasern einen Bereich von drei Größenordnungen. Die Glassorten sind dort aber für mich einzelnen in vivo geprüften Stäuben nicht zuordenbar. In Tab. 3.53 habe ich die k-Werte einiger Faserarten zusammengestellt, denen ich auch In-vivo-Ergebnisse zuordnen konnte. In Tab. 3.53 sind diesbezüglich Potenzwerte aus Tab. 3.4 zur karzinogenen Wirksamkeit im Langzeit-Intraperitonealtest bei Ratten aufgenommen. Die Abb. 3.6 und 3.7 zeigen den Vergleich der In-vivo-Wirkungsstärken mit den In-vitro-Löslichkeitswerten grafisch. Beide Abb. 3.6 und 3.7 enthalten jeweils genau dieselben Daten, es besteht nur ein Unterschied in der Darstellung im Hinblick auf die jeweilige Interpretation. In Abb. 3.6 sind die Daten aller Faserarten mit demselben Punktsymbol dargestellt. Es geht dort um die Frage einer Korrelation In vitro - in vivo. Abb. 3.6 zeigt diesbezüglich eine recht gute Korrelation, d. h. es ist erkennbar, dass mit zunehmender Löslichkeit des Materials in vitro die karzinogene Potenz in vivo abnimmt. Diese gute Korrelation kann durchaus überraschen, weil in den Maßgrößen weder die Faserabmessungen noch die spezifischen Faserzahlen je Masseneinheit explizit berücksichtigt sind.

In Abb. 3.7 sind verschiedene Faserarten mit unterschiedlichen Punktsymbolen dargestellt. Die Farbe der Punktsymbole liefert dabei zusätzliche Information über den Tumorbefund im Langzeit-Inhalationsversuch: Die schwarz ausgefüllten Kreise beim Krokydolith signalisieren ein positives Ergebnis im Inhalationstest; die weißen Symbole bei den MMVF signalisieren, dass dort kein eindeutig signifikantes Ergebnis im Inhalationstest erhalten wurde, und die Symbole für RCF sind grau dargestellt, weil dort zwar eindeutig signifikant erhöhte Tumorhäufigkeiten im Inhalationstest gefunden wurden, weil diese Ergebnisse aber gemäß Gutachten bzw. Forschungsarbeiten, die im Auftrag der RCF-Industrie durchgeführt wurden, nicht den Fasern zuzuschreiben sind (Brown et al., 2005; Brown, 2009). Die Abb. 3.7 enthält "Relevanzgrenzen für besondere Besorgnis". Die "gepunkteten" Pfeile markieren Grenzen der Wirkungsstärke des Materials, unterhalb derer bzw. links von denen verschiedene gesellschaftliche Gruppen so etwas wie keine besondere Besorgnis (oder Unbedenklichkeit) signalisiert haben. D. h.: Der Pfeil von "TRGS 905" ist weit rechts und weit unten, nur Fasertypen mit der (geringen) Potenz und Löslichkeit ähnlich dem Fasertyp B01 werden gemäß dieser Regel als "unbedenklich" betrachtet. In den Publikationen zu den RCC-Studien mit MMVF-Typen wurden dagegen die Daten auch für diese Faserarten als Hinweis für Unbedenklichkeit interpretiert (McClellan et al., 1992; Hesterberg et al., 1993; Rossiter, 1994). Die Autoren dieser Studien waren Mitarbeiter der "MMVF-Industrie" oder in deren Auftrag tätig. Es ist offenkundig, dass die Position der Autoren als Position dieser Industrie in gewisser Weise zu verallgemeinern ist. Aus Arbeiten, die im Auftrag der RCF-Industrie durchgeführt bzw. veröffentlicht wurden, geht - wie bereits beschrieben - hervor, dass dort auch die kanzerogene Potenz des Fasertyps RCF als wenig bedenklich bzw. als gut beherrschbar betrachtet wird (Brown et al., 2005; Brown, 2009). Die "Relevanzgrenzen" für den Fasertyp "RCF" befinden sich in Abb. 3.7 deshalb in Abhängigkeit der bewertenden Gruppe teilweise ober- und unterhalb sowie links und rechts von den Datenpunkten. Die Bezeichnungen "RCF-Industrie", "MMVF-Industrie" und "TRGS 905" sind gewählt, weil anhand von Veröffentlichungen entsprechende Interpretationen naheliegen, eine Darstellung exakt wie die vorliegende findet sich in den Publikationen aber nicht, man beachte deshalb die Fragezeichen in Abb. 3.7.

<u>Fazit:</u> Über die Rangfolge der kanzerogenen Potenz faserförmiger Stäube und einen gewissen Zusammenhang mit der Löslichkeitskonstante aus In-vitro-Versuchen scheint unter verschiedensten Autoren weitgehend Einigkeit zu bestehen. Erhebliche Unterschiede bestehen aber in der Interpretation der praktischen Relevanz dieses Befundes für die Exposition des Menschen. Hinzuzufügen ist die Bewertung der Relevanz von Chrysotilasbest. Dazu sind wegen fehlender geeigneter Daten in den Abb. 3.6 und 3.7 keine Datenpunkte eingetragen. Aus den umfangreichen Veröffentlichungen von Chrysotile Institute (2010) ergibt sich aber sehr klar, dass man dort die Relevanzgrenze eher innerhalb der Gruppe der Asbeste, d. h. zwischen Krokydolith (bzw. Amphibolasbesten) und Chrysotilasbest, ziehen würde (s. Abschnitt 5.4).





Abb. 3.7 "Relevanzgrenzen für besondere Besorgnis" in der Korrelation von Abb. 3.6. Die "gepunkteten" Pfeile markieren Grenzen der Wirkungsstärke des Materials, unterhalb derer bzw. rechts von denen verschiedene gesellschaftliche Gruppen so etwas wie keine besondere Besorgnis (oder Unbedenklichkeit) signalisiert haben (siehe Text).

Die Abb. 3.7 greift grafisch nochmals die eingangs dieses Abschnitts erläuterte Interpretationsvielfalt der Informationen zur Karzinogenität faserförmiger Stäube auf. Relative Einigkeit besteht darüber, dass die karzinogene Potenz von Fasern von ihren Abmessungen und von ihrer Biobeständigkeit abhängt. Offensichtliche Uneinigkeit besteht darüber, an welcher Stelle des Kontinuums der karzinogenen Potenz eine Grenze gezogen werden sollte, an der nur geringe oder "keine besondere" Besorgnis für die Gesundheit exponierter Menschen angemessen ist. Die Veröffentlichungen von Mitarbeitern der MMVF-Industrie legen nahe, dass diese Autoren die Ergebnisse der Inhalationsversuche als entscheidend für die Bewertung der Karzinogenität der Faserstäube ansehen und dass deshalb eine Arbeitsplatzexposition gegenüber Staub aller gebräuchlichen Dämmwollen unter "modernen" Arbeitsplatzbedingungen keinen Grund zu besonderer Besorgnis darstellt. So haben z. B. Hesterberg et al. (1993) nach Abschluss der entsprechenden Inhalationsversuche über fibrous glass (FG) geschrieben: "Expsoure to chrysotile asbestos (10 mg/m³) and to a lesser extent RCF (30 mg/m³) resulted in pulmonary fibrosis as well as mesothelioma and significant increases in lung tumors. FG exposure was associated with a nonspecific inflammatory response (macrophage response) in the lungs that did not appear to progress after 6-12 months of exposure. These cellular changes are reversible and are similar to the effects observed after inhalation of an inert dust. No lung fibrosis was observed in the FG-exposed animals. Further, FG exposure resulted in no mesotheliomas and no statistically significant increase in the lung tumor incidence when compared to that of the negative control group. These findings, along with previous inhalation studies, suggest that respirable fibrous glass does not represent a significant hazard for fibrotic or neoplastic lung disease in humans". Entscheidend in dieser Passage ist der letzte Satz, der die Interpretation der zuvor sachlich beschriebenen Befunde enthält: does not represent a significant hazard.

Offensichtlich weichen sowohl die Interpretationen der Autoren der TRGS 905 als auch diejenigen von Autoren, die im Auftrag der RCF-Industrie tätig waren, von den Einschätzungen von Hesterberg et al. (1993) ab. Auf der Website der ECFIA (Representing the High Temperature Insulation Wool Industry, früher: Verband der europäischen Keramikfaserindustrie) war im Jahr 2009 ein Aufsatz von R.C. Brown (ohne Datum) mit dem Titel "The EU Carcinogen Classification of Refractory Ceramic Fibres: A mistake in hazard identification!" verfügbar, der die Frage enthält: "Are RCFs really more hazardous than the other vitreous silicate fibres?". Zur Antwort auf diese (rhetorische) Frage werden folgende Aussagen getroffen: "If the results in the RCC experiments were really due to fibres, then they might result from some significant property of RCFs. However, we now have ample evidence that the results were not due to the fibres themselves. ... Rather, the responsibility lay with an unusually high level of non-fibrous particles in the RCF samples. The ratio of particles to fibres in these was higher than in the other MMMF samples and at least ten times higher than in workplace air. The classification scheme accurately recognises that biopersistence is an important property determining the ability of fibres to cause biological effects. Thus the EU is correct in distinguishing between fibres with different levels of biopersistence. It is wrong in limiting this distinction to fibres above the 18% threshold. These so-called glass and mineral fibres can be even more biopersistent than RCFs." Offensichtlich drückt der Autor also die Meinung aus, dass RCF nicht anders zu beurteilen seien als die anderen in den RCC-Versuchen geprüften MMVF. Wenn man den Standpunkt vertritt, dass die Inhalationsversuche für die "Unbedenklichkeit" der MMVF sprechen, dann wären somit RCF ähnlich "unbedenklich" oder "wenig bedenklich". Ergänzend ist hinzuzufügen, dass der Verband der amerikanischen Keramikfaserindustrie (RCFC, Refractory Ceramic Fibers Coalition) zum Arbeitsschutz ein so genanntes *Product Stewardship Program* (PSP) und dass ECFIA einen so genannten *Code Of Practice Working With Aluminium Silicate Wools (ASW) Also Called Refractory Ceramic Fibres (ASW/RCF)* aufgelegt haben (www.ecfia.eu; www.rcfc.net/psphtw.htm).

Im Unterschied zu den Einschätzungen der vorgenannten Autoren hat man im Arbeitsschutz in Deutschland die Ergebnisse der intraperitonealen Karzinogenitätsversuche als so relevant erachtet, dass Dämmwollen vom Typ MMVF10 und MMVF11 in Deutschland verboten wurden und zukünftig stattdessen Dämmwollen mit einer Biobeständigkeit ähnlich dem Typ B01 (s. Abb. 3.7) zu verwenden waren. Es würde den Rahmen dieses Berichts sprengen, alle Details hier auszuführen, die im Rahmen der regulatorischen Toxikologie von KMF eine Rolle gespielt haben und spielen (wie In-vivo-Beständigkeitsdaten, der so genannte K_i und die EU-Einstufungskriterien), gewisse Hinweise auf den regulatorischen Kontext erscheinen aber notwendig, weil die gute Korrelation zwischen In-vitro-Löslichkeit und karzinogener Potenz nach intraperitonealer Injektion gemäß Abb. 3.6 auch im regulatorischen Kontext interpretiert werden muss.

In Bezug auf Sensitivität und Spezifität von In-vitro-Methoden zur Charakterisierung der Toxizität, insbesondere der Gentoxizität bzw. Karzinogenität, faserförmiger Stäube lassen sich die Ergebnisse im folgenden Fazit zusammenfassen. Empfindliche In-vitro-Gentoxizitätstests sind grundsätzlich in der Lage, ein gegenüber granulären Stäuben besonderes Potential faserförmiger Stäube zu erfassen. Der Messbereich ist aber relativ klein, es können in einem einzelnen Ansatz kaum Potenzunterschiede von einem Faktor von 10 oder mehr dargestellt werden. Dies macht es schwierig, quantitativ Wirkungsunterschiede zwischen Faserarten, die gemäß Langzeit-Intraperitonealtest einen Faktor von 1000 umspannen können, mit Hilfe von Invitro-Gentoxizitätstests zu beschreiben. Es macht diese Tests auch anfällig für falsch-negative Befunde von Faserarten mit relativ geringer Wirkungsstärke. Die üblichen In-vitro-Gentoxizitätstests können den Einfluss der Biobeständigkeit von Faauf ihre karzinogene Potenz nicht erfassen. In-vitrosern Löslichkeitsuntersuchungen im zellfreien System haben Ergebnisse gezeigt, die recht gut mit der karzinogenen Potenz der Fasern korrelieren. Dabei werden jedoch keine Informationen zur Bedeutung der Faserabmessungen für die karzinogene Wirkung erhalten. Die Ergebnisse von In-vitro-Löslichkeitsuntersuchungen müssen deshalb mit anderweitig generierten Informationen zum karzinogenen Potential eines Fasermaterials und zu seiner von den Faserabmessungen bedingten karzinogenen Potenz kombiniert werden, um aussagestarke Informationen über die zu vermutende Potenz in vivo zu erhalten. Durch eine geeignete Kombination von In-vitro-Löslichkeitsuntersuchungen und von empfindlichen In-vitro-Gentoxizitätstests bei gleichzeitiger Prüfung positiver und negativer Kontrollproben erscheint es möglich, wertvolle Informationen über einen neuen, bisher nicht in vivo geprüften Fasertyp zu erhalten. Gleichwohl dürften dabei Unsicherheiten verbleiben, was die Äguivalenz zu Ergebnissen mit dem gemäß TRGS 905 als beurteilungsrelevant anerkannten Langzeit-Intraperitonealtest betrifft. Zu diesen Unsicherheiten gehören die Abhängigkeit der In-vitro-Löslichkeitsbestimmungen von mehreren Randbedingungen der Messungen und die Streuung ihrer Ergebnisse von bis zu mehr als einem Faktor 10 für dasselbe Glasmaterial (Tab. 3.51).

3.2.2 Karzinogene Metalle

Bei der Bewertung von Metallen bzw. ihren Verbindungen einschließlich Legierungen ist es grundsätzlich ein Problem, das kausale Agens zu definieren. Es scheint auf der Hand zu liegen, dass bei Ni-, Cd- oder Cr(VI)-haltigen Stoffen, für die epidemiologische und tierexperimentelle Daten über krebserzeugende Wirkung vorhanden sind, freigesetzte Metallionen das wesentliche karzinogene Agens darstellen. Bei relativ schwerlöslichen Stoffen mag es aber schwierig sein, Ioneneffekte von Partikeleffekten zu unterscheiden. Dabei ist es gegebenenfalls auch nicht trivial, den Grad der Löslichkeit exakt anzugeben, da sich Wasserlöslichkeit und Löslichkeit in biologischen Medien unterscheiden können. Für einen Veraleich der Wirkungen verschiedener Substanzen in unterschiedlichen Testsystemen kommt weiterhin erschwerend hinzu, dass sich die Identität verschiedener Metallverbindungen unter Umständen nicht eindeutig angeben lässt. Der Begriff "Nickeloxid" ist z. B. vieldeutig. So enthält der Vorschlag der dänischen Umweltbehörde für eine Einstufung von Nickelverbindungen auf Gruppenbasis mehrere umfangreiche Tabellen mit der Aufzählung zahlreicher Nickelverbindungen (Danish EPA, 2005). In unserer Tab. 3.54 sind einige der anorganischen Nickelverbindungen mit den in dem Originaldokument verwendeten englischen Bezeichnungen aufgeführt. Es handelt sich dort um mehr als 110 anorganische Nickelverbindungen, zusätzlich sind bei Danish EPA (2005) organische und weitere Nickelverbindungen aufgeführt. Unter "oxidischem Nickel" enthält Tab. 3.54 vier Verbindungen mit jeweils unterschiedlicher CAS-Nr., die nur Nickel und Sauerstoff enthalten. Nicht alle 4 Verbindungen wurden im Inhalationstest geprüft, sondern nur 1 Nickeloxid (CAS-Nr. 1313-99-1). Möglicherweise wurden mit anderen Applikationsarten, einschließlich subkutaner, intramuskulärer und intrarenaler Applikation, auch andere Nickeloxide geprüft (solche Versuche wurden hier nicht näher recherchiert). Unter Berücksichtigung der Epidemiologie sind gemäß EU (2008) drei Nickeloxide in die Kategorie 1 (bzw. 1A GHS) eingestuft: Nickelmonoxid (1313-99-1), Nickeldioxid (12035-36-8), Dinickeltrioxid (1314-06-3). Das Nickeloxid mit der CAS-Nr. 11099-02-8 ist bei EU (2008) nicht aufgeführt, auch Oxide, die neben Nickel weitere Metallionen enthalten (Tab. 3.54), sind bei EU (2008) nicht explizit eingestuft. Dagegen stützt sich die Bewertung der deutschen MAK-Kommission auf die begründete Annahme, dass die Bioverfügbarkeit von Nickelionen zu Karzinogenität von Nickelverbindungen führt. Deshalb sind gemäß DFG (2009) Nickel und Nickelverbindungen (einatembare Fraktion) "pauschal" als humankarzinogen bewertet (K1).

Für die Metalle Ni, Cd, Co und Cr bzw. ihre Verbindungen gibt es eine sehr große Zahl von In-vitro-Untersuchungen zur Gentoxizität. In Anbetracht dieser Datenfülle einerseits und der Schwierigkeiten, exakt die jeweilige Verbindung zu definieren andererseits, ist es vernünftigerweise nicht möglich und nicht sinnvoll, hier nur genau diejenigen Substanzen (mit identischer CAS-Nummer) herauszufinden, für die sowohl Daten aus Langzeit-Inhalationsversuchen als auch In-vitro-Gentoxizitätstests vorliegen. Stattdessen werden hier aus Review-Arbeiten summarisch Informationen zur Gentoxizität in vitro erhoben. Bei der Bewertung gehen wir ähnlich der MAK-Bewertung davon aus, dass die Bioverfügbarkeit der Ionen dieser Metalle ein karzinogenes Agens darstellt. Es geht hier also darum, ein ungefähres Bild zu ermitteln, wie gut In-vitro-Gentoxizitätstests das begründet anzunehmende karzinogene Potential dieser Metallionen anzeigen. In den Tabellen 3.55-3.57 ist dabei der Bewertung der Testergebnisse mit plus und minus (positiv und negativ) gefolgt so wie sie in den IARC-Monographien angegeben ist. Unter der These, dass Cd-, Co-, Cr(VI)- und Ni-

ckel-Verbindungen ein karzinogenes Potential besitzen, entspricht der Anteil der positiven Tests der Sensitivität der In-vitro-Tests; die Angabe der Spezifität entfällt. Neueren Daten aus In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität von Nanopartikeln werden hier wegen der Aktualität des Themas im Einzelnen anhand der Originalarbeiten ausgewertet. Dies ist im nächsten Kapitel beschrieben. Bei den entsprechenden Untersuchungen dort stand nicht die Wirkung bestimmter Ionen im Vordergrund, sondern die Frage nach allgemeinen oder speziellen Partikelwirkungen. In den Versuchen wurden zum Teil verschiedene Metallverbindungen geprüft; darunter mögen auch bereits als karzinogen bekannte Metalle sein; gleichwohl sind diese Versuche unter dem Oberbegriff der "Nanomaterialien" im nächsten Kapitel behandelt.

Tab. 3.55 zeigt, dass nach den Recherchen der IARC-Arbeitsgruppe zu Cadmium mindestens 150 Versuche oder Versuchsreihen zur Mutagenität bzw. Gentoxizität von Cadmiumverbindungen in vitro durchgeführt wurden. Im Durchschnitt war davon ungefähr die Hälfte positiv. Cd-chlorid, Cd-sulfat, Cd-sulfid und Cd-oxid wurden sowohl in vitro auf Gentoxizität als auch in Inhalationsversuchen auf Karzinogenität geprüft (Tab. 3.7-3.8). Sowohl die löslichen Verbindungen Chlorid und Sulfat als auch die kaum wasserlöslichen Verbindungen Sulfid und Oxid haben im Inhalationsversuch zu Lungentumoren geführt. Die Wirkungsstärke in vivo war wesentlich höher als bei granulären bio-beständigen Partikeln ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität (Tab. 3.21, 3.23-3.25). Daher ist die Annahme gut begründet, dass Cd-Ionen wesentlich zur Karzinogenität der Proben beigetragen haben und dass Cd-Verbindungen grundsätzlich als karzinogen betrachtet werden sollten. Dies entspricht z. B. der Bewertung der DFG (2009). Die letzte Spalte in Tab. 3.55, die zunächst ohne Wertung den Anteil der positiven Tests an den Gentoxizitätstests mit Cd angibt, kann daher auch im Sinne der Sensitivität der In-vitro-Tests interpretiert werden. Demnach läge die Sensitivität von In-vitro-Gentoxizitätstests mit Cd-Verbindungen im Durchschnitt bei ungefähr 50 %. Die Spezifität kann nicht angegeben werden, da alle Cd-Verbindungen als "tatsächlich positiv" betrachtet werden.

Ähnliche Überlegungen können auch für Co-Verbindungen, für Vanadiumpentoxid, Galliumarsenid und Nickelverbindungen angestellt werden (Tab. 3.56-3.58). Es versteht sich, dass die Daten auch anders interpretiert werden können und von manchen Autoren auch interpretiert werden. Demnach könnten die positiven Gentoxizitätstests entweder "falsch positiv" oder Anzeichen einer (schlecht reproduzierbaren) sekundären Gentoxizität sein. Die im Tierversuch oder auch in epidemiologischen Studien beobachteten Tumoren wären die Folge eines "Hochdosiseffektes" (z. B. unter historischen Arbeitsplatzbedingungen) nach einem nicht-gentoxischen oder sekundär-gentoxischen Wirkprinzip. Die In-vitro-Daten hätten für die Risikobewertung des Menschen dann keine oder nur gering relevante Bedeutung. Diese Interpretation liegt wohl den Bewertungen des renommierten europäischen Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL) zugrunde, wonach die Einstufung von Cadmium und Nickel in eine spezielle Kategorie als Substanzen mit einer "praktischen Wirkungsschwelle" (practical threshold) vorgeschlagen wurde (Bolt, 2009). Für Chrom(VI)verbindungen scheint allgemein eine mutagene Wirkung anerkannt (Carc. Cat.1; R45; Muta. Cat 2; R46; EU, 2008), IARC (1990) hat nur positive In-vitro-Versuche aufgeführt, immerhin 86 Versuche bzw. Versuchsreihen (Tab. 3.59).

CAS Number	Chemical Name
7440-02-0	Nickel
12003-78-0	Aluminum, compd. with nickel (1:1)
12142-92-6	Nickel, compd. with zirconium (1:2)
12034-55-8	Nickel, compd. with niobium (1:1)
12059-23-3	Nickel, compd. with tin (3:1)
12035-52-8	Antimony, compd. with nickel (1:1)
12503-49-0	Antimony, compd. with nickel (1:3)
12196-72-4	Lanthanum, compd. with nickel (1:5)
12175-27-8	Dysprosium, compd. with nickel (1:2)
12688-64-1	Bismuth, compd. with nickel (1:1)
51912-52-8	Copper, compd. with lanthanum and nickel (4:1:1)
1313-99-1	Nickel monooxide (NiO)
1314-06-3	Nickel trioxide (Ni2O3)
11099-02-8	Nickel oxide
12035-36-8	Nickel dioxide (NiO2)
12004-35-2	Aluminum nickel oxide (Al2-NiO4)
12035-39-1	Nickel titanium oxide (NiTiO3)
12653-76-8	Nickel-titanium-oxide-
52502-12-2	Nickel vanadium oxide (NiV2-O6)
12018-18-7	Chromium nickel oxide (Cr2-NiO4)
12168-54-6	Iron nickel oxide (Fe2-NiO4)
97435-21-7	Iron nickel zinc oxide (Fe2-NiZnO4)
58591-45-0	Cobalt nickel oxide (CoNiO2)
68186-89-0	Cobalt-nickel-gray-periclase-
68016-03-5	Cobalt molybdenum nickel oxide (CoMo2-NiO8)
70692-93-2	Nickel zirconium oxide (NiZrO3)
95046-47-2	Spinels, cobalt nickel zinc grey
14177-55-0	Molybdenum nickel oxide (MoNiO4)
68130-36-9	Molybdenum-nickel-hydroxide-oxide-phosphate-
12035-38-0	Nickel tin oxide (NiSnO3)

Tab. 3.54Aufzählung anorganischer Nickelverbindungen gemäß Danish EPA
(2005)

Tab. 3.54Aufzählung anorganischer Nickelverbindungen gemäß Danish EPA
(2005); Fortsetzung

CAS Number	Chemical Name
14177-51-6	Nickel tungsten oxide (NiWO4)
15780-33-3	Nickel uranium oxide (NiU3-O10)
73892-02-1	Antimony oxide (Sb2-O3), solid soln. with nickel oxide (NiO) and titanium oxide (TiO2)
8007-18-9	Antimony-nickel-titanium-oxide-yellow-
68187-10-0	Nickel-ferrite-brown-spinel-
68515-84-4	Olivine, nickel green
68610-24-2	Nickel-barium-titanium-primrose-priderite-
68611-43-8	Nickel-niobium-titanium-yellow-rutile-
71631-15-7	Nickel-iron-chromite-black-spinel-
99749-23-2	Cassiterite, cobalt manganese nickel grey
69011-05-8	Nickel titanium oxide tungstate (NiTi20-O35-(WO6)2)
68186-85-6	C.I.Pigment Green 50
11113-74-9	Nickel hydroxide
12054-48-7	Nickel dihydroxide (Ni(OH)2)
12007-00-0	Nickel boride (NiB)
12007-01-1	Nickel boride (Ni2-B)
12007-02-2	Nickel boride (Ni3-B)
12619-90-8	Nickel-boride-
12059-14-2	Nickel silicide (Ni2-Si)
12201-89-7	Nickel silicide (NiSi2)
12035-64-2	Nickel phosphide (Ni2-P)
11113-75-0	Nickel sulphide
12035-72-2	Nickel subsulphide (Ni3S2)
16812-54-7	Nickel sulphide (NiS)
12068-61-0	Nickel arsenide (NiAs2)
27016-75-7	Nickel arsenide (NiAs)
1314-05-2	Nickel selenide (NiSe)
10101-96-9	Selenious acid, nickel(2+) salt (1:1)
15060-62-5	Selenic acid, nickel(2+) salt (1:1)

Tab. 3.54Aufzählung anorganischer Nickelverbindungen gemäß Danish EPA
(2005); Fortsetzung

CAS Number	Chemical Name
12142-88-0	Nickel telluride (NiTe)
68583-44-8	Cadmium sulfide (CdS), solid soln. With zinc sulfide, nickel and silver-doped
68584-42-9	Cadmium sulfide (CdS), solid soln. With zinc sulfide, copper and nickel-doped
68512-22-1	Zinc sulfide (ZnS), nickel and silver-doped
68585-93-3	Zinc sulfide (ZnS), copper and nickel-doped
68784-84-9	Zinc sulfide (ZnS), copper and nickel and silver-doped
13463-39-3	Nickel carbonyl (Ni(CO)4), (T-4)-
557-19-7	Nickel cyanide (Ni(CN)2)
39049-81-5	Nickelate(2-), tris(cyano-C)-, dipotassium
14220-17-8	Nickelate(2-), tetrakis(cyano-C)-, dipotassium, (SP-4-1)-
14874-78-3	Ferrate(4-), hexakis(cyano-C)-, nickel(2+) (1:2), (OC-6-11)-
3333-67-3	Carbonic acid, nickel(2+) salt
16337-84-1	Carbonic acid, nickel salt
12607-70-4	[carbonato(2-)]tetrahydroxytrinickel
65405-96-1	[μ-[carbonato(2-)-O:O']]dihydroxy trinickel
10028-18-9	Nickel fluoride (NiF2)
7718-54-9	Nickel dichloride (NiCl2)
37211-05-5	Nickel-chloride- {a nickel[1] compound}
67952-43-6	Chloric acid, nickel(2+) salt
13637-71-3	Perchloric acid, nickel(2+) salt
13462-88-9	Nickel bromide (NiBr2)
14550-87-9	Bromic acid, nickel(2+) salt
13462-90-3	Nickel iodide (Nil2)
7757-95-1	Sulfurous acid, nickel(2+) salt (1:1)
7786-81-4	Nickel sulphate
13842-46-1	Sulfuric acid, nickel(2+) potassium salt (2:1:2)
15699-18-0	Sulfuric acid, ammonium nickel(2+) salt (2:2:1)
71720-48-4	Sulfuric acid, monoethyl ester, nickel(2+) salt
13770-89-3	Sulfamic acid, nickel(2+) salt (2:1)

CAS Number	Chemical Name
15851-52-2	Telluric acid (H2-TeO3), nickel(2+) salt (1:1)
15852-21-8	Telluric acid (H2-TeO4), nickel(2+) salt (1:1)
13138-45-9	Nickel dinitrate
14216-75-2	Nitric acid, nickel salt
14332-34-4	Phosphoric acid, nickel(2+) salt (1:1)
18718-11-1	Phosphoric acid, nickel(2+) salt (2:1)
10381-36-9	Phosphoric acid, nickel(2+) salt (2:3)
14448-18-1	Diphosphoric acid, nickel(2+) salt (1:2)
14507-36-9	Phosphinic acid, nickel(2+) salt
36026-88-7	Phosphinic acid, nickel salt
13477-70-8	Arsenic acid (H3-AsO4), nickel(2+) salt (2:3)
21784-78-1	Silicic acid (H2-SiO3), nickel(2+) salt (1:1)
13775-54-7	Silicic acid (H4-SiO4), nickel(2+) salt (1:2)
31748-25-1	Silicic acid (H2-SiO3), nickel(2+) salt (4:3)
37321-15-6	Silicic acid, nickel salt
12519-85-6	Nickel hydroxide silicate (Ni3-(OH)4-(Si2-O5))
14721-18-7	Chromic acid (H2-CrO4), nickel(2+) salt (1:1)
15586-38-6	Dichromic acid (H2-Cr2-O7), nickel(2+) salt (1:1)
13859-60-4	Nickelate(2-), tetrafluoro-, dipotassium, (T-4)-
99587-11-8	Nickelate(2-), tetrachloro-, diammonium, (T-4)-
24640-21-9	Nickelate(1-), trichloro-, ammonium
13859-65-9	Nickel, tetrakis(phosphorous trifluoride)-, (T-4)-
14708-14-6	Borate(1-), tetrafluoro-, nickel(2+) (2:1)
13877-20-8	Nickel(2+), hexaammine-, (OC-6-11)-, bis[tetrafluoroborate(1-)]
26043-11-8	Silicate(2-), hexafluoro-, nickel(2+) (1:1)
30868-55-4	Zirconate(2-), hexafluoro-, nickel(2+) (1:1), (OC-6-11)-

Tab. 3.54Aufzählung anorganischer Nickelverbindungen gemäß Danish EPA
(2005); Fortsetzung

Stoffgruppe		Anza	hl Ergebr	nisse In-v	/itro-Tests	
	+	(+)	-	?	Summe	% positiv
Cd-acetat	4	2	1		7	85,7
Cd-chlorid	36	4	33		73	54,8
Cd-nitrat	1		9		10	10,0
Cd-sulfat	8	1	8		17	52,9
Cd-sulfid	3		1		4	75,0
Cd-oxid			4		4	0,0
Cd-carbonat			1		1	0,0
Cd, gesamt	52	7	57	0	116	50,9

Tab. 3.55Ergebnisse von In-vitro-Gentoxizitätstests (ohne metabolische Aktivie-
rung) mit Cadmiumverbindungen gemäß Table 14 bei IARC (1993)

Tab. 3.56Ergebnisse von In-vitro-Gentoxizitätstests mit Cobaltverbindungen ge-
mäß Table 15 bei IARC (2006)

Stoffgruppe		Anza	hl Ergebi	nisse In-v	vitro-Tests	
	+	(+)	-	?	Summe	% positiv
Co-Metall	10		3		13	76,9
Co-Legierungen u. Co- haltige Metallcarbide	16		3	4	23	69,6
Co(II)-Salze	55	6	41	1	103	59,2
Co(III)-Salze und - Komplexe	7	2	1		10	90,0
Co-Sulfide (II und IV)	3	1	1		5	80,0
Co, gesamt	91	9	49	5	154	64,9

Stoffgruppe		Anza	hl Ergebr	nisse In-v	vitro-Tests	
	+	(+)	-	?	Summe	% positiv
V ₂ O ₅	14		10		24	58,3
GaAs	1		2		3	33,3

Tab. 3.57Ergebnisse von In-vitro-Gentoxizitätstests mit Vanadiumpentoxid und
Galliumarsenid gemäß Table 7 und Table 3 bei IARC (2006)

Tab. 3.58Ergebnisse von In-vitro-Gentoxizitätstests mit Nickelverbindungen ge-
mäß Tab. 7 bei Greim (2001)

Stoffgruppe	Anza	hl Ergebnisse In-v	vitro-Tests	
	positiv	negativ	Summe	% positiv
Ni, metallisch	1	1	2	50,0
Ni-sulfat	8	1	9	88,9
Ni-chlorid	12	mehrere		ca. 50
Ni, oxidisch	4	1	5	80,0
Ni, sulfidisch	11	3	14	78,6

Tab. 3.59Anzahl von In-vitro-Gentoxizitätstests, in denen gemäß den Tables 25-
27 bei IARC (1990) positive Befunde mit Chrom(VI)verbindungen (ge-
gebenenfalls löslich) erhalten wurden

Test / Effekt	Anzahl Versuche oder Versuchs- reihen
DNA-Fragmentierung sowie DNA-DNA- und DNA-Protein- Crosslinks in Kulturen von Säugetierzellen	18
Schwesterchromatidaustausch in Kulturen von Säugetier- zellen	39
Chromosomenaberrationen in Kulturen von Säugetierzellen	29
Gesamt	86

3.2.3 Alveolengängige granuläre bio-beständige Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität (GBS), Nanomaterialien und sonstige Stäube

3.2.3.1 <u>Ergebnisse von In-vitro-Versuchen zur Gentoxizität der</u> Nanomaterialien und sonstigen Stäube

In diesem Kapitel werden In-vitro-Versuche zu Nanomaterialien behandelt. Dabei geht es zum Teil um neueste Studien, in denen der Begriff "Nano" von den Autoren selbst verwendet wird. Es sind hier aber auch solche Studien eingeschlossen, bei denen es aufgrund der Informationen zumindest möglich ist, dass es sich um "Nanomaterialien" handelt. Unter Nanomaterialien sind hier Pulver oder Stäube zu verstehen, die aus isometrischen oder langgestreckten Primärpartikeln mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm oder aus deren Aggregaten oder Agglomeraten bestehen. Die Begriffe Nanomaterial und Nanopartikel mögen dabei letztlich auch synonym verwendet werden, etwa: "Dieser Ruß ist ein Nanomaterial" = "Bei diesem Ruß handelt es sich um Nanopartikel". Faserförmige Nanomaterialien (Nanotubes) sind ebenfalls in diesem Kapitel behandelt, obwohl faserförmige Stäube im Übrigen in Abschnitt 3.2.1 behandelt werden. Studien mit Nanotubes sind aber relativ neu und die Nanotubes wurden dabei gleichzeitig mit anderen Nanomaterialien geprüft. Daher ist es sinnvoll, die jeweiligen Studien mit ihren spezifischen Versuchsbedinaungen im Zusammenhang zu betrachten. Aus ähnlichem Grund sind in diesem Kapitel auch Nanomaterialien aufgenommen, die karzinogene Metallionen enthalten können - getrennt von der Auswertung "Karzinogene Metalle" in Abschnitt 3.2.2.

Ein generelles Problem für den In-vivo/in-vitro-Vergleich ist es, "vergleichbare" Stoffproben zu definieren. Sofern z. B. Publikationen darüber berichten, dass "TiO2" in vitro geprüft wurde (ohne Angabe der Partikelgröße und Modifikation), ist es unklar, zu welchen In-vivo-Studien genau dies in Beziehung zu setzen ist. Für alle Tabellen, in denen hier über In-vitro-Ergebnisse berichtet wird und die eine Spalte "Referenz" enthalten, gilt daher Folgendes: Da die In-vivo- und In-vitro-Studien in der Regel von unterschiedlichen Autoren durchgeführt wurden, beziehen sich die Angaben zur "Referenz" eher in den selteneren Fällen auf exakt dieselben Substanzproben, die in vitro untersucht wurden; um überhaupt eine ausreichende Zahl an Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurde hier auch Referenzinformation von Staubproben verwendet, die derselben "Substanzgattung" (z. B. "TiO2") angehören und nach aller verfügbaren wissenschaftlichen Evidenz als vergleichbar zu betrachten sind (Potenzzahlen gemäß Tab. 3.25). Diese "Quasi-Identität" ist in den Tabellen gegebenenfalls durch Hinzufügen einer "Gattungsbezeichnung" in Anführungszeichen, z. B. "TiO₂", deutlich gemacht. Die Entscheidung, was als "vergleichbar" zu betrachten ist, muss zwangsläufig subjektive Elemente enthalten. Es ist praktisch unmöglich, "objektive" Substanzidentität bei Studien verschiedener Autoren anzugeben. Bei "Dieselruß" ist es selbstverständlich, dass die von zwei verschiedenen Labors benutzten Proben wahrscheinlich von zwei verschiedenen Motoren stammen; die Proben werden sich sicherlich in der genauen Stoffzusammensetzung unterscheiden, könnten also - falls man die gute Übereinstimmung der Karzinogenitätsbefunde aus unterschiedlichen Erdteilen nicht kennen würde - als zwei verschiedene Stoffe angesehen werden. Aber selbst bei Stoffbezeichnungen wie "Kaolin" mag ein kritischer Leser Unterschiede z. B. in der genauen Kristallstruktur bei den Proben unterschiedlicher Lieferanten vermuten. Die Problematik wird in diesem Bericht an verschiedenen Stellen, auch im Rahmen eines Zwischenfazits und der "Diskussion", erläutert.

Nanopartikel bestehen relativ häufig aus chemischen Stoffen, die als bio-beständig und ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität zu betrachten sind, also z. B. elementarer Kohlenstoff (Ruß), Titandioxid oder Zirkoniumoxid. Für Stäube mit alveolengängigen Partikeln - nicht notwendigerweise Nanopartikeln - aus solchen Stoffen wurde der Begriff GBS geprägt, wobei die 3 Buchstaben der Abkürzung für 9 Worte stehen: alveolengängige granuläre bio-beständige Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität (eigentlich: aGBSobssT; Roller, 2008). Solche Stäube, auch wenn es sich nicht um Nanopartikel handelt, sind hier ebenfalls angesprochen, zum Teil im Vergleich zu chemisch identischen oder ähnlichen Nanopartikeln. Im Einzelfall mag es unklar sein, ob "signifikante spezifische Toxizität" vorliegt oder nicht, oder es mag klar sein, dass spezifische Toxizität vorliegt (z. B. kristallines und amorphes Siliziumdioxid). Deshalb ist hier auch von "sonstigen Stäuben" die Rede. Letztlich soll hier keine Begriffs- oder Stoffsystematik geschaffen werden, sondern es zählen die Versuchsergebnisse, und die Oberbegriffe der Stoffgruppen dienen nur als Anhalt für eine Gliederungsstruktur. Die Nanopartikel dürften in der Regel relativ bio-beständig sein, es mag dabei graduelle Unterschiede geben. Und es mag im Einzelfall schwierig sein, die Wirkung gelöster Metallionen von "reinen Partikeleffekten" zu unterscheiden. Definitionsgemäß werden hier anorganische Stoffe betrachtet, organische Stoffe können dabei jedoch toxikologisch als Beschichtung oder Verunreinigung eine Rolle spielen.

Die Tabellen 3.60-3.85 enthalten die Ergebnisse verschiedener In-vitro-Gentoxizitätstests mit solchen Stäuben, in chronologischer Reihenfolge des Veröffentlichungsdatums. Relativ häufig wurden Industrieruß und Titandioxid geprüft. "Industrieruß" ist als Oberbegriff zu betrachten. Es gibt verschiedene Herstellungsverfahren für Ruß, es ist mit unterschiedlichen Verunreinigungen zu rechnen, und selbstverständlich gibt es Ruße mit unterschiedlichen Primärpartikelgrößen. Auch von Titandioxid gibt es grundsätzlich unterschiedliche Stäube; chemisch/mineralogisch wird zumindest nach den Modifikationen bzw. Kristallstrukturen Rutil und Anatas unterschieden. Außer bei dem mittels Flammenhydrolyse hergestellten Titandioxid liegt bei TiO₂ die Primärpartikelgröße gewöhnlich nicht im ultrafeinen Bereich. Solches "herkömmliche" Titandioxid erscheint auch in relativ feiner Verteilung weiß und wird deshalb als "Pigment-TiO2" genutzt. Titandioxide wie das TiO2 P25 von Evonik/Degussa werden nach Angaben des Herstellers nach dem so genannten Aerosil®-Verfahren hergestellt, d. h. sie werden - wie die Aerosil®-Pulver aus SiO₂ - mittels Flammenhydrolyse aus den entsprechenden Ausgangsstoffen hergestellt; die Primärpartikelgröße von TiO₂ P25 wird mit 21 nm angegeben (www.aerosil.com). Wie in den Abschnitten 2.1 und 3.1 erläutert sind solche Stoffe als Nanomaterialien zu bezeichnen, auch wenn die Primärpartikel in Aggregaten oder Agglomeraten vorliegen bzw. wenn der Aggregations-/Agglomerationsgrad nicht genau ermittelt werden kann. Nicht bei allen Veröffentlichungen war eindeutig zu identifizieren, um welche Art von Titandioxid es sich handelte. Die Bewertung solcher Versuche wird im Abschnitt 3.2.3.3 sowie unter "Diskussion" erörtert. Ebenso ist zu diskutieren, welche biologische Bedeutung einer Unterscheidung nach Rutil und Anatas zukommen mag.

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Linnainmaa et al., 1997) Tab. 3.60

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
geman rerstener- angabe	[hg/mL]	[hg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Mikrokern-Test – Zytokines sierte Zell-Linie von Ratten- nainmaa et al. (1997)	e-Block-Methoo Leberepithelze	de, Behandlung Illen (RLE); Zel	sdauer: 1 h + 5 π len mit mindester	iin. UV 366 nm + s 1 Mikrokern pr	Cytochalasin o 2000 doppe	B + 20 h; ii Ikernige Zel	nmortali- len; Lin-
Kontrolle				146 = 7,3 %			
Kontrolle UV				194 = 9,7 %			
TiO ₂ , ultrafein, Degussa P25, Anatas, unbeschich-		20	vermutl. n.s.	104 = 5,2 %	I	+ HNI	ç
tet, <i>average crystal size</i> 20 nm		20 + UV	vermutl. n.s.	147 = 7,4 %	ı	ITR +	N
TiO ₂ , ultrafein, UV-TITAN M160, Rutil, beschichtet mit Al-hydroxid u. Stearin- säure, für den Versuch		20	vermutl. n.s.	96 = 4,8 %	ı	+ HNI + DTI	ç
gewaschen mit Ethanol (zur Entfernung der Be- schichtung), <i>average</i> <i>crystal size</i> 20 nm		20 + UV	vermutl. n.s.	101 = 5,1 %	ı	("TiO ₂ ")	۷
Fortsetzung und Erläuterun	g s. nächste Se	eite					

(Fortsetzung)
ır Gentoxizität
vitro-Versuche zu
se Partikel: In-
en und divers
Nanomaterialie
Tab. 3.60

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gernals nersteller- angabe	[hg/mL]	[hg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Mikrokern-Test – Zytokines	e-Block-Methoo	de, Behandlung	sdauer: 1 h + 5 m	iin. UV 366 nm +	Cytochalasin	B + 20 h; ii	nmortali-
sierte Zell-Linie von Ratten- nainmaa et al. (1997)	Leberepithelze	llen (RLE); Zel	len mit mindester	is 1 Mikrokern pro	o 2000 doppe	Ikernige Zel	en; Lin-
Kontrolle				146 = 7,3 %			
Kontrolle UV				194 = 9,7 %			
TiO ₂ , " <i>pigmentary"</i> , Ke- mira AFDC, Anatas, un-		20	vermutl. n.s.	150 = 7,5 %	I	+ HNI + DTI	7
beschichtet, <i>average</i> <i>crystal size</i> 170 nm		20 + UV	vermutl. n.s.	129 = 6,5 %	ı	("TiO ₂ ")	_
Zur Prüfung der Zytotoxizitå Zellen untersucht wurde. G xisch; eine Dosis von 20 µg Doesen von 5, 10 und 20 µ len geprüften Dosen keine (tt wurde ein de eprüft wurden c /cm ² ist daher v g/cm ² geprüft; h gentoxischen E	m Mikrokern-Te dabei die Doser vermutlich nicht nier sind nur ex ffekte beobachi	st ähnliches Verf 15, 10, 50, 100 ur signifikant zytoto emplarisch die Er tet wurden.	ahren verwendet, nd 200 µg/cm ² ; D xisch (vermutl. n. gebnisse der höc	in dem der A osen ab 50 μς s.). Im Mikrok :hsten Dosis a	unteil nicht g g/cm ² warer kern-Test wu angegeben,	eteilter zytoto- ırden da mit al-

						(100	
Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais Hersteller- angabe	[hg/mL]	[µg/cm ²]	% cell survi- val	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay (single cell g SOL 500 (Dr. Hönle) "UV/v 50 Nuclei pro Behandlung,	el electrophores is light" oder 50 <i>form edge of n</i> u	is, SCG), Beha min. Dunkelhe Icleus to the tai	indlungsdauer 1 h it; Maus-Lympho <i>il end</i>), ohne / mit	1 + 50 min. Bestr mzell-Linie L517 Bestrahlung 5 J/	ahlung mit Sol 8Y; mittlere S ′cm ² ; Nakagav	nnenlichtsin chweiflänge wa et al. (19	ulator ; (in µm, 197)
	0		98,1	9,4 / 9,2			
	3,1		93,8 /	8,2 /			
TiO ₂ p-25, Anatas, aver-	12,5		61,3 / 103,3	19,4 / 7,6	mit / ohne	+ HNI	
age size 0,02 i μπι, μιρ- pon-Aerosil, Tokyo	20		13,2 / 85,8	40,5 / 7,2	Bestrahlg.:	ITR +	7
	200		8,0 / 77,3	41,5 / 6,6	- / +	("TiO ₂ ")	
	800		/ 49,5	/ 7,6			
Außer mit 5 J/cm ² wurde d nur dei Ergebnisse mit p-2 Tests im Hinblick auf die PI se hier nicht dargestellt. Di (mit und ohne Bestrahlung)	er Comet-Assay 5 veröffentlicht (notogentoxizität e Fortsetzung di 1 für die drei wei	auch mit ande es zeigte sich e durchgeführt. I ieser Tabelle au teren von Naka	ren (niedrigeren) ein intensitätsabh Da Photogentoxiz uf den folgenden igawa et al. (1997	Strahlungsintens ångiger Anstieg). ität hier nicht inte Seiten enthält die ') geprüften TiO ₂	sitäten durchge Außerdem wu erpretierbar ist e Ergebnisse c -Typen.	eführt. Davc urden mit p- , sind diese des Comet-	n wurden 25 weitere Ergebnis- Àssays

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Nakagawa et al., 1997) Tab. 3.61

ng)
etzu
Forts
ät (I
xizit
entc
Ģ
nz á
Iche
ersu
>-<
vitro
<u>_</u>
ike
bart
se l
liver
o pr
n u
ialie
ateri
omé
Van
~
<u>.</u> 61
ς. Ω
Tat

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais nersteller- angabe	[hg/mL]	[hg/cm ²]	% cell survi- val	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Comet-Assay (single cell gé SOL 500 (Dr. Hönle) "UV/vi 50 Nuclei pro Behandlung, "	el electrophores is light" oder 50 <i>form edge of n</i> u	sis, SCG), Beha min. Dunkelhei <i>ucleus to the tai</i>	Indlungsdauer 1 h it; Maus-Lympho <i>l end</i>), ohne / mit	1 + 50 min. Bestr mzell-Linie L517 Bestrahlung 5 J/	ahlung mit Sol 8Y; mittlere S cm ² ; Nakagav	nnenlichtsin chweiflänge wa et al. (19	nulator (in µm, 97)
	0		66 , 2	8,3 / 8,3			
TiO, WA Anatas aver-	50		31,6 / 95,9	17,2 / 8,3			
age size 0,255 µm,	200		6,2 / 110,6	24,9 / 11,1	mit / ohne Bestrahlg.:	+ HNI	τ
VVако, Токуо	800		10,0 / 118,3	41,0 / 15,8	+ ~ +	("TiO ₂ ")	_
	3200		13,8 / 83,1	49,3 / 42,7			
	0		6'86	4,4 / 6,9			
	20		0'26 / 0'96	8,9 / 4,4			
TiO ₂ WR, Rutil, average size 0,255 µm, Wako	200		103,3 / 109,3	7,3/8,3	mit / ohne Bestrahlg.:	+ HNI	۲
-	800		89,7 / 103,5	7,5 / 7,5	- / -	("TiO ₂ ")	_
	3200		76,9 / 92,1	16,3 / 7,7			

(b
∋tzur
ortse
Щ,
ität
XiZ
sntc
Ğ
zur
e
suc
ers
>-0
vitr
Ĺ
<u></u>
ILIK
Ц Б
rse
live
d d
n
ien
rial
ate
Ш
lan
2
Σ
3.6
ab.
Ĕ

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gerriais nerstener- angabe	[hg/mL]	[µg/cm²]	% cell survi- val	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Comet-Assay (single cell ge SOL 500 (Dr. Hönle) "UV/vi 50 Nuclei pro Behandlung,	el electrophores is light" oder 50 <i>form edge of n</i> u	sis, SCG), Beha min. Dunkelhei <i>ucleus to the tai</i>	Indlungsdauer 1 h it; Maus-Lympho <i>l end</i>), ohne / mit	n + 50 min. Bestra mzell-Linie L5178 Bestrahlung 5 J/	ahlung mit Sol 3Y; mittlere S cm ² ; Nakaga	nnenlichtsim chweiflänge va et al. (19	ulator (in µm, 97)
	0		98,4	4,8 / 2,8			
TiO, TP-3 Rutil averade	50		6'96 / <i>1</i> '06	8,5 / 5,6	-		
size 0,42 µm, Fuji titan,	200		64,1 / 90,7	16,1 / 5,0	mit / ohne Bestrahlg.:	+ HNI	~
Kanagawa	800		45,6 / 95,9	20,3 / 6,6	- - +	("TiO ₂ ")	_
	3200		12,8 / 79,3	37,6 / 6,6			

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais nerstener- angabe	[hg/mL]	[bg/cm ²]	(Trypan Blue)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay (single cell ge Linie V79 / menschliche em	el electrophores Ibryonale Lunge	sis, alkalisch), E en-Fibroblasten	ehandlungsdaue Hel 299; Schwe	3 h; chinesiche iflänge, Mittelwert	Hamster-Lun t [µm]; Zhong	gen-Fibrobl j et al. (1997	asten-Zell- ')
		0		7,5/5,0			
SiO ₂ , Quarz Min-U-Sil 5,		17,2		26,9 / 15,0	+ / +		
US Silica, Berkeley Springs, West Verginia,		5,4,4	> 95 % S.	45,5 / 17,3	+ / +	+ HNI	ç
95 % < 5 µm		68,8		54,8 / 22,3	+ / +	ITR +	0
		103,4		65,0 / 19,5	+ / +		
		0		8,2 / 6,5			
SiO ₂ amorph Spherisorh		17,2		9,2 / 7,9	- / -		
Phase Sep Company,		5,4,4	> 95 % S.	13,4 / 10,8	- / -	INH n.g.	7
Norwalk, CI		6'89		27,5 / 17,6	+ / +	(SiO ₂ UF)	_
		137,9		21,4/21,1	+ / +		

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Zhong et al., 1997) Tab. 3.62

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais nersteller- angabe	[hmL]	[hg/cm ²]	(Trypan Blue)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay (single cell ge Linie V79 / menschliche em	el electrophore: ıbryonale Lung	sis, alkalisch), B en-Fibroblasten	sehandlungsdaue Hel 299; Schwe	r 3 h; chinesiche iflänge, Mittelwert	Hamster-Lun t [µm]; Zhong	gen-Fibrobl get al. (1997	asten-Zell- ')
		0		8,1 / 8,2			
Industriaruß Cahat Cor-		17,2		7,6 / 9,0	- / -		
poration, Edison, NJ, 37		34,4	> 95 % S.	5,7 / 8,2	- / -	+ HNI	ç
E		68,8		9,3 / 8,9	- / -	(CB UF)	N
		137,9		6,9 / 7,9	- / -		
		0		8,4 / 8,0			
Glass fibers, AAA-10 mi-		1,7		17,6 / 12,0	- / +		
crofibers, Owens- Corning, Toledo, HO; L.		3,4	> 95 % S.	20,3 / 22,9	+ / +	ITR +	ç
2,0; D. 0,18 µm		6'9		28,3/34,1	+ / +	(Glasf., diinn)	N
		13,8		37,0 / 38,8	+ / +		

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Fortsetzung) Tab. 3.62

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[Jm/g/mL]	[MJ]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Schwesterchromatidaustau ter Ovary); SCEs pro Zelle	sch (SCE), Beh ; Lu et al. (199	landlungsdauer 8)	· 24 h (in völliger l	Dunkelheit); CHC)-K1-Zellen ((CHO = Chin	ese Hams-
TiO ₂ , CAS-Nr. 13463-67- 7, Sigma, St. Louis, MO	0		100 % Sur- vival	7,3			
[keine Angabe zur Parti- kelgröße]	0,08	1	% 2'26	9,02	+	+ HN	
	0,16	2	% 2'76	9,77	+	ITR +	
	0,4	5	% <i>L</i> '36	11,63	+	("TiO ₂ ")	
	DWB ode	er Potenz	Nicht zytotox- isch	15 SCEs/cell pro 1 µg/mL	+		

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Lu et al., 1998) Tab. 3.63

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[mu]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Mikrokern-Test, konvention dauer 24 h); CHO-K1-Zelle kernige (BN) Zellen (Zytok.	iell (Behandlung en (CHO = Chin -BIM.); Lu et a	gsdauer 18 h) u lese Hamster O al. (1998)	nd mit Cytochalas vary); Mikrokern	sin B (= Zytokines e (MN) pro 1000 .	se-Block-Meth Zellen (konve	ode, Behan ntionell) bzw	dlungs- v. doppel-
TiO ₂ , CAS-Nr. 13463-67- 7, Sigma, St. Louis, MO	0		100 % Sur- vival	23 20			
[keine Angabe zur Parti- kelgröße]	0,08	F	% 2'26	28 37	+		
	0,16	2	94,7 %	28 43	+		
	0,4	5	95,7 %	29 50	+	INH + ITR +	
	0,8	10	n.a.	32 55	+	(²)	
	1,6	20	% 66	29 60	+		
	DWB ode	er Potenz	Nicht zytotox- isch	 > 100 MN/1000 BN pro µg/mL 	+		

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Lu et al., 1998; Fortsetzung) Tab. 3.63

Tab. 3.64

Staub	% Verlust an Su-	Lungenfrisch-	Lungensp	ülflüssigkeit nach 3	30 Tagen
	pernelix (Dosis 10 µg)	gewicht n. 30 a [mg/g Körper- gewicht]	% Neutrophile	Laktatdehydro- genase [Wroblewski Einheiten]	Lipidper- oxidation [nmol/mL]
Kontrolle	0,0	4,8	1,2	20,6	4,3
Uf-TiO ₂	15,1	5,0	2,8	25,2	4,6
Uf-Co	54,0	4,9	9,3	41,2	6,0
Uf-Ni	48,6	6,6	14,2	210,4	6,2

				כוויסאודוימי (בסודי		or an:, 200 r)	
Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[ˈm/br]	[µg/cm ²]		"Messwert" *	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay, Behandlung manzell-Linien: A549 (Alve	sdauer 48 h, Or olarkarzinom) ui	iginal-Partikel, nd THP-1 (Mor	Partikel nach Dicl ozyten); Median	nlormethan-Extral -Tail-DNA; Don F	tion sowie E orto Carero	xtrakt geprü et al. (2001)	ft; Hu-
			A549-Zellen				
Kontrolle	0			1,9 / 1,8			
Industrieruß, furnace	0,016		AlamarBlue-	1,8/2,1	- / -	+ HNI	
black Vulcan M, mittl. Durchmesser 100 nm	0,16		Assay: keine	3,5 / 2,7	- / -	ITR +	2
	1,6		Zytotoxizität	5,4 / 2,8	- / +	(Carb.Bl.)	
		•	THP-1-Zellen				
Kontrolle	0			1,6 / 1,3			
Industrieruß, s.o.	0,016		AlamarBlue-	3,8 / 5,0	- / +	+ HN	
	0,16		Assay: keine	3,5 / 2,5	- / -	ITR +	7
	1,6		Zytotoxizitāt	4,2/2,7	+ / -	(Carb.Bl.)	
* Werte für Original-Partik	el / Partikel nac	h Extraktion; m	lit den Extrakten v	vurde kein signifik	anter Effekt f	estgestellt.	

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Don Porto Carero et al., 2001) Tab. 3.65

(j
Fortsetzun
Gentoxizität (
/ersuche zur
In-vitro-V
Partikel:
und diverse
Nanomaterialien t
Tab. 3.65

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[µg/cm²]		"Messwert" *	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay, Behandlung manzell-Linien: A549 (Alve	sdauer 48 h, Oi olarkarzinom) u	riginal-Partikel, ind THP-1 (Mon	Partikel nach Dich lozyten); Median	-Tail-DNA; Don F	ktion sowie E	xtrakt geprü et al. (2001)	ft; Hu-
			A549-Zellen				
Kontrolle	0			2,0 / 1,7			
Dieselrußpartikel, mittl.	0,016		AlamarBlue-	3,5 / 1,9	- / -		
Durchmesser 400 nm	0,16		Assay: keine	4,0 / 1,6	- / +	INH + ITR +	0
	1,6		Zytotoxizität	4,0 / 2,7	- / +		
			FHP-1-Zellen				
Kontrolle	0			1,9 / 1,3			
Dieselrußpartikel, s.o.	0,016		AlamarBlue-	5,0 / 1,3	- / +		
	0,16		Assay: keine	2,7 / 1,5	- / -	INH + ITR +	0
	1,6		Zytotoxizität	4,6 / 1,6	- / +		
* Werte für Original-Partik allen Dosen in THP-1-Ze	el / Partikel nac illen ein signifik	ch Extraktion; m anter Effekt fest	it den Extrakten v tgestellt (stärkster	vurde mit der höc · Effekt, 5,2 mit de	hsten Dosis i er kleinsten D	n A549-Zellı osis bei TH	en und mit 1).

Gentoxizität (Fortsetzung)
tikel: In-vitro-Versuche zur (
lien und diverse Par
b. 3.65 Nanomateria
Tab. 3.65 Nanomaterialien und dive

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[ˈmʃ]	[µg/cm²]		"Messwert" *	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Comet-Assay, Behandlung manzell-Linien: A549 (Alveo	sdauer 48 h, Oi olarkarzinom) u	riginal-Partikel, I Ind THP-1 (Mon	Partikel nach Dich lozyten); Median-	lormethan-Extral -Tail-DNA; Don F	ktion sowie E Porto Carero (xtrakt geprü et al. (2001)	ft; Hu-
			A549-Zellen				
Kontrolle	0			1,9/1,7			
Städtischer Schweb-	0,016		AlamarBlue-	2,5 / 1,8	- / -		
staub, mittl. Durchmesser	0,16		Assay: keine	3,3 / 1,4	- / +	nicht ge- prüft	
	1,6		Zytotoxizität	3,0 / 1,8	- / -	<u>.</u>	
			THP-1-Zellen				
Kontrolle	0			1,9/1,3			
Städtischer Schweb-	0,016		AlamarBlue-	3,7 / 1,7	- / +		
staub, s.o.	0,16		Assay: keine	3,9 / 1,7	- / +	nicht ge- prüft	
	1,6		Zytotoxizität	4,7 / 1,5	+ / -	- -	
* Werte für Original-Partik signifikanter Effekt festge	el / Partikel nac estellt (3,8).	:h Extraktion; m	it den Extrakten v	vurde nur mit der	kleinsten Dos	sis in A549-	Zellen ein
Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
---	----------------------------------	--------------------------------------	--	--	--------------------------	---	-----------
gemais Hersteller- angabe	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Mikrokern-Test, Behandlun, alten Embryonen); Mikroke	gsdauer 12, 24 rne pro 1000 Z	, 48, 66, 72 h; ellen (hier: nach	SHE-Fibroblasten 1 24 / 72 h); Rahi	(S <i>yrian hamster</i> nan et al. (2002)	- <i>embryo</i> ; frisc	:h isoliert vo	n 13 Tage
		0	"Cytotoxicity	24 / 18	"MN was		
TiO. ultrafain von G		0,5	increased af- ter exposure	26 / 26	ly increa-		
Oberdörster, <i>"particle size</i> "		1,0	of cells to higher con-	31 / 32	sed (p ≤ 0.05) at all	- TTR +	7
		2	centrations of UF-TiO ₂ (>	32 / 27	concentra- tions bet-	("110 ₂ ")	
		10	10.0 µg/cm²)"	20 / 20	ween 0.5 and 5.0"		
TiO ₂ , fein, von G. Ober- dörster, <i>"particle size ></i> 200 nm"		0,5 - 10		"did not in- duce signi- ficant altera- tions in the MN induction rate (data not shown)"	ı	INH + ITR + ("TiO ₂ ")	-

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Rahman et al., 2002) Tab. 3.66

I., 2005)
(Gurr et a
Gentoxizität
/ersuche zur
In-vitro-V
Partikel:
diverse
terialien unc
Nanoma
Tab. 3.67

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[hg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Comet-Assay ohne (Standa handlungsdauer 1 h in absc ment; Gurr et al. (2005) Ansatz 1 (mehrere TiO ₂ -Pro	rd) und mit enz Iuter Dunkelhe ben)	rymatischer Ver it; menschliche	dauung (Enzym: e Bronchialepithel	Fpg = Formamid zell-Linie BEAS-'	opyrimidin-DN 2B (ATCC CRI	IA-Glykosyli L-9609); Ta	ase), Be- til mo-
TiO ₂ , Anatas (Hombikat UV100), 10 nm	10	1,77	n.a.	30 / 90	+	+ HNI	
TiO ₂ , Anatas (Millenium PC500), 20 nm	10	1,77	MTT-Assay, 3 Tage, IC ₅₀ = 6,5 µg/mL	20 / 70	+	ITR + ("TiO ₂ ")	2
TiO ₂ , Anatas (Kanto Chemical, Tokio, cat. no. 40167-01), 200 nm	10	1,77	n.a.	25 / 55	+- (erhöht, nicht stat. signif.)		
TiO ₂ , Anatas (Aldrich- Sigma cat. no. T8141), ≥ 200 nm	10	1,77	n.a.	25 / 30	+- (erhöht, nicht stat. signif.)	INH + ITR + ("TiO ₂ ")	
TiO ₂ , Rutil (Kanto Chemi- cal, Tokio, cat. no. 40982- 30), 200 nm	10	1,77	n.a.	20 / 45	+		
Kontrolle	unbeh	andelt	ł	10 / 12	Bezug	ł	ł

entoxizität (Fortsetzung)	
artikel: In-vitro-Versuche zur G	
Nanomaterialien und diverse P	
Tab. 3.67	

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[hg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay mit enzymati: absoluter Dunkelheit; men: Ansatz 2 (Anatas versus Ru	scher Verdauur schliche Bronch util versus Misc	ng (Enzym: Fpg nialepithelzell-Li hung)	= Formamidopyr inie BEAS-2B (AT	imidin-DNA-Glyk CC CRL-9609);	osylase), Beh; Tail moment;	andlungsdaı Gurr et al.	uer 1 h in (2005)
TiO ₂ , Anatas (Kanto Chemical, Tokio, cat. no. 40167-01), 200 nm	10	1,77	n.a.	56	+ (erhöht, nicht stat. signif.)	+ H Z	
TiO ₂ , Rutil (Kanto Chemi- cal, Tokio, cat. no. 40982- 30), 200 nm	10	1,77	n.a.	47	+	ITR + ("TiO ₂ ")	~
Anatas + Rutil	10	1,77	n.a.	87	+		
Kontrolle	unbeh	andelt	1	12	Bezug	1	ł

(F
tzunç
rtset
(Fo
izität
entox
ດ ເ
e zu
nche
/ers
-0
vitr
<u>–</u>
<u>.</u>
artil
Ŭ
erse
dive
p
ы
aliei
eria
nat
nor
Na
67
Tab

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Mikrokern-Test, Behandlun 1000 doppelkernige Zellen;	gsdauer 24 h; Gurr et al. (20	menschliche Br 05)	onchialepithelzell	-Linie BEAS-2B	(ATCC CRL-9	609); Mikro	kerne pro
TiO ₂ , Anatas (Hombikat UV100), 10 nm	10	1,77	n.a.	83	+	INH + ITR + ("TiO ₂ ")	7
TiO ₂ , Anatas (Kanto Chemical, Tokio, cat. no. 40167-01), 200 nm	10	1,77	n.a.	60	+		
TiO ₂ , Anatas (Aldrich- Sigma cat. no. T8141), ≥ 200 nm	10	1,77	n.a.	35	ı	INH + ITR + ("TiO ₂ ")	
TiO ₂ , Rutil (Kanto Chemi- cal, Tokio, cat. no. 40982- 30), 200 nm	10	1,77	n.a.	47	+- (nicht stat. signif.)		
Kontrolle	unbeh	andelt		30	Bezug	ł	ł

Tab. 3.68 Nanoma	Iterialien und divers	e Partikel: In-vitr	o-Versuche zur G	ientoxizität (Poma	a et al., 2006)		
Substanz	Dosis	, Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[Jug/cm ²]	(MI1-ASSay, opt. Dichte)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsys	tem; Messgröße/	Beobachtung;	Autor(en)				
Mikrokern-Test mit Cy (Maus-Makrophagen-I	tochalasin B (= Zyt ⊔inie); Mikrokerne (okinese-Block-N (MN) pro 1000 d	lethode, Behandlu oppelkernige Zell	Ingsdauer 44 [od en; Poma et al. (er 48] h + 28 2006)	h); RAW-26	:4.7-Zellen
Kontrolle		0	0,55	14			
Industrieruß "fein"		1	0,44	22,0	+	HNI خ	
		3	0,36 (signif.)	36,5	+	ITR +	0
		10	0,26 (signif.)	50	+	(CB tein)	
Bleiacetat (pos. Kontr.	.) 0,2			100	+		
Kontrolle		0	0,56	13	+		
Städtischer Schweb-		1	0,44 (signif.)	45,0	+		
staub, Fraktion 0,43-2 um. L´Aquila (Italien).		3	0,38 (signif.)	51,0	+	nicht ge- prüft	
Januar		10	0,25 (signif.)	68	+		
Bleiacetat (pos. Kontr.	.) 0,2			06	+		

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[bg/cm ²]	(MTL -ASSAY, opt. Dichte)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Mikrokern-Test mit Cytocha (Maus-Makrophagen-Linie)	llasin B (= Zytol ; Mikrokerne (N	kinese-Block-M AN) pro 1000 d	ethode, Behandlu oppelkernige Zell	Ingsdauer 44 [od en; Poma et al. (er 48] h + 28 2006)	h); RAW-26	.4.7-Zellen
Kontrolle	0	(0,55	16			
Städtischer Schweb-		Ļ	0,42	41,5	+		
staub, s.o., Februar		8	0,33	74,0	+	nicht ge- prüft	
		10	0,24	81	+		
Bleiacetat (pos. Kontr.)	0,2			95,2	+		
Kontrolle	0	(0,50	15,2	+		
Städtischer Schweb-		μ	0,41	31	+		
staub, s.o., März		3	0,33 (signif.)	66	+	nicht ge- prüft	
		10	0,22	81	+	_	
Bleiacetat (pos. Kontr.)	0,2			100,0	+		

, 2007)
n et al.
(Jacobser
Gentoxizität
ersuche zur
In-vitro-V
Partikel:
ind diverse
Nanomaterialien u
Tab. 3.69

Substanz	Dosis, N	lasse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	zu
	[hg/mL]	[µg/cm ²]	(Viabilitat)	"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/E	seobachtun	ig; Autor(en)				
<i>lacZ-</i> und <i>cll-</i> Mutationen, B <i>mutant frequency x 10</i> ⁵ (cll	ehandlungsdau / lacZ); Jacot	uer 72 h; FE ssen et al. (2	E1 MML-Zell-Linid 2007)	e (Lungenepithelz	ellen von trar	ısgenen Muta TM	-Mäusen);
Kontrolle	0		100 %	15,5 / 43,9			
Industrieruß Printex 90*	75		92,8 %	21,7 / 54,1	+ / +	INH+, ITR+	2
Kontrolle	0		100 %	12,3 / 43,9			
Quarz**	100		67 %	15,9 / 39,1	- / -	INH+, ITR+	S
Benzo[a]pyren (positive Kontrolle)	0,1			362,1 / 1662	+ / +		
Comet-Assay ohne (Standa handlungsdauer 3 h; FE1 N	Ird) und mit en AML (s.o.); Sc	zymatischer :ore (arbitrar	· Verdauung (Enz <i>y unit</i> s) für <i>stran</i> ı	:ym: Fpg = Forma d breaks / FPG se	imidopyrimidii ensitive sites;	n-DNA-Glykosy Jacobsen et al	ase), Be- . (2007)
Kontrolle	0		100 %	10,7 / 12,3			
Industrieruß Printex 90*	75		92,8 %	21,1 / 26,2	+ / +	INH+, ITR+	2
Quarz**	100		97 %	15,4 / 22,7	- / -	INH+, ITR+	3
* von Degussa-Hüls, spez	ifische Oberflä	che 295 $m^2/$	g, Dichte 2,2 g/ci	n ³ , mittlere Primä	ırpartikelgröß	e 14 nm	
** Standard-Referenzmate Oberfläche 2,9 m ² /g, Dic	ial 1878a von :hte 2,6-2,7 g/c	US Nationa :m ³ , mittlere	l Institute for Star Partikelgröße 1,	ndards and Techr 59 µm	iology, Gaithe	ersburg, MD; sp	ezifische

2007)
n et al.,
(Limbach
Sentoxizität
n-vitro-Versuche zur (
Partikel: Ir
und diverse
Nanomaterialien
Tab. 3.70

Substanz	Dosis, N	lasse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	nz
	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	+/-	+/-	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/E	seobachtun	g; Autor(en)				
ROS-Bildung – Fluoreszen: lische Enzyme in den reduz ROS-vermittelte Oxidation i skopisch gemessene Fluor der Werte unbehandelter K	z-Assay (inaktiv zierten Farbstof ist), Behandlun eszenz des dur ontrollen; Limt	ve Esterform ff 2′,7′-Dichl gsdauer 4 h ch Oxidatior bach et al. (2	1 2',7'-Dichlordih ordihydrofluoreso menschliche Lu gebildeten Fart 2007)	ydrofluorescein-E cein, HDCF, umg ungenepithelzell- ostoffs DCF (2 [°] ,7 [°]	Jiacetat, HDC ewandelt, der Linie A549 (A -Dichlorfluore	F-DA, wird durc empfindlich für TCC, CCL-185) scein), ausgedr	h zytoso- eine ; spektro- ückt in %
SiO ₂ -Partikeln, für den Versuch synthetisiert mit <i>flame spray synthesis</i> , 20-75 nm, BET-Oberfl. 209 m ² /g, berechneter Primärpartikeldurch- messer d _{BET} 11,3 nm	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	ı	INH n.g. ITR + (SiO₂ UF)	-
0,5% TiO ₂ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 250 m ² /g, d _{BET} 9,4 nm	90		~ 100 % MTT	~ 100 %	I	nicht geprüft	
1,6% TiO ₂ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 234 m ² /g, d _{BET} 10,0 nm	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	ı	nicht geprüft	
TiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 118 m ² /g, d _{BET} 12,0 nm	30		~ 100 % MTT	150 %	+	INH+, ITR+ ("TiO ₂ ")	2

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung ROS-Bildung -	- Fluoreszenz-A	ssay, Zell-Linie	A549, Limbach	et al. (2007)			
0,05% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 263 m ² /g, d _{вет} 9,0 nm	30		~ 100 % MTT	~ 100 %		nicht ge- prüft	
0,1% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 270 m ² /g, d _{BET} 8,8 nm	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	r	nicht ge- prüft	
0,5% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 263 m ² /g, d _{BET} 9,0 nm	30		~ 100 % MTT	~ 170 %	+	nicht ge- prüft	
1,0% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 210 m ² /g, d _{BET} 11,2 nm	30		~ 100 % MTT	200 %	+	nicht ge- prüft	
1,6% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 201 m ² /g, d _{BET} 11,6 nm	30		~ 100 % MTT	250 %	+	nicht ge- prüft	
3% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 146 m ² /g, d _{BET} 15,7 nm	30		~ 100 % MTT	230 %	+	nicht ge- prüft	

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[µg/cm²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung ROS-Bildung -	- Fluoreszenz-A	∖ssay, Zell-Linie	s A549, Limbach e	et al. (2007)			
5% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 137 m ² /g, d _{BET} 16,4 nm	30		~ 100 % MTT	180 %	+	nicht ge- prüft	
10% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 100 m ² /g, d _{BET} 21,4 nm	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	ı	nicht ge- prüft	
Fe ₂ O ₃ -P. s.o., BET- Oberfl. 93 m ² /g, d _{BET} 12,3 nm	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	ı	nicht ge- prüft	
0,5% Co ₃ O ₄ /SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 243 m ² /g, d _{вET} 9,6 nm	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	ı	nicht ge- prüft	
1,6% Со ₃ O₄/SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 184 m ² /g, d _{BET} 12,6 nm	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	ı	nicht ge- prüft	
Co ₃ O ₄ -P. s.o., BET- Oberfl. 86 m ² /g, d _{BET} 11,4 nm	30		~ 100 % MTT	3000 %	+	nicht ge- prüft	

Substanz	Dosis, N	Aasse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	nz
	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung ROS-Bildung -	– Fluoreszenz- ⁴	Assay, Zell-Li	nie A549, Limbac	ch et al. (2007)			
0,5% Mn ₃ O₄/SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 227 m ² /g, d _{вET} 10,3 nm	30		~ 100 % MTT	500 %	+	nicht geprüft	
1,6% Mn ₃ O₄/SiO ₂ -P. s.o., BET-Oberfl. 170 m ² /g, d _{BET} 13,7 nm	30		~ 100 % MTT	2600 %	+	nicht geprüft	
Mn ₃ O ₄ -P. s.o., BET- Oberfl. 98 m ² /g, d _{BET} 12,2 nm	30		~ 100 % MTT	5000 %	+	nicht geprüft	
ROS-Bildung – Fluoreszen Esterform 2',7'-Dichlordihy messene Fluoreszenz des SiO ₂ - oder Puffer-Kontrollei	Iz-Assay (2′,7′-I /drofluorescein-i durch Oxidatior :n; Limbach et a	Dichlordihydr Diacetat, HD 1 gebildeten I al. (2007)	ofluorescein, HD CF-DA, führte ze Farbstoffs DCF (2	CF, empfindlich f Ilfrei nicht zu Fluc 2′,7′-Dichlorfluore	ür ROS-vermi ɔreszenz); ze ∍scein), ausg∈	ittelte Oxidation; Ilfrei; spektroskc ∍drückt in % der [\]	inaktive ppisch ge- Werte von
SiO ₂ -Partikeln s.o.	30		~ 100 % MTT	100 % (Be- zug)	I	ITR + (SiO ₂ UF)	
0,5% TiO ₂ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	130 %	I	nicht geprüft	

~
g
ZUI
iet
£
ЪС
it (
zitä
Xiz
Jto
<u>Sel</u>
Ē
ŊŊ
he
nc
ราร
Š
ġ
- <it< td=""></it<>
Ė
<u>е</u>
Ę
^o al
е
SLS
li≼
o q
й
Ľ
alie
eriä
ate
Ш
аn
ž
2
ŝ
ġ.
La

Substanz	Dosis, N	lasse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	zué
	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung ROS-Bildung -	- Fluoreszenz-A	vssay, zellfrei	i, Limbach et al. (2007)			
1,6% TiO ₂ /SiO ₂ -P. s.o.	08		~ 100 % MTT	120 %	I	nicht geprüft	
TiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	200 %	+	INH+, ITR + ("TiO ₂ ")	2
0,1% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o.	08		~ 100 % MTT	130 %	I	nicht geprüft	
0,5% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	130 %	I	nicht geprüft	
1,0% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	170 %	+	nicht geprüft	
1,6% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	130 %	+	nicht geprüft	
3% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	120 %	I	nicht geprüft	
5% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o.	08		~ 100 % MTT	~ 100 %	I	nicht geprüft	

it (Fortsetzung)
Gentoxizitä
/ersuche zur
l: In-vitro-\
se Partike
n und divei
Nanomaterialie
Tab. 3.70

Substanz	Dosis, N	Aasse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	zué
	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Fortsetzung ROS-Bildung -	Fluoreszenz-/	Assay, zellfrei	i, Limbach et al. (2007)			
10% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	I	nicht geprüft	
Fe ₂ O ₃ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	80 %	I	nicht geprüft	
0,5% Co ₃ O ₄ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	~ 100 %	I	nicht geprüft	
1,6% Co ₃ O ₄ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	200 %	+	nicht geprüft	
Co ₃ O ₄ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	1700 %	+	nicht geprüft	
0,5% Mn ₃ O ₄ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	3000 %	+	nicht geprüft	
1,6% Mn ₃ O ₄ /SiO ₂ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	% 0006	+	nicht geprüft	
Mn ₃ O ₄ -P. s.o.	30		~ 100 % MTT	37500 %	+	nicht geprüft	

2007
u et al.
(Papageorgio
Gentoxizität
rsuche zur
In-vitro-Ve
e Partikel:
und diverse
Nanomaterialien
Tab. 3.71

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais nersteller- angabe	[mg/mL]	[hm³/cell]	MTT	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Comet-Assay (alkalische V aus Schweiflänge und DNA (2007)	(ersion), Behand A-Menge im Sch	llungsdauer 24 weif, relativer E	h / 3 Tage; primå Effekt bezogen au	åre humane Haut f Kontrolle (1 Tag	-Fibroblasten J / 3 Tage); P	; tail mome apageorgiou	nt (Produkt u et al.
	3,85 x 10 ⁻⁶	0,0005	1,03 / 0,91	1,1 / 0,2	- / -		
	ż	0,5	1,06 / 0,95	2,4 / 1,4	- / +		
CoCr-Nanopartikel, 29,5 ± 6,3 nm	ż	5	0,89 / 0,71	2,7 / 1,1	- / +	nicht ge- prüft	
	ż	200	0,52 / 0,25	3,9 / 1,4	- / +	-	
	22	2000	/	17,1 /	- / +		
	3,85 x 10 ⁻⁶	0,0005	1,00 / 0,97	1,3 / 1,3	- / -		
	ż	0,5	1,00 / 1,05	1,3/1,1	- / -		
CoCr-Mikropartikel, 2.904 ± 1.064 um	ć	5	1,01 / 1,09	2,4 / 1,3	- / +	nicht ge- prüft	
-	ż	500	0,96 / 0,84	2,2 / 1,3	+ / +	-	
	77	2000	1,05 / 0,95	4,1 / 2,2	+ / +		
Papageorgiou et al. (2007) gebe weis auf eine Dosisspanne von 3 den beiden Einheiten ist aber nic	en die Versuchsdos 3,85 x 10 ⁻⁶ bis 77 n cht gleich.	sierungen regelmäf ng/mL entsprecher	3ig als Volumendosis nd 0,0005 bis 5000 µ	pro Zelle in µm³/cel n³/cell, das Verhältn	l an; im Methode is der höchsten	enteil findet sic zur niedrigster	h der Hin- I Dosis in

Fortsetzung)
Gentoxizität (
-Versuche zur
rtikel: In-vitrc
d diverse Pai
anomaterialien un
ab. 3.71 Na

Tab. 3.71 Nanomaterial	ien und diverse	Partikel: In-vitr	o-Versuche zur G	entoxizität (Forts	etzung)		
Substanz, Partikelgröße	,Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gerrials nersteller- angabe	[ˈmɡ/m٢]	[lla3/cell]	MTT (24 h)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Mikrokern-Test mit Cytocha Haut-Fibroblasten; <i>nuclear</i> (2007)	alasin B (= Zytoł <i>blebs nucleo</i> p	kinese-Block-M Masmic bridges	ethode), Behandl (jeweils relativer	ungsdauer 12 h - Effekt bezogen a	+ 12 h Cyto.B; uf Kontrolle);	primäre hi Papageorç	umane jiou et al.
		5	0,89	1,6 / 1,2	+ / -		
CoCr-Nanopartikel, 29,5 ± 6,3 nm		50	0,64	1,7 / 1,2	+ / -	nicht ge- prüft	
		500	0,52	4,2/2,5	+ / +		
Latex-Nanopartikel, 0,058 µm		500		1,5 / 1,5	+ / +	nicht ge- prüft	
		5	1,01	1,0 / 2,1	- / +		
CoCr-Mikropartikel, 2,904 ± 1,064 μm		50	1,00	1,2 / 2,5	- / +	nicht ge- prüft	
		500	0,96	2,6 / 4,7	+ / +		
Latex-Mikropartikel, 3 ± 0,19 µm		500		1,9/2,4	+/+	nicht ge- prüft	

ng
ΓZΠ
sei
b
Щ,
ät
<u>I</u>
õ
e
Ū
zur
ē
Ъ Г
เรา
<e< td=""></e<>
ģ
·vit
<u>–</u>
<u></u>
ţį
Dal
ë
ers
j≤
p
ŋ
en
a
ter
na
JOL
Zai
~
~
3.7
Lal
•

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gerrials nerstener- angabe	[աց/աԼ]	[llm³/cell]	MTT (24 h)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Mikrokern-Test mit Cytocha Haut-Fibroblasten; <i>micron</i>	alasin B (= Zytol <i>uclei</i> (relativer E	kinese-Block-M	ethode), Behandl auf Kontrolle); Pa	ungsdauer 12 h - Ipageorgiou et al.	+ 12 h Cyto.B; (2007)	; primäre hu	imane
		5	68'0	1,2	ı		
CoCr-Nanopartikel, 29,5 ± 6,3 nm		50	0,64	2,2	+	nicht ge- prüft	
		500	0,52	2,6	+	-	
Latex-Nanopartikel, 0,058 µm		500		1,2	I	nicht ge- prüft	
		5	1,01	1,7	+		
CoCr-Mikropartikel, 2,904 ± 1,064 µm		50	1,00	1,5	+	nicht ge- prüft	
		500	0,96	2,5	+		
Latex-Mikropartikel, 3 ± 0,19 µm		500		1,1	ı	nicht ge- prüft	

g)
etzun
Forts
ität (I
Itoxiz
Gen
ie zur
rsuch
0-Ve
n-vitr
el:
Partik
erse
div div
n un
erialie
mate
Nano
Ţ
. 3.7
de

Tab. 3.71 Nanomaterial	ien und diverse	Partikel: In-vitr	o-Versuche zur G	ientoxizität (Forts	etzung)		
Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais hersteller- angabe	[mg/mL]	[hm³/cell]	MTT (24 h)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Immunhistochemische Besi Haut-Fibroblasten; Fluores	timmung von 8- zenzintensität i	OHdG (8-Hydro n 1000 Zellen, I	xy-desoxyguano ∩. 3 h / 24 h Beh∂	sin), Behandlung Indlung; Papage	sdauer 3 h / 2 orgiou et al. (3	24 h; primär 2007)	e humane
		0		3230 / 6460			
CoCr-Nanopartikel,		20	0,64	1430 / 1430	- / -	nicht ge- prüft	
29,5 ± 6,3 nm		500	0,52	3950 / 28340	+ / -		
		2000	-	1790 / 14710	+ / -		
		0		6490 / 2510			
CoCr-Mikropartikel,		09	1,00	15070 / 13270	+ / +	nicht ge- prüft	
2,904 ± 1,064 μm		500	0,96	72470 / 27980	+ / +		
		2000	1,05	3440 / 32290	+ / +		

2007)
(Struwe et al.,
Gentoxizität
vitro-Versuche zur
diverse Partikel: In-
Vanomaterialien und
Tab. 3.72 N

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais nerstener- angabe	[hg/mL]	[µg/cm²]	(% Viabilitat, Alamar Blue)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay (alkalisch), B oder Dunkelheit (<i>kept in th</i> e (2007)	estrahlung mit) <i>dark</i>); Maus-L	Kenon-Lichtbog .ymphomzell-Li	Jenlampe mit Sun nie L5178Y; <i>Oliv</i>	test XLS-Filter zu e <i>tail moment</i> , rel	ır Sonnenlicht lativ zur Kontr	simulation (olle; Struwe	<i>irradiated</i>) e et al.
Kontrolle	0		100	1,00			
	3,1		95 / 102	0,92 / 0,85	I		
Cirmo	12,5		93 / 94	1,21 / 1,06	I	+ HNI	Ŧ
11O2, Sigilia	25		85 / 91	1,71 / 0,76	ı	("TiO ₂ ")	_
	50		80 / 83	1,51 / 0,72	I		
Für die vorliegende Tabelle zeigte in der Studie auch m schreiben Struwe et al. (20 <i>duce false-positive results i</i> Assay wurde als positiv gev	wurde der Mitt it anderen Zyto 37): " <i>We could a</i> <i>n the comet as</i> vertet bei einen	elwert aus zwei toxizitätstests ii <i>demonstrate th</i> say". In der Stu r relativen <i>tail n</i>	i Ansätzen des Co n den geprüften D <i>at a relative viabil</i> die wurden mehre <i>noment</i> größer als	omet-Assays von osen keine Zytot <i>ity of 50 % in the</i> rre organische Ch s 3.	Struwe et al. oxizität. Zum <i>Alamar Blue</i> a nemikalien ge	(2007) gebi Alamar Blue assay does prüft. Der C	ldet. TiO ₂ t Assay <i>not pro</i> - omet-

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[Wr]]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Schwesterchromatidaustau peripherem Blut gesunder N	sch (SCE), Beł Vicht-Raucher;	andlungsdauer SCEs pro Zelle	72 h (in völliger l ; Türkez und Ge	Junkelheit); Prin yikoglu (2007)	närkulturen vo	n Lymphozy	ten aus
TiO ₂ von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO USA)) (unbehande) lt u. DMSO)		ပပ			
[keine Angabe zur Parti- kelgröße]	0,08	1		6,5	ı		
	0,16	2		7,3	+		
	0,24	£		ω	+	+ HNI	۲
<u>.</u>	0,4	5		10,5	+	("TiO ₂ ")	-
<u>.</u>	0,6	7,5		13	+		
	0,8	10		16	+		
	DWB ode	er Potenz		10 SCEs/cell pro µg/mL	+		

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Türkez und Geyikoglu, 2007) Tab. 3.73

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[wr]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Mikrokern-Test Zytokinese- gesunder Nicht-Raucher; ⁹	Block-Methode % Mikrokernhäu	, Behandlungsc ifigkeit (MN) in c	lauer 72 h; Primå Joppelkernigen Z	årkulturen von Ly ellen; Türkez un	mphozyten au d Geyikoglu (2	is periphere 2007)	m Blut
TiO ₂ von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO USA)))) it u. DMSO)		1,2 1,4			
[keine Angabe zur Parti- kelgröße]	0,08	Ļ		1,5	I		
	0,16	2		1,6	I		
	0,24	3		1,7	ı	+ HNI	
	0,4	5		3,3	+	("TiO ₂ ")	_
	0,6	7,5		5	+		
	0,8	10		6,2	+		
	DWB ode	er Potenz		6 % MN pro µg/mL	+		

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Wang et al., 2007a; Abkürzungen siehe S. 4) Tab. 3.74

Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[µg/cm²]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Mikrokern-Test – Zytokines lymphoblastoide Zell-Linie (Wang et al. (2007a)	se-Block-Methoo (B-Zellen); Mik	de, Behandlung rokerne (<i>micror</i>	sdauer 6, 24, 48 iucleated binucle	h; WIL2-NS (AT0 ate = MNBNC) pr	CC,CRL8155), o 1000 doppel	, eine mens Ikernige Zel	chliche len;
TiO ₂ " <i>ultrafine</i> ", 99% Reinheit, Sigma-Aldrich;	0 (6 h)		100 % MTT 100 % TB	8			
Suspension, Partikel- größenverteilung gemes- sen mit High-Perfor-	26		85 % MTT 90 % TB	8,5			
mance Particle Sizer (HPPS), Angabe: <i>particle</i>	65		80 % MTT 80 % TB	14	+	INH +	N
size distribution in the final extract: by volume 6.57 nm (100%); by in-	130		60 % MTT 70 % TB	17	+	("110 ₂ ")	
tensity: 8.2 nm (80.4%) and 196.52 nm (19.4%).	DWB oder Potenz			0,1 MNBNC/1000 pro µg/mL	+		

					Ì		
Substanz	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	[hg/mL]	[hg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung Mikrokern-Tesi	: – Zytokinese-E	3lock-Methode,	Wang et al. (200	7a)			
TiO ₂ " <i>ultrafine</i> ", Fort- setzung	0 (48 h)		100 % MTT 100 % TB	5			
	26		90 % MTT 83 % TB	ω	+		
	65		77 % MTT 80 % TB	10	+		
	130		2 % MTT 3 % TB	1			
	DWB oder Potenz			< 0,1 MNBNC/1000 pro µg/mL	+		

toxizität (Fortsetzung)
ien
ne zur (
Versuc
In-vitro-
artikel: I
l diverse P
ialien und
Nanomater
Tab. 3.74

Substanz	Dosis, N	lasse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refer	enz
	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtun	ig; Autor(en)				
Comet-Assay, Behandlung: %Tail DNA; Wang et al. (2	sdauer 24 h; V 007a)	VIL2-NS (AT	-CC,CRL8155), €	eine menschliche	lymphoblasto	ide Zell-Linie (B-Zellen);
TiO ₂ " <i>ultrafine</i> ", s.o.	0			5		INH+, ITR+	c
	65		> 85 % TB	16	+	("TiO ₂ ")	N
Comet-Assay, Behandlung, olive tail moment; Wang et	sdauer 24 h; V al. (2007a)	VIL2-NS (AT	-CC,CRL8155), €	eine menschliche	lymphoblasto	ide Zell-Linie (B-Zellen);
TiO ₂ " <i>ultrafine</i> ", s.o.	0			2		INH+, ITR+	c
	65		> 85 % TB	11,4	+	("TiO ₂ ")	N
HPRT-Assay, Behandlungs <i>mutant frequency</i> (dimensic	dauer 24 h; W inslos); Wang	'IL2-NS (AT et al. (2007	CC,CRL8155), e a)	ine menschliche I	ymphoblastoi	de Zell-Linie (I	3-Zellen);
TiO ₂ " <i>ultrafine</i> ", s.o.	0			6 x 10 ⁻⁶			
	65			10 x 10 ⁻⁶			
	130			15 x 10 ⁻⁶			
	DWB oder Potenz			6 x 10 ⁻⁸ Muta- tionsfrequenz pro µg/mL	+	INH+, ITR+ ("TiO ₂ ")	7

, 2007b)
et al.
(Wang
ntoxizität
Ge
che zur
o-Versu
n-vitro
Partikel: I
und diverse
Nanomaterialien
Tab. 3.75

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gennals nerstener- angabe	[hg/mL]	[µg/cm²]	MTT [%]	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Mikrokern-Test – Zytokines lymphoblastoide Zell-Linie (6; 24; 48 h; Wang et al. (20	e-Block-Methoc (B-Zellen); Mikı 007b)	de, Behandlung rokerne (<i>micron</i>	sdauer 6, 24, 48 l iucleated binuclea	ղ; WIL2-NS (AT(ate = MNBNC) pr	CC,CRL8155) o 1000 doppe	, eine mens Ikernige Zel	chliche len nach
	0		100; 100; 100	7; 4; 5			
SiO ₂ kristallin, "ultrafein",	30		100; 90; 100	9; 12; 8	+	+ HNI)	0
olgina Aldrich, St. Louis, MO	60		75; 80; 98	12; 12; 10	+	(Quarz)	(c)
	120		60; 40; 60	14; 12; 16	+		
Partikelgrößenverteilung, H solution was measured usir	ligh-Performanc ng the HPPS: b	se Particle Sizer y volume 7.21 r	r (HPPS), Angabe ۱m (100%); by int	:: particle size dis ensity 9.08 nm (7	stribution in th 7.4%) and 12	e final partic 3.21 nm (28	les stock 1.6%).
Comet-Assay, Behandlung:	sdauer 24 h; W	/IL2-NS s.o.; %	Tail DNA; Wang	et al. (2007b)			
	0		100	5		+ HNI)	
SiO ₂ kristallin, "ultrafein", s.o.	60		80	5	I	TR +)	(3)
	120		40	5	ı	(Quarz)	

oxizität (Fortsetzung)
ur Gent
Versuche z
In-vitro-
Partikel:
nd diverse
Nanomaterialien u
Tab. 3.75

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz	
gemais nerstener- angabe	[hg/mL]	[hg/cm ²]	MTT [%]	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz	
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)					
HPRT-Assay, Behandlungs induced mutant frequency (dauer 24 h; W dimensionslos,	IL2-NS (ATCC, Spontanrate su	CRL8155), eine n ubtrahiert); Wang	nenschliche lymp et al. (2007b)	hoblastoide Z	cell-Linie (B-	Zellen);	
	0		100	0				
SiO ₂ kristallin, "ultrafein",	30		06	0,5 x 10 ⁻⁵	ı	+ HNI)	(6)	
s.o.	09		80	0,4 x 10 ⁻⁵	I	(Quarz)	(c)	
	120		40	1,4 x 10 ⁻⁵	+			

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Wang et al., 2007b) Tab. 3.76

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais nersteller- angabe	[hg/mL]	[hg/cm²]	MTT [%]	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Mikrokern-Test – Zytokines lymphoblastoide Zell-Linie (Wang et al. (2007c)	e-Block-Methoo (B-Zellen); Mik	de, Behandlung rokerne (<i>micron</i>	sdauer 10 h; WII iucleated binuclea	-2-NS (ATCC,CF ate = MNBNC) pr	L8155), eine o 1000 doppe	menschliche Ikernige Zel	e len;
SiO ₂ , Quarz Min-U-Sil 5,	0		100	5			
Silica Corp., Berkeley Springs, West Verginia,	60		83	10,5	I	HNI + +	ю
98 % < 5 µm	120		7 9	12	+		
Partikelgrößenverteilung, H by volume: 100 - Peak 1 m	igh-Performanc ean: 11.53 - %	e Particle Sizer by intensity 87.	r (HPPS), Angabe 8 - Peak 2 mean:	e: Z-Average size 172.03 - % by ir	(nm): 12.2 - I itensity: 12.2	^{>} eak 1 mea	n: 7.48 - %
Comet-Assay, Behandlungs	sdauer 10 h; M	/IL2-NS s.o.; %	Tail DNA; Wang	et al. (2007c)			
SiO ₂ Quarz Min-U-Sil 5,	0		100	7,2		+ HNI	ç
s.o.	120		64	7,4	I	ITR +	0
HPRT-Assay, Behandlungs	dauer 10 h; W	IL2-NS s.o.; <i>in</i>	duced mutant free	<i>quency;</i> Wang et	al. (2007c)		
	0		100	0			
SiO ₂ Quarz Min-U-Sil 5, s.o.	60		83	1,3 x 10 ⁻⁵	4	ITR +	ю
	120		64	3,8 x 10 ⁻⁵	-		

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemäß Hersteller- angabe	[hg/mL]	Kondition		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Chromosomenaberrations- Hamster-Ovarialzellen; % 7	Fest, Behandlu Zellen mit struk	ngsdauer 4 h of turellen oder nu	nne / mit Aktivieru merischen Chron	ng (A.) sowie 20 nosomenaberratio	h ohne Aktivi onen; Warhei	erung; chin t et al. (200	esische 7)
	750 - 2500	4 h ohne A.		keine signifi-	ı		
TiO ₂ , <i>"ultrafine"</i> , 79 % Rutil, 21 % Anatas	62,5 - 250	4 h mit A.		ung gegen-	ı	+ TNI + ATI	2
	25 - 100	20 h ohne A.		uber venikei- kontrolle	ı	("110 ₂ ")	
Die Probe wird in der Arbei der Partikelgröße gemäß <i>d</i> <i>the size distribution that fall</i> gleich: TiO ₂ P25 (dessen no Wahrheit et al. (2007) zwar <i>light scattering</i> mit 129,4 nn	bezeichnet als <i>inamic light sca below 100 nm</i> minelle mittler nicht geprüft, c	s <i>"a next genera</i> <i>attering</i> wird mit enthielten, halte e Primärpartikel die Autoren gebe	<i>tional form of ultr</i> 140 nm angeget en die Autoren di größe mit 21 nm en aber Ergebnis	<i>afine TiO₂ particle</i> en. Da diese (un e Bezeichnung <i>ul</i> , bekannt ist) wurd se einer Partikelg	e <i>type (termec</i> d andere TiO, <i>trafine</i> für zuti le in den toxik Irößenmessur	<i>t uf-C)</i> ". Dei 2-Proben) <i>fr</i> effend. Zun ologischen 1g gemäß <i>d</i>	Median ac <i>tions of</i> ۲ Ver- Tests von <i>vnamic</i>

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Warheit et al., 2007) Tab. 3.77

Substanz, Partikelgröße	Dosis, I	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais nersteller- angabe	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/Be	eobachtung; /	Autor(en)				
Comet-Assay (single cell ge im Schweif; Barnes et al. (;	el electrophoresi 2008)	is), Behandlunç	jsdauer 24 h; Ma	aus-Embryo-Fibro	blasten-Zell-I	-inie 3T3-L1	; % DNA
SiO ₂ amorph, Glantreo, Nenndurchm. 30 nm, ge- messen (TEM) 33,21 nm	4 und 40		- (¿)	ca. 7	I	INH n.g. ITR + (SiO ₂ UF)	-
SiO ₂ amorph, Glantreo, Nenndurchm. 80 nm, ge- messen (TEM) 34,89 nm	4 und 40		- (¿)	ca. 7	ı	INH n.g. ITR + (SiO ₂ UF)	-
SiO ₂ amorph, Glantreo, Nenndurchm. 400 nm, gemessen (TEM) 240 nm	4 und 40		- (2)	ca. 7	I	nicht ge- prüft	
Kontrolle				ca. 7			
SiO ₂ amorph, Sigma Lu- dox CL 420883, kolloidal, gemessen (TEM) 21,32 nm	4 und 40		(¿) -	ca. 6	I	nicht ge- prüft	
Kontrolle				ca. 6			

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Barnes et al., 2008) Tab. 3.78

tät (Fortsetzung)
entoxizi
Partikel: In-vitro-Versuche zur G
ien und diverse F
Nanomateriali
Tab. 3.78

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gerrials nerstener- angabe	[hg/mL]	[hg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/Be	eobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay (single cell ge im Schweif; Barnes et al. (2	el electrophores 2008), Fortsetzu	is), Behandlunı ıng	gsdauer 24 h; Má	aus-Embryo-Fibro	blasten-Zell-I	Linie 3T3-L1	; % DNA
SiO ₂ amorph, Sigma Lu- dox CL-X 420891, kolloi- dal, gemessen (TEM) 30,51 nm	4 und 40		(¿) -	ca. 8	I	nicht ge- prüft	
Kontrolle				ca. 6			
Außer mit 24 h wurde auch "Cell viability was assessed tests No cytotoxic effect concentrations (manuscript ist.	mit 3 und 6 h B over a range o vas observed a in preparation).	ehandlungsdal <i>f nanoparticle c</i> <i>it biologically re</i> " Es bleibt in de	uer geprüft, auch <i>concentraions inc</i> <i>ilevant concentra</i> er Arbeit unklar, v	diese Tests ware luding 4 and 40 µ ïons, assumed tc ias mit biologicali	:n negativ. Zu g/mL using a mimic likely ly relevant co	r Zytotoxiziti series of cy potential exp ncentrations	at heißt es: totoxicity oosure gemeint

(Garza et al., 2008)
Gentoxizität
Versuche zur
el: In-vitro-
se Partike
n und diver
Nanomaterialien
Tab. 3.79

Substanz	Do	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	Masse	PAH-Gehalt [mg/g]		"Messwert"	+/-	+/-	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
ROS-Bildung – Fluoreszenz sche Enzyme in den reduzi vermittelte Oxidation ist), B¢ Fluoreszenz des durch Oxic Garza et al. (2008)	z-Assay (inaktiv erten Farbstoff ehandlungsdau dation gebildete	/e Esterform 2′, 2′,7′-Dichlordih ler 48 h; mensc en Farbstoffs DC	7'-Dichlordihydro ydrofluorescein, chliche Lungenep CF (2',7'-Dichlorfl	fluorescein-Diace HDCF, umgewan ithelzell-Linie A54 uorescein), ausg	stat, HDCF-D/ delt, der empf 9; spektrosk edrückt in "Flu	A, wird durc ïndlich für ∈ opisch gem uorimeter-Ei	r zytosoli- ine ROS- essene nheiten";
Medium		0	0,4 MTT	2			0
DMSO		0		2			0
Leer-Filter		0	0,33 MTT	3			0
H ₂ O ₂		0	n.a.	10			
TiO ₂ (Anatas)	5 µg/mL	0	0,32 MTT	8	+	+	-
Chrysotilasbest	5 µg/mL	0	0,13 MTT	30	+	+	3
Carbon black, Aggrega- te/Agglomerate von 20- 80nm-Primärpartikeln	5 µg/mL	0,004	0,13 MTT	70	+	+	2

Substanz	DO	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	Masse	PAH-Gehalt [mg/g]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung ROS-Bildung -	- Fluoreszenz-/	Assay, Zell-Linie	A549, Garza et a	al. (2008)			
MWCNT-R (synthetisch)	5 µg/mL	0,02	0,07 MTT	23	+	(IP+)?	
MWCNT-N (synthetisch)	5 µg/mL	0	0,12 MTT	100	+	(IP+)?	
Kerzenruß, Aggrega- te/Agglomerate von 20- 80nm-Primärpartikeln	5 µg/mL	0,01	0,28 MTT	5	ż	nicht ge- prüft	
Ruß von brennendem Holz, Aggrega- te/Agglomerate von 20- 80nm-Primärpartikeln	5 µg/mL	0,65	0,27 MTT	Q	ć	nicht ge- prüft	
Dieselruß, Aggrega- te/Agglomerate von 20- 80nm-Primärpartikeln	5 µg/mL	0,65	0,27 MTT	7	+	INH + ITR +	N

Substanz	Do	sis	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
	Masse	PAH-Gehalt [mg/g]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Fortsetzung ROS-Bildung -	· Fluoreszenz-A	ssay, Zell-Linie	A549, Garza et a	al. (2008)			
Ruß von brennendem Reifen, Aggrega- te/Agglomerate von 20- 80nm-Primärpartikeln	5 µg/mL	4,91	0,23 MTT	5	د.	nicht ge- prüft	
Ruß von gelber Gasherd- Flamme	5 µg/mL	0,14	0,18 MTT	15	+	nicht ge- prüft	
Ruß von blauer Gasherd- Flamme (mit Nanotube- Strukturen)	5 µg/mL	0,1	0,12 MTT	10	+	nicht ge- prüft	

irtsetzung)
ЕС
Gentoxizität
ersuche zur
In-vitro-V
Partikel: I
d diverse
alien un
Nanomateris
Tab. 3.79

Physikalisch/chemische Eigenschaften der Partikel der In-Vitro-Studie von Karlsson et al. (2008) Tab. 3.80

Partikel		Partikelgröße (nm)		Zeta-Potential	Spezif. Ober- fiächo (m ² /a)
	Hersteller- angabe	Transmissions- Elektronenmikr. (TEM)	Dynamische Lichtstreuung (DLS)		
CuO	42	20-40	220	31	23
TiO ₂	63	20-100	300	6'3	24
ZnO	71	20-200	320	56'9	15
CuZnFe ₂ O4	29	10-100	40-300	34,2	18
Fe ₂ O ₃	29	30-60	1580	-17,3	40
Fe ₃ O ₄	20-30	20-40	< 200	1,8	
Kohlenstoff	< 30	20-40	210	6'9	
Carbon Nanotubes	110-170 x 5000-9000	100-200 x 3000-7000	300-6000	-42,4	

n et al., 2008
(Karlsso
entoxizität
suche zur G
n-vitro-Ver
Partikel: II
und diverse
Nanomaterialien
Tab. 3.81

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	zu
gennais nerstenter- angabe	[Jm/gl]	[µg/cm²]		"Messwert"	+/-	+/-	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröß	e/Beobacht	ung; Autor(en)				
Comet-Assay (Standard) ur genepithelzell-Linie A549; '	nd so genan % DNA im S	inte alkalisch Schweif / % I	ne Version (mit Fl Fpg-sensitive Ste	og-Enzym), Beha Ilen im Schweif;	ndlungsdaue Karlsson et a	r 4 h; menschli I. (2008)	che Lun-
TiO ₂ , 63 nm	80	40	2 % N.	19 / 12	+ / -	INH+, ITR+ ("TiO ₂ ")	
CuO, 42 nm	80	40	95 % N.	41 / 16	+ / +		
ZnO, 71 nm	80	40	37 % N.	12 / 7	+ / +		
CuZnFe ₂ O ₄ , 29 nm	80	40	10 % N.	18 / 15	+/+	hint conrit	
Fe ₂ O ₃ , 29 nm	80	40	5 % N.	6 / 7	- / -		
Fe ₃ O ₄ , 20-30 nm	80	40	2 % N.	13 / 12	- / +		
Kohlenstoff, < 30 nm	80	40	2 % N.	11/6	- / -		
Carbon Nanotubes, (110- 170) x (5000-9000) nm	80	40	21 % N.	15/6	+ / -	(IP +)	
Kontrolle	I	I	2 % N.	7-9 / 6			
In dem Versuch wurden die waren in der Regel geringe beziehen sich auf das Ergel	Partikel au r als bei der bnis des sta	ßerdem in D höchsten D ttistischen T	osierungen von 2 osis (meist nicht ests der Autoren	2 und 40 µg/mL (signifikant); die + für die höchste D	1 und 20 µg/c / - Angaben i osis.	m²) geprüft; die n der Spalte "G	Effekte entox."

ientoxizität (Fortsetzung)	
In-vitro-Versuche zur G	
d diverse Partikel:	
Nanomaterialien un	
Tab. 3.81	

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	zui
gemais nerstener- angabe	[Jm/g/]	[µg/cm ²]		"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße	/Beobachtun	g; Autor(en)				
ROS-Bildung – Fluoreszenz lische Enzyme in den reduz ROS-vermittelte Oxidation i Oxidation gebildeten Farbst	z-Assay (inak ierten Farbst st), Behandlu toffs DCF (2 ⁷	tive Esterform off 2`,7'-Dichl ingsdauer 4 h ,7'-Dichlorfluo	n 2',7'-Dichlordih ordihydrofluores ; menschliche Li rescein), willkürli	ydrofluorescein-L cein, HDCF, umg ungenepithelzell- che Einheiten; K	Diacetat, HDC ewandelt, der Linie A549; F arlsson et al.	F-DA, wird durc empfindlich für luoreszenz des (2008)	:h zytoso- eine durch
TiO ₂ , 63 nm	80	40	2 % N.	10		INH+, ITR+ ("TiO ₂ ")	
CuO, 42 nm	80	40	95 % N.	14	(+)		
ZnO, 71 nm	80	40	37 % N.	6	I		
CuZnFe ₂ O ₄ , 29 nm	80	40	10 % N.	6	I	nicht georiif	
Fe ₂ O ₃ , 29 nm	80	40	5 % N.	9	I		
Fe ₃ O ₄ , 20-30 nm	80	40	2 % N.	7	I		
Kohlenstoff, < 30 nm	80	40	2 % N.	8	I		
Carbon Nanotubes, s.o.	80	40	21 % N.	6	I	(IP +)	
Kontrolle	I	I	2 % N.	7			
In dem Versuch wurden die gel geringer als bei der höc	Partikel auß hsten Dosis (erdem in Dos nicht signifika	ierungen von 40 nt).	µg/mL (20 µg/cm	²) geprüft; die	Effekte waren i	in der Re-

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Mroz et al., 2008) Tab. 3.82

Substanz	Dosis	Zytotoxi-	Gentoxizität	Gentox.	Refere	zu
		zıtat	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/Beobachtung;	Autor(en)				
Comet-Assay, alkalisch (zu che), Behandlungsdauer 3 I Mroz et al. (2008)	r Messung von DNA-Einzelst h; Humanzell-Linie A549 (Alv	'angbrüchen ⁄eolarkarzinc	⊢und alkali-labiler om, Typ-II-Alveola	n Stellen) / ne arepithelzellei	utral (Doppelstra ı-ähnlich); <i>tail m</i>	ıngbrü- ioment;
Kontrolle			1,7 / 0,21			
tert-Butylhyperperoxid	50-75 µM		3,2 / n.g.	- / n.g.		
Schwebstaub, städtisch ^a	100 µg/mL = 25 µg/cm ²		7,4 / 0,52	+/+	nicht geprüft	
Industrieruß ^b	100 µg/mL = 25 µg/cm ²		2,9 / 0,20	- / -	ITR+	1-2
Nano-Industrieruß ^c	100 µg/mL = 25 µg/cm ²		6,6 / 0,21	- / +	INH+, ITR+	2
Benzo[a]pyren	10 µM (2,6 µg/mL)		9,7 / 0,26	- / +		
Nano-Industrieruß + Benzo[a]pyren (26 mg/g)	100 µg/mL = 25 µg/cm ²		6,1 / 0,24	+ / -	INH+, ITR+	2
 ^a Standard Reference Mat ^b Coarse carbon black (CE ^c Nanoparticulate CB, Prin Außerdem untersucht: Cell 	erial® 1649a <i>urban dust</i> , Nat 3), Huber 990, H. Haeffner an tex 90, Degussa, Frankfurt, C cycle status, p53 phosphorul	ional Institut d Co Ltd, Ch Sermany, <i>pri</i> ation at ser1	e of Standards ar hepstow, UK, <i>prin</i> <i>mary diameter</i> 14	ld Technolog <i>nary diameter</i> . nm sion H2A X h	y, Gaithersburg, 260 nm istone phosphor	USA vlated on
serine 139-γH2A.X, BRCA1 <i>large</i> response). Schlussfol Proteine, die an der DNA-R	phophorylation and 53BP1 e gerung: Nanopartikel und rea eparatur beteiligt sind; die Er	xpression. E ktive Sauers eignispfade	crosses in a contract of the second s	nit allen Stäu ieren DNA-S thlen-Karzino	ben (<i>small, mod</i> o chäden, aktiviere genese zu ähne	<i>erate</i> oder en p53 und n.
Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Karlsson et al., 2009) Tab. 3.83

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Referen	Z
gernals nersteller- angabe	[ˈm/brl]	[µg/cm²]	(10 II EXPOSI- tion)	"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröß	e/Beobachtu	ing; Autor(en)				
Comet-Assay (Standard) ur nepithelzell-Linie A549 (Alv (Fpg-sensitive Stellen im So	nd so genan eolarkarzinc chweif); Kaı	nte alkalische m; Typ-II-Pn 'Isson et al. (2	e Version (mit Fpç eumozyten-ähnlic 2009)	g-Enzym), Behan ≿h); % DNA im S	ldlungsdauer chweif / % ox	4 h; menschliche idative DNA dam	e Lunge- age
Fe ₂ O ₃ , Sigma A.: < 1 μm	80	40	4 % N.	12/3	+ / -	ITR+(Hämatit)	1
Fe ₂ O ₃ , Sigma Ald.: 29 nm	80	40	5 % N.	9 / 7	- / -	n.g.	
Fe ₃ O ₄ , Sigma A.: 0,5 µm	80	40	3 % N.	11/5	+ / -	ITR+(Magnetit)	1
Fe ₃ O ₄ , Sig. A.: 20-30 nm	80	40	2 % N.	13 / 12	- / +	nicht geprüft	
TiO ₂ , Sigma Aldrich: 1 μm	80	40	3 % N.	24 / 6	+ / -	INH+, ITR+	1
TiO ₂ , Sigma A.: 63 nm	80	40	2 % N.	19 / 11	+ / -	("TiO ₂ ")	2
CuO, Sigma Aldr.: 3 μm	80	40	31 % N.	12 / 10	+ / -	nicht geprüft	
CuO, Sigma Aldr.: 42 nm	80	40	96 % N.	41 / 16	+/+	nicht geprüft	
Kontrolle			2 % N.	8 / 6			

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
geman nersteller- angabe	[µg/mL]	[µg/cm²]		"Messwert"	+/-	+/-	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße/B	eobachtung; /	Autor(en)				
Mikrokern-Test, Behandlun (2009)	jsdauer 6 h; A	.549 (menschl. I	-ungenkrebs-Zell	-Linie); % Zellen	mit Mikrokerr	ι; Totsuka	et al.
Industrieruß Printex 90,	0	0		1,0 %			
Degussa (Dusseldorf), Primärpartikelgröße 14	0,02	0,003		1,5 %	+		
nm, spez. Oberfl. (De- aussa) 300 m ² /a	0,2	0,034		1,8 %	+	+ HNI	ç
	2	0,34		3,3 %	+	ITR +	N
	20	3,4		2,3 %	+		
	200	34	09 % MI	2,7 %	+		

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Totsuka et al., 2009) Tab. 3.84

Substanz, Partikelgröße	Dosis,	Masse	Dosis, Masse	Gentoxizität	Gentox.	Refe	renz
gemais hersteller- angabe	[hg/mL]	[µg/cm ²]		"Messwert"	-/+	-/+	Potenz
C ₆₀ , Sigma-Aldrich (St.	0	0		0,7 %			
Louis, MO, USA), Pri- märpartikelgröße 0,7 nm	0,02	0,003	keine WI	4,0 %	+		
	0,2	0,034	keine WI	6,6 %	+	nicht ge-	
	2	0,34	keine WI	6,7 %	+	prüft	
	20	3,4	keine WI	8,5 %	+		
	200	34	keine WI	10 %	+		
Kaolin, Engelhard Corp.	0	0		1,0 %			
(Iselin, NJ), weiß kristal- lin, Primärpartikelgröße	0,02	0,003		1,8 %	+		
4,8 µm	0,2	0,034		2,0 %	+	INH n.g.	•
	2	0,34		2,4 %	+	("Kaolin")	_
	20	3,4		2,9 %	+		
	200	34	IM % 09	5,0 %	+		

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Totsuka et al., 2009, Fortsetzung) Tab. 3.84

Nanomaterialien und diverse Partikel: In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Yang et al., 2009) Tab. 3.85

Substanz, mittlere Par-	Dosis,	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Referei	ZL
urkeigroise	[JmL]	[µg/cm²]	WI I [70]	"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße	//Beobachtu	ing; Autor(en)				
ROS-Bildung – Fluoreszenz lische Enzyme in den reduz ROS-vermittelte Oxidation z Farbstoffs DCF relativ zur K	-Assay (inak ierten Farbst u DCF ist), E ontrolle; Ya	tive Esterfor toff 2′,7′-Dicl Behandlungs ng et al. (200	m 2′,7′-Dichlordil hlordihydrofluores sdauer 24 h; prim 39)	ıydrofluorescein scein, HDCF, um äre Mausembryo	-Diacetat, HD gewandelt, de ɔ-Fibroblasten	CF-DA, wird durc er empfindlich für ı (PMEF); Fluore	h zytoso- eine szenz des
Carbon black, 12,3 nm	50		20	2	+	INH+, ITR+ ("Carbon black")	7
Carbon Nanotubes, 8 x < 5000 nm	50		80	4	+	(HP+)	
SiO ₂ , 20,2 nm (unklar, ob amorph oder kristallin, " <i>crystal structure</i> ")	50		70	2	+	(INH +) ITR +	ذ
ZnO, 19,6 nm	50		20	5	+	nicht geprüft	
Kontrolle				1			
Außerdem wurden Dosierur Wirkungsbeziehungen erkei rung der Potenz die Ergebn	ıgen von 5, ′ nnbar, darüb isse für 50 µ	10, 20 und 11 er (d. h. 100 g/mL angege	00 µg/mL geprüft µg/mL) scheint e eben.	t bis zur Dosis 50 in Plateau erreic) µg/mL sind [ht; deshalb si	Josis- nd hier zur Chara	kterisie-

219

it (Fortsetzung)
. Gentoxizitä
ersuche zur
I: In-vitro-V
se Partike
I und diver
Nanomaterialien
Tab. 3.85

Substanz, mittlere Par-	Dosis, I	Masse	Zytotoxizität	Gentoxizität	Gentox.	Refere	nz
urkeigroise	[µg/mL]	[µg/cm ²]	WIII[70]	"Messwert"	+/-	-/+	Potenz
Testmodell; Prüfsystem;	Messgröße	/Beobachtu	ing; Autor(en)				
Comet-Assay, Behandlung; <i>tail moment</i> ; Yang et al. (20	sdauer 24 h; 009)	primäre Ma	usembryo-Fibrob	lasten (PMEF); (Schweiflänge	/ % DNA im Sch	weif / <i>olive</i>
Carbon black, s.o.	5		80	25 / 8 / 4	+	INH+, ITR+	2
<u>.</u>	10		70	55 / 13 / 8	+	("Carbon black")	
Carbon Nanotubes, s.o.	5		75	80 / 22 / 13	+		
	10		70	170 / 38 / 37	+	(11-1-)	
SiO ₂ , s.o.	5		06	22/3/2	+		
	10		92	25 / 7 / 3	+		
ZnO, s.o.	5		85	78 / 23 / 14	+	hinht accurit	
	10		88	80 / 18 / 15	+	писи дериин	
Kontrolle				7/3/1			

Bei Titandioxid ist auf einen besonderen Gesichtspunkt hinzuweisen. Für TiO₂ wird auch so genannte Photogentoxizität diskutiert, d. h. manche Autoren vermuten, TiO₂ könne Gentoxizität nur nach Aktivierung mit Licht oder UV-Strahlung entfalten, in der Dunkelheit der Lunge sei dies nicht relevant. Andere Autoren haben keine Photogentoxizität von TiO₂ festgestellt oder haben auch in Dunkelheit Gentoxizität von TiO₂ festgestellt. So wurde von Nakagawa et al. (1997) beschrieben, dass zwei von vier TiO₂-Proben gentoxische Effekte nur nach Bestrahlung mit einem Sonnenlicht-Simulator zeigten (eine dritte Probe zeigte positive Effekte im Comet-Assay auch in Dunkelheit, die vierte Probe zeigte überhaupt keinen Effekt; die gentoxischen Effekte nach Bestrahlung, aber nicht die Effekte in Dunkelheit, waren von wesentlich reduzierten Überlebensraten der Zellen begleitet). Die Ergebnisse von Nakagawa et al. (1997) mit den vier TiO₂-Porben im Comet-Assay mit Maus-Lymphomzellen sind in Tab. 3.61 dargestellt. Außer mit 5 J/cm² wurde der Comet-Assay auch mit anderen (niedrigeren) Strahlungsintensitäten durchgeführt. Davon wurden nur die Ergebnisse mit TiO₂ p-25 veröffentlicht (es zeigte sich ein intensitätsabhängiger Anstieg). Außerdem wurden mit TiO₂ p-25 weitere Tests im Hinblick auf die Photogentoxizität durchgeführt. Da Photogentoxizität im Kontext unserer Fragestellung nicht interpretierbar ist, sind diese Ergebnisse hier nicht dargestellt.



Abb. 3.8 Korrigierte relative Effekte der diesbezüglich am stärksten wirksamen TiO₂-Proben in dem Comet-Assay von Nakagawa et al. (1997). In der Studie wurde die mittlere Schweiflänge bestimmt, für diese Grafik wurde diese auf die Zytotoxizität bezogen und das resultierende Effektmaß relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben (siehe Text).

In Tab. 3.61 fällt auf, dass die gentoxischen Effekte nach Bestrahlung mit Zytotoxizität verbunden sind, die gentoxischen Effekte nach Exposition mit der Probe WA in Dunkelheit jedoch nicht. Darauf wird auch von Nakagawa et al. (1997) in ihrer Diskussion hingewiesen, wörtlich schreiben sie: *"Without UV/vis light irradiation, only high concentrations of WA TiO*₂ *particles induced primary DNA damage, but no significant cytotoxic response was observed. Because primary DNA damage induced by* *TiO*₂ particles and UV/vis light irradiation is accompanied by cytotoxicity, WA TiO₂ particles probably caused non photodynamic DNA damage through a different mechanism." Um diesen Befund zu illustrieren, wurde für den vorliegenden Bericht für die einzelnen Dosen i ein korrigiertes Effektmaß (KE_i) berechnet, indem die mittlere Schweiflänge (*tail length*, TL_i) mit dem Anteil überlebender Zellen (*survival*, S_i) multipliziert wurde:

 $KE_i = TL_i * S_i$

Zum einfacheren Vergleich der einzelnen TiO_2 -Proben untereinander wurde der Effekt je Dosis relativ zur jeweiligen Kontrolle KE_0 angegeben, d. h. es wurde ein "korrigierter relativer Effekt" (KRE_i) berechnet:

 $KRE_i = KE_i / KE_0 = (TL_i * S_i) / (TL_0 * S_0)$

Die Abb. 3.8 zeigt die Ergebnisse für diejenigen TiO₂-Proben und Test-Ansätze, die in Bezug auf das Effektmaß KRE_i die stärkste Effektausprägung gezeigt haben. Bei der Dosis von 3200 µg/mL des TiO₂ WR zusammen mit 5 J/cm² Bestrahlung war der korrigierte Effekt gegenüber der zugeordneten Kontrolle auf das 2,9fache erhöht. Das ist die stärkste derartige Effektausprägung nach Bestrahlung. Dagegen war bei der Dosis von 3200 µg/mL des TiO₂ WA bei dem Test-Ansatz in Dunkelheit der korrigierte Effekt gegenüber der zugeordneten Kontrolle auf das 4,3fache erhöht. Das ist insgesamt die stärkste derartige Effektausprägung. Ohne Berücksichtigung der Zytotoxizität, d. h. bei gleichzeitig sehr starker Zytotoxizität, wurde nach Bestrahlung mit TiO₂ TP-3 und TiO₂ WA insofern eine stärkere Effektausprägung in dem Comet-Assay festgestellt, als bei den hohen Dosen die mittleren Schweiflängen dann sogar auf das 7,8- bzw. 6fache erhöht waren. Dabei war allerdings das Survival der Zellen auf zirka 13 % reduziert.

Der Wert des für die Abb. 3.8 verwendeten Effektmaßes (KRE_i) ist umso größer je größer die mittlere Schweiflänge ist und je größer der Anteil überlebender Zellen, d. h. je geringer gleichzeitig die Zytotoxizität, ist. Diese Gewichtung wurde hier vorgenommen, weil in den jüngeren Diskussionen Gentoxizität bei gleichzeitiger Zytotoxizität eher als "Abwertung" der Gentoxizität interpretiert wird, d. h. sie wird dann als "sekundär" und damit weniger bedeutsam eingeschätzt. Der Duktus in der Originalarbeit von Nakagawa et al. (1997) erscheint allerdings eher anders: Nakagawa et al. (1997) scheinen eher eine größere "Gefährlichkeit" des Stoffes zu sehen, wenn sowohl Zytotoxizität als auch Gentoxizität erkennbar werden. Ihr Text scheint nahezulegen, die Gentoxizität von WA in Dunkelheit sei "weniger schlimm", weil ja keine Zytotoxizität aufgetreten ist. Dies sei hier als "Randnotiz" erwähnt, es zeigt, wie subjektiv und von vorherrschender Mehrheitsmeinung abhängig die Interpretation toxikologischer Studien sein kann. Angesichts der derzeit in den Diskussionen gesetzten Schwerpunkte erscheint bedeutsam, dass TiO₂ WA bezogen auf den gentoxischen Effekt bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität (d. h. "primärer" Gentoxizität") in Dunkelheit den ausgeprägtesten Effekt aller von Nakagawa et al. (1997) im Comet-Assay geprüften Proben gezeigt hat; der Effekt im Dunkeln ist diesbezüglich stärker als mit jeder Probe nach Belichtung (Abb. 3.8). Diese Anzeichen einer von Lichtstrahlung unabhängigen Gentoxizität stehen im Gegensatz zu geläufigen Interpretationen der Arbeit von Nakagawa et al. (1997), die darauf abheben, nur nach Belichtung sei Gentoxizität aufgetreten (z. B. im Review von Landsiedel et al., 2009). Ein eindeutiger Nachweis einer primären gentoxischen Wirkung von TiO₂-Partikeln ist damit freilich

nicht erbracht, da zwei der vier Proben bei Nakagawa et al. (1997) nur mit Bestrahlung Gentoxizität zeigten und eine Probe überhaupt keine Gentoxizität - auch nicht nach Bestrahlung - zeigte. Diese Befunde lassen daher insgesamt Fragen offen.

Hirakawa et al. (2004) fanden DNA-Schäden durch TiO₂ in der Gegenwart von Cu(II), nachdem die Mischung mit UV-A-Licht von einer UV-Lampe bestrahlt worden war. Struwe et al. (2007) dagegen klassifizierten TiO₂ als nicht-photogentoxisch. Es ist hier zu betonen, dass diese beiden Studien, die sich mit potentieller Photogentoxizität von TiO₂ befassen, in den Tabellen 3.60-3.85 nicht aufgeführt sind. In einem Teil der in den Tabellen aufgeführten Studien wird die Problematik der Photogentoxizität von TiO₂ ausdrücklich angesprochen. Der Titel des Artikels von Gurr et al. (2005) heißt übersetzt: "Ultrafeine Titandioxidpartikel können in der Abwesenheit von Lichtaktivierung oxidative Schäden bei menschlichen Bronchialepithelzellen verursachen". In der "Diskussion" dieses Papiers heißt es übersetzt: "Im Gegensatz zu früheren Berichten zeigen die aktuellen Ergebnisse klar an, dass die Behandlung mit 10- und 20-nm-TiO₂-Partikeln oxidative DNA-Schäden verursacht hat ... in Abwesenheit von Photokatalyse" und "die aktuellen Ergebnisse sprechen dafür, dass intratracheale Instillation von ultrafeinen Partikeln oxidativen Stress hervorrufen kann". Das bedeutet, dass diese Autoren ihre Ergebnisse für relevant für die In-vivo-Situation in der Lunge halten.

Für die positiven Gentoxizitätsbefunde mit Industrieruß, der praktisch frei ist von löslichen krebserzeugenden Substanzen, gibt es keine Indizien für "Lichtabhängigkeit". Bemerkenswert ist dabei, dass eine Autorengruppe die Effekte durch Ruß in die Nähe strahleninduzierter Mechanismen rückt; der Titel des Papiers von Mroz et al. (2008; Tab. 3.82) lautet übersetzt: *"Nanopartikel-verursachte DNA-Schädigung ahmt strahlungs-assoziierte Wege der Krebsentstehung nach*".

Neben Industrieruß wurden auch andere Verbrennungsprodukte untersucht, die im weitesten Sinn als "Ruß" zu bezeichnen sind. In diesem Zusammenhang sei auf die Ergebnisse von Garza et al. (2008) in der Tab. 3.79 besonders hingewiesen. Diese Arbeitsgruppe in Texas, USA, beschäftigte sich intensiv mit verschiedenen unbeabsichtigt entstandenen Nanomaterialien. Es handelte sich dabei um Verbrennungsprodukte von verschiedenen Quellen und um Umweltstäube. Die texanische Arbeitsgruppe hat einen so genannten Thermalpräzipitator entwickelt, ein Gerät, mit dem sich entlang eines erzeugten Temperaturgradienten ultrafeine Partikel und ihre Agaregate und Agglomerate aus der Luft auf einem Objektträger für die Elektronenmikroskopie niederschlagen lassen. Die Arbeitsgruppe setzte das Gerät über mehrere Jahre hinweg zur Sammlung unterschiedlicher Partikel in der Umwelt und in Innenräumen ein. So wurde z. B. der Ruß gesammelt, der von Kerzenflammen, brennendem Holz, brennenden Autoreifen und von den Flammen unterschiedlicher Küchen-Gasherde erzeugt wurde. Die gesammelten Partikel wurden mit verschiedenen Techniken elektronenmikroskopisch untersucht und es wurden auch toxikologische In vitro-Untersuchungen mit solchem Material durchgeführt. Dabei wurden auch anderweitig erworbene - synthetische - Nanomaterialien und außerdem Chrysotilasbest zum Vergleich geprüft. Besonders bemerkenswert ist, dass die Autoren mehrfach berichten, dass die Partikel, die durch "blaue" Flammen von Gasherden entstehen, Nanotube-Strukturen aufweisen. Sie berichten - auch in Form elektronenmikroskopischer Aufnahmen - von großer struktureller Ähnlichkeit zu synthetischen Multiwall Carbon Nanotubes (MWCNT). Und sie vergleichen die langgestreckten Partikel mit Chrysotilasbestfasern. Das unbeabsichtigt entstandene Carbon Nanotube-Material konnte sowohl direkt in der Nähe der Gasherde gesammelt werden als auch in der Abluft der Küchen auf dem Hausdach.

Garza et al. (2008) untersuchten ROS-Bildung in der menschliche Lungenepithelzell-Linie A549 mittels Dichlorfluorescein-Fluoreszenz-Assay. Außerdem wurde Zytotoxizität mittels MTT-Assay bestimmt. Die Autoren ermittelten auch die PAH-Gehalte ihrer Partikelproben, so dass ausgewertet werden kann, ob Zytotoxizität bzw. ROS-Bildung mit dem PAH-Gehalt der Proben zusammenhängen. Ganz offensichtlich ist dies nicht der Fall. Abb. 3.9 zeigt, dass die ROS-Bildung nicht mit dem PAH-Gehalt korreliert. Dagegen scheint es in dem Modell von Garza et al. (2008) bei den untersuchten Proben eine gewisse Korrelation von Zytotoxizität und ROS-Bildung zu geben (Abb. 3.10). In der Studie von Garza et al. (2008) wurden mehrere Stäube nach einheitlichen Kriterien geprüft. Die Studie scheint sich daher für einen Vergleich mit In-vivo-Information anzubieten. Es handelt sich aber bei diesen Stäuben nicht um die "typischen" Proben, die auch in anderen Modellen geprüft wurden, so dass hinsichtlich der In-vivo-Information Lücken bestehen. Für Chrysotil, Carbon black (20-80 nm Primärpartikel), TiO₂ und Dieselruß liegen recht klare In-vivo-Daten vor; für die anderen "Ruße aus der Praxis" ist es aber schwierig, eine klare Zuordnung zu einer Invivo-Potenzklasse vorzunehmen. Zum einen ist dabei nicht klar, wie stabil die Aggregatbildung der Primärpartikel ist, welches also die wirksame Partikelgröße darstellt, zum anderen ist bei dem Ruß von brennenden Reifen eine Bedeutung der PAH - mit unbekanntem Anteil karzinogener Verbindungen - in vivo nicht ohne weiteres auszuschließen. All diese Ruße sind zwar gemäß In-vivo-Daten und gemäß der sachlogischen Überlegung, dass sie als Ruß einen schwerlöslichen Kohlenstoffkern besitzen müssen, zumindest als karzinogen der GBS-Klasse anzusehen, eine Zuordnung zu Potenzklasse 1 oder 2 ist aber ohne spezifische In-vivo-Daten nicht möglich.

Ferner wurden von Garza et al. (2008) Multiwall Carbon Nanotubes (MWCNT) geprüft. Für MWCNT liegen zwar keine In vivo-Inhalationsversuche vor, jedoch wurden in einem Intraperitonealversuch bei einem besonderen Mäusestamm Mesotheliome mit einer mindestens ebenso hohen Potenz wie mit Blauasbest erzeugt (Takagi et al., 2008). Garza et al. (2008) geben an, dass es sich bei der einen ihrer beiden MWCNT-Proben um arc evaporation grown Material handelte, bei der anderen um Ni-catalyst-grown Material. Bei Takagi et al. (2008) findet sich keine entsprechende Angabe. Mir ist nicht bekannt, welche Auswirkung auf die Beschaffenheit des Materials die jeweiligen Synthesemethoden haben. Es ist aber in den Veröffentlichungen belegt, dass es sich hier in allen Fällen um ein Material mit "langen, dünnen" Fasern handelte. Daher sind beide MWCNT-Proben in Tab. 3.67 ebenso wie Chrysotil der In-vivo-Potenzklasse 3 zugeordnet. Unter dieser Voraussetzung besitzt der In-vitro-Test von Garza et al. (2008), bei dem sowohl Chrysotil als auch beide MWCNT-Proben starke ROS-Bildung gezeigt haben, gute Prädiktivität. Dies - und damit auch die Korrelationsanalyse von Abb. 3.11 - kann aber eher als Szenario denn als "Beweis" angesehen werden, da In-vivo-Daten speziell von den MWCNT-Proben der Garza-Gruppe nicht vorliegen.



Abb. 3.9 Korrelationsanalyse für den Versuch von Garza et al. (2008). Die Korrelation zwischen PAH-Gehalt der Proben und ROS-Bildung ist schlecht (es wurde je Probe dieselbe Massendosis an Staub eingesetzt).



Abb. 3.10 Korrelationsanalyse für den Versuch von Garza et al. (2008). Es besteht eine gewisse Korrelation zwischen Zytotoxizität der Proben und ROS-Bildung.



Abb. 3.11 Korrelationsanalyse für den Versuch von Garza et al. (2008). Zur Beurteilung der Korrelation zwischen In-vivo-Karzinogenität (Tab. 3.25) und ROS-Bildung in vitro steht nur begrenzte Information zur Verfügung.

Zhang et al. (1998) verglichen Befunde nach intratrachealer Instillation bei Ratten mit Ergebnissen zur Radikalbildung im zellfreien System. Als zellfreies Testsystem für Radikalbildung durch Partikel wurde DNA des Bakteriophagen Φ X174 in der Reduplikationsform I (RFI) verwendet. Der Test basiert darauf, dass Radikale die RFI DNA, die eine Superhelixstruktur aufweist, angreifen und Einzelstrangbrüche hervorrufen und die Superhelixstruktur zerstören können. Der Effektnachweis erfolgt durch Trennung der entstandenen DNA-Fraktionen mit Hilfe von Gelelektrophorese. Es wurden Quantifizierungen der Elektrophoresebanden mittels computergestützter Bildanalyse vorgenommen. Effektparameter ist der Verlust (*depletion*) an Superhelix-DNA. In den Instillationsversuchen wurden das Lungenfrischgewicht und mehrere Parameter in der Lungenspülflüssigkeit (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) bestimmt. Tab. 3.64 zeigt ausgewählte Ergebnisse, bezüglich In-vivo-Daten sind hier die Befunde nach der längsten Beobachtungszeit (30 Tage) aufgeführt.

In der Studie von Zhang et al. (1998) wurden insgesamt 4 Stäube untersucht. Als Vergleichsstaub wurde Quarz DQ12 intratracheal instilliert, in vitro wurde der Quarz jedoch nicht geprüft, auf diesen Staub wird hier deshalb nicht eingegangen. Offensichtlich wurden in der Studie Nanomaterialien geprüft. Sie wurden aber nicht so bezeichnet, sondern sie wurden als ultrafeine Pulver bezeichnet, der Begriff der Nanomaterialien war damals nicht gebräuchlich (der Begriff "ultrafein" war damals üblich für alle Arten von Stäuben mit Primärpartikelgrößen von kleiner als 100 nm). Folgende Proben wurden von Zhang et al. (1998) eingesetzt: *Nickel powder, ultrafine* (= nano), INABTA and Co., Ltd., Japan, mittlerer Durchmesser 20 nm, spezifische Oberfläche 43,8 m²/g; *Co powder* (Co und Co₃O₄), *ultrafine* (= Nano), INABTA and Co., Ltd., Japan mittlerer Durchmesser 20 nm, spezifische 47,9 m²/g; *TiO*₂ powder, ultrafine (= Nano), lot no. TiO₂-55-1 INABTA and Co., Ltd., Japan, mittlerer Durchmesser 28 nm, spezifische Oberfläche 45 m²/g.





Die In-vitro- und In-vivo-Daten von Tab. 3.64 zeigen übereinstimmend eine stärkere Wirkung der Co- und Ni-Partikel im Vergleich zu den TiO₂-Partikeln. Dies ist wenig überraschend, da spezifische Toxizität von Co und Ni bekannt ist und TiO₂ als chemisch reaktionsträge gilt. Abb. 3.12 zeigt beispielhaft Korrelationsanalysen mit den Daten von Tab. 3.64: Es ist die beste und die schlechteste Korrelation zwischen den In-vitro-Ergebnissen mit Φ X174-DNA und In-vivo-Daten gezeigt. Die In-vitro-Daten korrelieren hier gut mit der Lipidperoxidation in vivo und relativ schlecht mit dem Lungenfrischgewicht. Bemerkenswert ist: Auch TiO₂ hat zu Effekten geführt, sowohl in vivo als auch im zellfreien System. Weitergehende Interpretationen der In vivo/vitro-Korrelationen erscheinen wenig sinnvoll, weil nur wenige "Messpunkte" aufgrund der geringen Zahl von 3 Stäuben vorliegen.

Tab. 3.70 zeigt Ergebnisse von Limbach et al. (2007). Die Besonderheit dieser Versuchsreihe ist, dass dort eine relativ große Zahl von Nanopartikeltypen speziell für die biologischen Tests hergestellt wurden und dass dabei SiO₂-Partikel eine zentrale Rolle spielen. Die SiO₂-Partikel wurden mit verschiedenen Anteilen unterschiedlicher Metalle dotiert. Die stärksten Effekte wurden mit reinem Manganoxid erzielt. Die Versuchsreihe ist hier wegen ihres Umfangs und der aktuellen Bedeutung des Nano-Themas aufgenommen, sie ist insgesamt aber schwierig zu interpretieren, da es für die zum Teil sehr speziellen Partikeltypen keine Vergleichsdaten aus Langzeit-Tierversuchen gibt. Für Manganoxid liegt kein Langzeit-Inhalationsversuch vor (bezüglich Manganverbindungen im Allgemeinen ist eine NTP-Studie mit oraler Verabreichung von maximal 15000 ppm Mangan(II)sulfatmonohydrat im Futter bekannt; bei Ratten traten dort keine Zeichen von karzinogener Wirkung auf, bei B6C3F₁-Mäusen gab es zweifelhafte Evidenz für Karzinogenität in Form von wenigen Adenomen und mehreren fokalen Hyperplasien in der Schilddrüse; NTP, 1993b).

Tab. 3.71 enthält Ergebnisse einer Studie von Papageorgiou et al. (2007). Es wurden Partikel aus Kobalt-Chrom-Legierungen (CoCr) geprüft. Eine Probe wurde als Nanopartikel bezeichnet; sie waren offenbar speziell für die Studie hergestellt. Die Publikation enthält für diese Probe keine Angaben zum Co/Cr-Verhältnis und zu Verunreinigungen. Die Partikelform wird als rund bis oval beschrieben, die mittlere Größe wurde mit 29,5 ± 6,3 nm ermittelt. Eine zweite Probe wird auch als Mikropartikel beschrieben, es handelte sich um käuflich erhältliches Material: Osprey Metals Ltd., Neath, UK. Die Elementzusammensetzung wird folgendermaßen angegeben: 62,2 % Co, 28,7 % Cr, 6,3 % Mo, 0,87 % Si, 0,71 % Ni, 0,59 % Mn, 0,53 % Fe, 0,057 % C. Diese Zusammensetzung sei ähnlich dem für Gelenkprothesen verwendeten Material. Der mittlere Partikel-Durchmesser ist mit 2,904 ± 1,064 µm angegeben. Außerdem wurden in einem Teil der Versuche zwei Proben von Latexpartikeln als Kontrolle eingesetzt; Latexpartikel, Sigma, UK; mittlerer Durchmesser 0,058 µm bzw. 3 ± 0,19 µm. Die CoCr-Proben wurden in einer ganzen Reihe von Tests geprüft, beginnend mit EPR-Messungen im zellfreien System, gefolgt von mehreren In-vitro-Tests mit Human-Fibroblasten.

In den Versuchen von Papageorgiou et al. (2007) mit *Electron paramagnetic resonance* (EPR) Spektroskopie zur Prüfung von Radikalbildung im zellfreien System wurden als Spin-Trap zwei verschiedene Substanzen verwendet: DMPO (5,5'-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid) und PP-H (1-Hydroxy-4-phosphonooxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin). DMPO wurde mit und ohne H_2O_2 verwendet, in der Variante ohne H_2O_2 wurde kein Effekt festgestellt, die Ergebnisse mit H_2O_2 deuten auf Bildung des Hydroxylradikals (Fenton-Reaktion). Der Effekt mit PP-H (empfindlicher als DMPO) deutet auf Bildung von Superoxid-Anionen. Es wurden dosisabhängige Effekte gefunden, als Ergebnis linearer Regressionsanalyse (sehr gute Korrelation) geben die Autoren folgende Regressionsgleichungen an (mit x: particle concentration [µg/mL]):

DMPO Signal Nanopartikel: y = 322,09 x + 8208,8 Mikropartikel: y = 46,06 x + 8921,7

PP-H Signal Nanopartikel: 1,6841 x + 123,89 Mikropartikel: 0,1347 x + 94,021

Diese Ergebnisse bedeuten, dass die CoCr-Nanopartikel im zellfreien System rund 10fach stärker reaktive Sauerstoffspezies gebildet haben als die CoCr-Mikropartikel. Es ist nicht ganz einfach zu entscheiden, inwieweit diese Ergebnisse aus dem zellfreien System in den Tests an Fibroblasten bestätigt wurden (Tab. 3.71). Ganz offensichtlich haben die CoCr-Nanopartikel deutlich stärker zytotoxisch gewirkt. In Tab. 3.71 sind diesbezüglich nur Ergebnisse mit dem MTT-Test aufgeführt; außerdem wurden auch Versuche zur LDH-Freisetzung durchgeführt, welche die Befunde des MTT-Tests bestätigen. Im Comet-Assay waren die Nanopartikel bezüglich des gemessenen *tail moment* stärker wirksam als die Mikropartikel, jedoch bei gleichzeitig stärkerer Zytotoxizität. Die Mikropartikel zeigten dagegen Gentoxizität ohne deutliche Zytotoxizität. Bei der immunhistochemischen Bestimmung der 8-OHdG-Bildung zeigten sich die Mikropartikel insgesamt stärker wirksam als die Nanopartikel.

3.2.3.2 Ergebnisse des Projektes NanoCare

In den Jahren 2006 bis 2008 wurde die Frage möglicher adverser Wirkungen von Nanomaterialien intensiv auf Behördenebene behandelt, und es waren erhebliche Anstrengungen erkennbar, in Form so genannter Dialoge die Öffentlichkeit anzusprechen. Es wurde eine Forschungsstrategie der Bundesbehörden entwickelt und es wurde eine Nanokommission der Bundesregierung gebildet. Im Zuge dieser Anstrengungen wurde auch das Projekt NanoCare ins Leben gerufen. Im Jahr 2007 wurde dazu vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) ein "Flyer" herausgegeben, der im Internet als pdf-Datei verfügbar war. Darin heißt es: "Das Projekt beinhaltet drei Schwerpunkte, die unmittelbar aufeinander aufbauen: Wissenserzeugung, Wissensmanagement und Wissenstransfer. Die Untersuchungen von Primärpartikeln, Aggregaten und Agglomeraten sowie deren Verhalten in biologischen Medien und ihre Auswirkung auf biologische Systeme stehen im Zentrum der Wissenserzeugung." Als Projektleiter ist dort Prof. Dr. Harald F. Krug (Forschungszentrum Karlsruhe GmbH) angegeben. Die Reihe der "Verbundpartner" bzw. die Liste der Mitglieder des "NanoCare-Konsortiums" ist relativ lang, sie enthält neben einigen Universitäten z. B. die Firmen BASF, Bayer, Evonik Degussa und Solvay. Der Etat des Projektes liegt im Millionenbereich. Im Flyer heißt es: "Der Forschungsverbund NanoCare wird durch das BMBF mit 5 Mio. Euro gefördert. Weitere 2,6 Mio. Euro tragen Industriepartner bei."

Im Sommer 2009 erschienen unter der Internetadresse des Projektes NanoCare (www.nanopartikel.info) mehrere Dokumente, die über abschließende Ergebnisse des Projektes berichten. In dem Projekt wurden verschiedene Nanomaterialien mittels toxikologischer In-vitro- und In-vivo-Methoden untersucht. In-vitro- und In-vivo-Ergebnisse wurden verglichen. Ich habe versucht, die verfügbare wissenschaftliche Information unter www.nanopartikel.info möglichst vollständig zu erfassen und beziehe mich demzufolge insbesondere auf folgende 4 Quellen:

- 1. Ein deutschsprachiger Bericht von 19 Seiten: NanoCare (2009)
- Ein englischsprachiger Bericht von 158 Seiten, der als wissenschaftlicher Abschlussbereicht (Final Scientific Report) ausgewiesen ist: Kuhlbusch et al. (2009); darin u.a. folgende Kapitel:

J. Schnekenburger, R. Landsiedel, M. Wiemann, S. Brill, J. Bruch, D. Geiger, D. Hahn, A. Kroll, H.F. Krug, C.-M. Lehr, L. Ma-Hock, S. Mülhopt, K. Nau, J. Pauluhn, H-R. Paur, M.H. Pillukat, J. Ragot, U.F. Schäfer, C. Schulze, K. Tönsing, D. Wesner, K. Wiench, W. Wohlleben, S. Zünkeler: 4. Toxicological Studies, S. 22-47

J. Bruch, R. Landsiedel, L. Ma-Hock, J. Pauluhn, J. Ragot, M. Wiemann: 4.4. In vivo Test Systems, S. 48-67

M. Wiemann, J. Bruch: 4.5. Comparison of in vitro and in vivo Findings, S. 68-73 H.F. Krug, T.A.J. Kuhlbusch and the NanoCare-Consortium: 6. Conclusions, S. 89-92

- 3. Informationen einer Ergebnispräsentation von 13 Seiten: Landsiedel (2009)
- 4. Eine Mitteilung von Krug (2009) auf der Website vom Oktober 2009.

Auf der Website werden außerdem wissenschaftliche Zeitschriftenpublikationen der NanoCare-Ergebnisse angekündigt. Diese lagen aber bei Redaktionsschluss noch nicht vor; daher die Beschränkung auf die genannten 4 Quellen und die Besprechung in diesem eigenen Abschnitt.

Der Bericht von Kuhlbusch et al. (2009) ist als "wissenschaftlicher Abschlussbericht" ausgewiesen. Man erwartet daher dort Originaldaten, die für weitere Analysen verwendet werden können. Der Bericht enthält aber praktisch keine absoluten Zahlenwerte über Versuchsergebnisse. Es gibt dort z. B. keine Tabellen, in denen Design und Zahlenwerte für die Ergebnisse der In-vivo-Studien zweifelsfrei abgelesen werden können. Vielmehr enthält der Bericht nur sehr begrenzt Informationen über relative Effektausprägungen der Inhalationsstudie (Grafiken). Angaben zu Mittelwerten der eigentlichen Messwerte sowie Angaben zur Streuung (z. B. Standardabweichung) fehlen völlig. Die toxikologischen Untersuchungen in dem NanoCare-Projekt scheinen drei Grundansätze zu umfassen: In-vitro-Zytotoxizitätstests, Toxizitätstests nach einmaliger intratrachealer Instillation bei Ratten, Kurzzeit-Inhalationsversuche an Ratten (5 bzw. 28 Tage Exposition). Die starke Komprimierung der Information wird vielleicht in gewisser Weise verständlich, wenn man den Umfang der Untersuchungen zu erfassen versucht: Es wurde eine Vielzahl von Parametern gemessen und in den In-vitro-Untersuchungen wurden - je Parameter und Staubtyp - mehrere (bis zu 11) Zellarten eingesetzt (Zitat, S. 39: "Up to eleven cell lines representing different routes and different lines of exposure (see Table 4.2) were exposed to 24 different nanoparticles (see Table 4.4)". Die Tabelle 4.13 bei Bruch et al. (2009) enthält lediglich eine Aufzählung von (geplanten?) Untersuchungsparametern für den "Standardinhalationstest"; dazu zählt das Stichwort "Histopathologie", außerdem mehrere Parameter der klinischen Chemie und des oxidativen Stresses, zusätzlich 67 (siebenundsechzig) Zytokine.

Ich versuche hier, die im Hinblick auf die Frage der Karzinogenität wesentlichen Ergebnisse der In-vitro-Studien zu beschreiben, kann aber nicht ausschließen, Versuchsdetails oder Ergebnisse in der Darstellung bei Kuhlbusch et al. (2009) missverstanden zu haben. Ausgesprochene Gentoxizitätstests wie Mikrokern- oder Comet-Assay wurden bei NanoCare wohl nicht durchgeführt. Im Hinblick auf die Frage der Karzinogenität erscheint mir unter den bei NanoCare gemessenen Parametern die ROS-Bildung von besonderem Interesse. Intrazelluläre ROS-Bildung wurde bei NanoCare mithilfe der Dichlorfluorescein-Methode gemessen, eine Methode, die auch im Abschnitt 3.2.3.1 (im weiteren Sinne) als Gentoxizitätstest aufgeführt ist. Tab. 3.86 enthält die Aufzählung der in dem NanoCare-Projekt angegebenen Zellarten. Der Bericht von Kuhlbusch et al. (2009) enthält im Anhang eine Tabelle, die eine Übersicht über die Verwendung der Zellarten in den In-vitro-Versuchen und die dort bestimmten Parameter gibt. Es ist dort von zwei approaches die Rede. In Table 4.3 bei Schnekenburger et al. (2009) sind für den ersten Versuchsansatz (approach) die LOEL-Werte aufgeführt (LOEL = lowest observed effect level, d. h. die niedrigste Dosis, die zu einem beobachtbaren Effekt geführt hat). Nach der Übersichtstabelle im Anhang von Kuhlbusch et al. (2009) erscheint der zweite Versuchsansatz (approach) wesentlich umfangreicher, im ersten Versuchsansatz wurden nur zwei Zellarten eingesetzt und es wurde z. B. die ROS-Bildung nicht bei allen eingesetzten Stäuben bestimmt. Ich gehe deshalb hier auf diesen ersten Versuchsansatz nicht näher ein, sondern gebe die Ergebnisse des umfangreichen zweiten Versuchsansatzes hier in Tab. 3.87 und 3.88 so wieder, wie ich sie gemäß der Table 4.4 von Schnekenburger et al. (2009) verstanden habe.

Tab. 3.86Zell-Linien der In-vitro-Versuche des NanoCare-Projektes gemäß Table4.2 von Schnekenburger et al. (2009)

Abkürzung	Zellart (Zell-Linien)
A549	Adenokarzinom der menschlichen Lunge, Alveolarepithel, ähnliche Pneumozyten Typ II
CaCo2	Colonkarzinom des Menschen, ähnlich Colonepithel
CaLu3	Adenokarzinom der menschlichen Lunge
HaCaT	Keratinozyten der menschlichen Haut
MDCK	Hundeniere, epithelähnlich
MDCK II	Hundeniere, epithelähnlich
NIH3T3	Mausembryofibroblasten
NRK52E	Rattenniere, epithelähnlich
RAW267.4	Ratten-Makrophagen, durch AML-Virus transformiert
RLE-6TN	Rattenlunge, ähnlich Alveolarepithel
T84	Colonkarzinom des Menschen, ähnlich Colonepithel
MonoMac6	Menschliche Leukämiezellen, ähnlich Monozy- ten/Makrophagen

Alle Tests des zweiten In-vitro-Ansatzes von Schnekenburger et al. (2009) wurden mit folgenden Staubkonzentrationen durchgeführt: $0,01 - 0,1 - 1 - 5 - 10 \mu g/cm^2$. Bei ZnO wurden außerdem die Konzentrationen von 2,5 und 7,5 $\mu g/cm^2$ verwendet. In ihrer Table 4.4 führen die Autoren LOEL-Werte für die Parameter der metabolischen Aktivität (MTT), der LDH-Freisetzung und der ROS-Bildung auf. In den Fällen, in denen auch mit der höchsten Dosis von 10 $\mu g/cm^2$ kein Effekt gemessen wurde, ist der Eintrag "no effect" vorgenommen. Diese Ergebnisse sind hier in Tab. 3.87 übernommen, wobei zur Verdeutlichung jeweils alle untersuchten Zellarten aufgeführt sind. Außerdem sind in Tab. 3.87 Kennwerte der physikalischen Staubeigenschaften aufgenommen, wie ich sie aus verschiedenen Teilen des Berichts von Kuhlbusch et al. (2009) recherchiert habe.

Tab. 3.88 fasst die Ergebnisse der ROS-Bildung des umfangreichen In-vitro-Ansatzes von Schnekenburger et al. (2009) zusammen. Demnach wurden 22 Staubarten mit je 10 Zell-Linien geprüft, 2 Staubarten mit je 11 Zell-Linien. Dies ergibt insgesamt 242 "Tests" (mit je mindestes 5 Dosen, d. h. mindestens 1.200 "ROS-Messwerte"). Von diesen 242 Tests waren 47 grundsätzlich "positiv" (d. h. mit mindestens einer Dosis wurde eine erhöhte ROS-Bildung festgestellt), 195 Tests waren "negativ" (d. h. mit keiner Dosis wurde eine erhöhte ROS-Bildung festgestellt); eine Angabe, auf welchem Signifikanzniveau oder nach welchen sonstigen Kriterien ein Messwert als erhöht bewertet wurde, habe ich dabei in den Berichten nicht gefunden.

Tab. 3.87Ergebnisse zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, gemäß Dichlorfluorescein-Methode) in dem In-vitro-Versuch des NanoCare-
Projektes gemäß Table 4.4 von Schnekenburger et al. (2009). Die Do-
sen waren von 0,01 bis zu 10 μg/cm² abgestuft.

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCare-Bemerkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
TiO ₂	A549	no effect
Nr. 1.1a	CaCo2	no effect
17 nm	HaCaT	no effect
117 m²/g	MDCK	no effect
Organic molecules on the surface	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
TiO ₂	A549	no effect
Nr. 1.1b	CaCo2	no effect
17 nm	НаСаТ	no effect
117 m²/g	MDCK	no effect
Organic molecules on the surface	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
TiO ₂	A549	5
Nr. 1.2	CaCo2	5
27.2 nm	HaCaT	5
52 m²/g	MDCK	5
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	5
	NRK52E	5
	RAW267.4	10

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCare-Bemerkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
TiO ₂	RLE-6TN	5
Nr. 1.2 (Fortsetzung)	T84	10
	CaLu3	10
Industrieruß	A549	5
Nr. 2	CaCo2	5
14 nm	HaCaT	5
	MDCK	5
	MDCK II	5
	NIH3T3	5
	NRK52E	5
	RAW267.4	5
	RLE-6TN	5
	T84	5
	CaLu3	5
CeO ₂ -A	A549	10
Nr. 3.1	CaCo2	1
14 nm	HaCaT	10
63 m²/g	MDCK	10
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	10
	NRK52E	10
	RAW267.4	10
	RLE-6TN	10
	CaLu3	no effect
CeO ₂ -B	A549	no effect
Nr. 3.2	CaCo2	no effect
20 nm	HaCaT	10
44 m²/g	MDCK	10
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	10

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCare-Bemerkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
CeO ₂ -B	NRK52E	10
Nr. 3.2 (Fortsetzung)	RAW267.4	10
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
CeO ₂ -C	A549	10
Nr. 3.3	CaCo2	10
23 nm	HaCaT	10
38 m²/g	MDCK	10
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	10
	NRK52E	10
	RAW267.4	10
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
CeO ₂ -D	A549	no effect
Nr. 3.4	CaCo2	no effect
14 nm	HaCaT	no effect
63 m²/g	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
CeO ₂	A549	no effect
Nr. 3.5	CaCo2	no effect
70 nm	НаСаТ	no effect
33 m²/g	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect

Tab. 3.87	Ergebnisse zur Bildun	a reaktiver Sauersto	offspezies (Fort	setzuna)
	J	J		

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCare-Bemerkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
CeO ₂	NRK52E	no effect
Nr. 3.5 (Fortsetzung)	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
AIOOH	A549	no effect
Nr. 5.1	CaCo2	no effect
40 nm	HaCaT	no effect
47 m²/g	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
AIOOH	A549	no effect
Nr. 5.2	CaCo2	no effect
70 nm	HaCaT	no effect
159 m²/g	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
Ti-Zr-Mischoxid	A549	no effect
Nr. 6.1	CaCo2	no effect
28.2 nm	НаСаТ	no effect
44 m²/g	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCare-Bemerkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
Ti-Zr-Mischoxid	NRK52E	no effect
Nr. 6.1 (Fortsetzung)	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
Ti-Zr-Mischoxid	A549	no effect
Nr. 6.2	CaCo2	no effect
36.8 nm	HaCaT	no effect
54 m²/g	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
Ti-Zr-Mischoxid	A549	10
Nr. 6.3	CaCo2	no effect
37.2 nm	HaCaT	10
51 m²/g	MDCK	10
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	10
	NRK52E	10
	RAW267.4	10
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
Al-Ti-Zr-Mischoxid	A549	no effect
Nr. 7.1	CaCo2	no effect
25.8 nm	HaCaT	no effect
43 m²/g	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCaro Bomorkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
Al-Ti-Zr-Mischovid		no effect
Nr. 7.1 (Fortsetzung)		no effect
		no offect
ALTI Zr Mischovid		no offect
	A049	
34.7 nm		
$45 \text{ m}^2/\text{a}$	HaCal	no effect
-5 m /g	MDCK	no effect
		no effect
	NIH313	
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
Al-Ti-Zr-Mischoxid	A549	no effect
Nr. 7.3	CaCo2	no effect
34.7 nm	HaCaT	no effect
48 m²/g	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
ZrO ₂	A549	no effect
Nr. 8.1	CaCo2	no effect
36.8 nm	HaCaT	no effect
122 m²/g	MDCK	no effect
Organic molecules on the surface	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCare-Bemerkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
ZrO ₂	NRK52E	no effect
Nr. 8.1 (Fortsetzung)	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
ZrO ₂	A549	no effect
Nr. 8.2	CaCo2	no effect
31.0 nm	HaCaT	no effect
122 m²/g	MDCK	no effect
Organic molecules on the surface	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
ZrO ₂	A549	no effect
Nr. 8.3	CaCo2	no effect
460.7 nm	HaCaT	no effect
96 m²/g	MDCK	no effect
Organic molecules on the surface,	MDCK II	no effect
strongly aggiomerated	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
ZnO	A549	no effect
Nr. 9	CaCo2	no effect
150 nm	HaCaT	no effect
	MDCK	no effect
	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCare-Bemerkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
ZnO	NRK52E	no effect
Nr. 9 (Fortsetzung)	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
BaSO ₄	A549	no effect
Nr. 10	CaCo2	no effect
37.5 nm	HaCaT	no effect
41.4 m²/g	MDCK	no effect
Strongly agglomerated	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
SrCO ₃ 1	A549	no effect
Nr. 11.1	CaCo2	no effect
18.5 nm	HaCaT	no effect
33 m²/g	MDCK	no effect
hydrophilic; strongly agglomerated	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect
	NRK52E	no effect
	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect
SrCO ₃ 2	A549	no effect
Nr. 11.2	CaCo2	no effect
17 nm	HaCaT	no effect
8.9 m²/g	MDCK	no effect
hydrophobic; strongly agglomerated	MDCK II	no effect
	NIH3T3	no effect

Partikeltyp NanoCare-Nummer Primärpartikeldurchmesser (Median) Spezifische Oberfläche NanoCare-Bemerkungen	Zell-Linie	Lowest ob- served effect level [µg/cm ²] bzw. "no effect"
SrCO ₃ 2	NRK52E	no effect
Nr. 11.2 (Fortsetzung)	RAW267.4	no effect
	RLE-6TN	no effect
	CaLu3	no effect

Tab. 3.87	Ergebnisse zu	r Bildung reaktiv	er Sauerstoffspezies	(Fortsetzung)
-----------	---------------	-------------------	----------------------	---------------

Der Bericht von Kuhlbusch et al. (2009) enthält in dem Kapitel "Comparison of in vitro and in vivo Findings" von Wiemann und Bruch zwei Grafiken zum Vergleich von Invitro- und In-vivo-Ergebnissen. Die In-vitro-Daten betreffen dabei einen Summenindex aus Versuchen mit Meerschweinchen-Alveolarmakrophagen. Nach Angaben bei Schnekenburger et al. (2009) könnte der Summenindex Werte für LDH, Glucuronidase, TNF und "functional cell damage" beinhaltet haben. Insgesamt waren in den Invitro-Versuchen Parameter wie z. B. "Metabolische Aktivität" (MTT-Assay), LDH-Freisetzung (Laktatdehydrogenase), ROS-Bildung (Fluoreszenztest mit Dichlorfluorescein), Glutathiongehalt und IL-8-Freisetzung (Interleukin 8) untersucht worden. Ausgesprochene Gentoxizitätstests wie Mikrokerntest oder Comet-Assay wurden offenbar nicht durchgeführt. Die Versuche mit den Alveolarmakrophagen stellen nur einen relativ kleinen Teil der gesamten In-vitro-Tests von Kuhlbusch et al. (2009) dar. Es kann hier nicht überprüft werden, inwiefern die Ergebnisse an den Meerschweinchen-Alveolarmakrophagen "repräsentativ" für die anderen eingesetzten Zellarten sind. Bei den In-vivo-Daten der Korrelationsgrafiken bei Wiemann und Bruch (2009) handelt es sich um Ergebnisse nach intratrachealer Instillation. Weil die Detail-Ergebnisse der bei NanoCare durchgeführten Experimente für den Leser kaum (bzw. gar nicht) in Zahlen zu fassen sind, beschränke ich mich hier auf die Darstellung der aus der Abbildung auf Seite 72 bei Wiemann und Bruch (2009) abgegriffenen Daten, ebenfalls in Form einer Grafik (Abb. 3.13). Neben den Daten für die Dosen 120 pg/Zelle versus 4,8 mg/Lunge enthält die Abbildung von Wiemann und Bruch (2009) auch ein Korrelationsdiagramm für die Dosen 30 pg/Zelle versus 0,6 mg/Lunge. Auch für diese niedrigeren Dosen wird dort eine Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von R^2 = 0,729 postuliert ("In case that low particle concentrations were used in vivo (0.6 mg per rat lung) and in vitro (15 pg/cell) we found a linear correlation of seven nanoscaled materials"). Es ist darauf hinzuweisen, dass Krug (2009) veröffentlicht hat, aus dem Bericht von NanoCare (der diese Korrelationen enthält) sei ersichtlich, dass für die geprüften Nanomaterialien keinerlei gesundheitlichen Bedenken bestünden (s. w. u.).

Tab. 3.88Zusammenfassung der NanoCare-Ergebnisse von Tab. 3.87. Es han-
delt sich um 24 Stäube, davon wurden für 6 Stäube in mindestens ei-
nem Ansatz ein Effekt festgestellt.

Partikeltyp, NanoCare-Nummer	ROS-Bildung + / -	Anzahl Zell-Linien mit dem Befund
TiO ₂ , Nr. 1.1a, beschichtet	-	10
TiO ₂ , Nr. 1.1b, beschichtet	-	10
TiO ₂ Nr. 1.2 unbeschichtet	+	10
	-	1
Industrieruß, Nr. 2	+	11
CeO_2 -A Nr 3.1	+	8
	-	2
CeO ₂ -B Nr 3.2	+	5
	-	5
$CeO_{2}C$ Nr 3.3	+	7
	-	3
CeO ₂ -D, Nr. 3.4	-	10
CeO ₂ , Nr. 3.5	-	10
Alooh, Nr. 5.1	-	10
Alooh, Nr. 5.2	-	10
Ti-Zr-Mischoxid, Nr. 6.1	-	10
Ti-Zr-Mischoxid, Nr. 6.2	-	10
Ti-Zr-Mischovid Nr. 6.3	+	6
	oxid, Nr. 6.3	
Al-Ti-Zr-Mischoxid, Nr. 7.1	-	10
Al-Ti-Zr-Mischoxid, Nr. 7.2	-	10
AI-Ti-Zr-Mischoxid, Nr. 7.3	-	10
ZrO ₂ , Nr. 8.1, beschichtet	-	10
ZrO ₂ , Nr. 8.2, beschichtet	-	10
ZrO ₂ , Nr. 8.3, beschichtet	-	10
ZnO, Nr. 9	-	10
BaSO ₄ , Nr. 10	-	10
SrCO ₃ 1, Nr. 11.1	-	10
SrCO ₃ 2, Nr. 11.2, hydrophobisiert	-	10
Summe	+	47
	-	195



Abb. 3.13 Korrelationsdiagramm für die Ergebnisse des NanoCare-Projektes, berechnet für die Stäube BaSO₄ (Nr. 10), CeO₃ (Nr. 3.1), AlOOH (Nr. 5.1), TiO₂ (Nr. 1.2), Ti-Zr (Nr. 6.3), CeO₂ (Nr.4.4), Ti-Al-Zr (Nr. 7.3) und DQ12 gemäß Figure 4.27 von Wiemann und Bruch (2009). Für alle Nanomaterialien dieser Korrelation wurde von Krug (2009) als Schlussfolgerung die Wertung veröffentlicht "keine gesundheitlichen Bedenken".

Die Berichte - und die darin enthaltenen Interpretationen - von NanoCare sind im Hinblick auf die Bewertung von In-vitro- und In-vivo-Versuchen zur Toxizität von Nanopartikeln von Bedeutung (Abschnitt 3.2.3.3). Zusätzlich zu den in Tab. 3.86-3.88 und Abb. 3.13 dargestellten Daten ist das NanoCare-Projekt deshalb nachfolgend weiter kommentiert.

Insgesamt wurde bei NanoCare eine größere Zahl an Proben von Nanomaterialien eingesetzt. Bedauerlich ist allerdings, dass nur in geringem Umfang Kontrollstäube mitgeführt wurden. Die wesentliche Frage im Vorfeld war doch: Weisen Nano-Stäube mit einer bestimmten chemischen Zusammensetzung (TiO₂, ZrO₂ usw.) andere toxische Eigenschaften auf als "normale" Feinstäube derselben chemischen Zusammensetzung? Es hätte sich daher angeboten, mehrere "Paare" von Nano- und Feinstäuben vergleichbaren Materials zu prüfen. Offenbar wurde dies nur in relativ geringem Umfang realisiert. Es hätte sich ferner angeboten, Dieselruß als Kontrollstaub mitzuführen. Auch dies ist nicht geschehen. Es wurde allerdings Quarz DQ12 als Kontrollmaterial eingesetzt, aber auch dies nicht in dem umfangreichen In-vitro-Ansatz, der oben beschrieben wurde. Eine Inhalationsstudie mit 5 Tagen Exposition wird von den Autoren als "Standard" hervorgehoben. Dort wurden zwei Paare von Nano-/Mikrostäuben vergleichbarer chemischer Zusammensetzung eingesetzt: TiO₂ und ZnO. Leider habe ich so etwas wie Zahlenwerte für die Ergebnisse zum ZnO nicht gefunden, sondern nur - in Form von Netzgrafiken - relative Werte (keine absoluten Messwerte, keine Streuungen) für das TiO₂. Es erscheint nicht sinnvoll, auf einzelne Werte einzugehen; stattdessen werden die Schlussfolgerungen bzw. Interpretationen der Autoren nachfolgend kurz betrachtet.

Bei NanoCare (2009) findet sich auf Seite 11 eine große Kapitel-Überschrift "*Multitalent Titandioxid*". Offensichtlich zugehörend zu diesem Kapitel finden sich dann auf S. 13 unter der Abschnittsüberschrift "*Eingeatmetes nanostrukturiertes Titandioxid*" folgende Zusammenfassungen (wörtlich):

"Kurz zusammengefasst lauten die Ergebnisse dieser Experimente:

- In den getesteten niedrigen Konzentrationen (die f
 ür den Alltag allerdings schon als hoch gelten) rufen die Nanopartikel keine krankhaften Reaktionen in der Lunge hervor.
- Höhere Konzentrationen lösen im Tierversuch eine Entzündungsreaktion aus, die sehr gut mit den Ergebnissen der In-vitro-Experimente übereinstimmt.
- Es war deutlich nachweisbar, dass größere Partikel bei gleicher Masse geringere Reaktionen hervorrufen als die Nanopartikel."

Leider habe ich in dem umfangreichen Bericht von Kuhlbusch et al. (2009) keine ähnlich deutliche zusammenfassende Aussage gefunden. Dort werden vielmehr andere Schwerpunkte gesetzt. Den englischen Text auf S. 51 mag man folgendermaßen übersetzen:

"Deshalb wurde eine valide Methode für einen Inhalationsversuch entworfen und verwendet, um sowohl Aufnahme als auch Effekte inhalierter Partikel in der Lunge zu messen.

Eine Kurzzeit-Inhalationsstudie wurde als die Standard-Inhalationsmethode entwickelt, um die Toxizität von Aerosolen aus Nanomaterialien zu prüfen. Eine Kurzzeit-Studie ist eine angemessene und hinreichende (adequate and sufficient) Methode, um die Toxizität inhalierter Partikel zu bestimmen auf der Grundlage der Hypothese, dass die Haupteffekte in der Lunge Entzündung und / oder Zytotoxizität sind. Demnach stünden alle beobachteten Effekte in Beziehung zu diesen ersten Ereignissen; d. h. Langzeit-Effekte (einschließlich Fibrose und Krebs) wären das Ergebnis des Fortschreitens dieser ersten Entzündungen oder zytotoxischen Veränderungen. Deshalb ist es möglich, die Toxizität inhalierter Nanomaterialien durch Messung dieser frühen, primären Effekte zu bestimmen."

Diese grundsätzlichen Aussagen sind von Bedeutung im Zusammenhang mit Äußerungen auf S. 92, die sich folgendermaßen übersetzen lassen:

"Alle untersuchten Proben brachten no-effect-levels (NEL) oder lowest-observedeffect-levels (LOEL) in dem Mehr-Dosis-Ansatz hervor, wie er in den Inhalationsstudien oder in den Tierversuchen mit intratrachealer Instillation (akute Toxizität für 3 Tage) durchgeführt wurde."

Dies ist nun sicherlich zu den Hauptaussagen auf S. 13 des deutschen Kurzberichtes (NanoCare, 2009) in Bezug zu setzen (s.o.):

"In den getesteten niedrigen Konzentrationen (die für den Alltag allerdings schon als hoch gelten) rufen die Nanopartikel keine krankhaften Reaktionen in der Lunge hervor." Außerdem ist auf folgenden Satz bei NanoCare (2009) hinzuweisen (s. 10):

"Als Vergleichsmaterial verwendeten die Wissenschaftler des Forschungsprojektes NanoCare zwei bereits gut untersuchte Nanomaterialien: Titandioxid und den Industrieruß Carbon Black."

Hier ist also von *"gut untersuchten Nanomaterialien: Titandioxid und Industrieruß*" die Rede. Es wird außerdem auf weiteres (vermeintliches) Vorwissen zurückgegriffen indem nämlich eine *"*Hypothese" zugrunde gelegt wird, wonach eine inhalative Exposition für 5 Tage praktisch alle relevanten Informationen auch für chronische Expositionen liefere. Es wird vorausgesetzt, dass einzig Entzündungseffekte bzw. Zytotoxizität auch für chronische Wirkungen einschließlich Karzinogenität verantwortlich sind. Und die Annahme von *"*Hypothesen" als Tatsache wird noch weiter ausgedehnt: Offenbar sieht man es als (nahezu) erwiesen an, dass man eine Wirkungsschwelle gefunden hat, wenn unter 5 oder 10 Tieren kein Effekt nachweisbar ist (oder man sieht als hinreichenden Grund an, sich so zu verhalten, als ob eine Schwelle bestünde). Dies ist aber bei krebserzeugenden Stoffen nicht gerechtfertigt. Eine einfache wissenschaftliche Grundregel lautet: Das Fehlen des Nachweises eines Effekts ist nicht gleichbedeutend mit dem Nachweis des Fehlens eines Effekts. Eine komplexere Erläuterung erkenntnistheoretischer und methodischer Gesichtspunkte bei der Interpretation signifikanter und nicht-signifikanter Ergebnisse findet sich hier in Kapitel 4.

Einer der führenden Wissenschaftler des NanoCare-Projekts hat folgende zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse des NanoCare-Projekts veröffentlicht (Krug, 2009): "NanoCare, dessen Sprecher ich ja 3 Jahre gewesen bin, hat auf seiner Internetseite (www.nanopartikel.info) den Abschlussbericht und eine Broschüre veröffentlicht aus denen ersichtlich ist, dass für die 30 verschiedenen Materialien und Modifikationen, die getestet wurden, keinerlei gesundheitliche Bedenken bestehen." Diese Interpretationen sind von erheblicher Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse von In-vitro-Gentoxizitätstests und werden in den nächsten Abschnitten in die Diskussion der vorliegenden positiven Befunde aus Gentoxizitätstests einbezogen. Zunächst jedoch ein Kommentar zu den Dosishöhen des NanoCare-Projekts.

Bis in die 1990er Jahre betrug der Allgemeine Staubgrenzwert 6 mg/m³ (A-Fraktion). Gemäß der Begründung von Greim (1997) wurde er auf 1,5 mg/m³ (A) erniedrigt. Grundlage war dabei u.a. die Feststellung, dass eine langfristige Staubbeladung von **1 µL Staubvolumen je Gramm Rattenlunge** zu einer *deutlichen* Verlangsamung der Lungenreinigung führt, sowie die Berechnung, dass eine solche Lungenbeladung im Fall einer langfristigen Exposition des Menschen gegenüber **1,2 mg/m³** (Dichte 1) eintreten würde. Für Stäube mit den relativ häufigen Materialdichten von 2-2,5 wurde daraus der Allgemeine Staubgrenzwert (AStGw) der TRGS 900 in Höhe von **3 mg/m³** abgeleitet. Der AStGw soll vor gesundheitlichen Schäden auch bei langfristiger vollschichtiger Exposition schützen, er gilt nicht für ultrafeine Partikelfraktionen.

Die Materialdichte der bei NanoCare geprüften Stäube war größer als 1. Bei Schnekenburger et al. (2009) heißt es (S. 34): *It may thus be calculated that a lung burden* of e.g. **1.2 mg particles** corresponds to a mean cellular dose of **92-120 pg/alveolar** *macrophage* (AM). Und (S. 39): All tests were performed with nanoparticle concentrations of 0.01 μ g/cm², 0.1 μ g/cm², 1 μ g/cm², 5 μ g/cm², 10 μ g/cm² and standardised according to newly developed SOPs. Cells were used at 3 x10⁵ cells/well which corresponds at a concentration of **10 \mug/cm²** to 10.7 pg/cell or **10.7 \mug/10⁶ cells** (well area 0.32 cm²). Und (S. 47): In the majority of the cases there was a dose dependent increase in at least one of these parameters using a concentration range of 15-120 μ g/10⁶ AM (corresponding to 18-128 μ g/cm²).

Daraus ist zu schließen, dass bei einem Staub mit der Dichte 2 das Grenzwertkriterium des AStGw bei zirka 2 mg je Lunge erreicht ist und dass eine Dosis in einem Invitro-Versuch mit Alveolarmakrophagen (AM) bei zirka 200 µg/10⁶ Zellen oder bei zirka 200 µg/cm² liegen müsste, um gerade eine (durchschnittliche) Belastung der AM unter Grenzwertbedingungen zu simulieren. In dem NanoCare-Versuch mit frisch präparierten AM wurde diese Dosis in keinem Fall erreicht. Alle Dosen waren dort niedriger als es rechnerisch einer Belastung unter Bedingungen des AStGw entspricht. Trotz dieser "Unterdosierung" wurden mit fast allen Stäuben Effekte festgestellt; bei einigen Stäuben wurden sogar Effekte bei der Dosis von 18 µg/cm² festgestellt, die um einen Faktor 10 niedriger ist als es rechnerisch dem AStGw-Szenario entspricht. Die Dosisvergleiche von Schnekenburger et al. (2009) für die In-vitro- und In-vivo-Situation beziehen sich zwar nur auf Alveolarmakrophagen und nicht auf andere Lungenzellen oder auf Zell-Linien, die verschiedenen Organen entstammen. Ohne Bezug zur In-vivo-Situation lassen sich aber die Dosen der übrigen In-vitro-Versuche mit den Dosen in dem AM-Versuch vergleichen. Die niedrigste Dosis war dabei mit 0,01 µg/cm² um einen Faktor von mehr als 1.000 niedriger als die höchste Dosis von 128 μ g/cm² in dem AM-Versuch, die ja ihrerseits eher niedriger ist als es dem Arbeitsplatz-Szenario entspricht. Selbst wenn man eine etwaige höhere Empfindlichkeit der Zell-Linien berücksichtigt, dann ist es auch in Anbetracht der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und vor allem in Anbetracht der wissenschaftlichen Gesetzmäßigkeiten der statistischen Signifikanz (Kapitel 4) nicht überraschend, wenn mit solchen Dosen No Observed Effect Levels gefunden werden. Dies ist nicht mit einem Beleg für eine Wirkungsschwelle gleichzusetzen.

3.2.3.3 Zwischenfazit zur Prädiktivität von In-vitro-Gentoxizitätstests für Nanomaterialien und sonstige Stäube

Tab. 3.89 enthält die Zusammenfassung der Tabellen 3.60 -3.85, jetzt geordnet nach Partikelarten. Für die Tab. 3.89 sind folgende Oberbegriffe für verschiedene Partikelarten eingeführt:

- Industrieruß
- Sonstige Partikel aus Kohlenstoff (oder mit hohem Gehalt an elementarem Kohlenstoff)
- Siliziumdioxid
- Titandioxid (und SiO₂/TiO₂)
- Eisenoxid (und SiO₂/Fe-oxid)
- Cobaltoxid (und SiO₂/Co-oxid)
- Manganoxid (und SiO₂/Mn-oxid)
- Kupferoxid
- Zinkoxid
- Diverse Metalloxide

Für Nanomaterialien aus allen diesen Gruppen liegen positive Befunde aus Invitro-Gentoxizitätstests vor. Die Zahl der Plus-Zeichen in Tab. 3.89 ist ungefähr genauso groß wie die Zahl der Minus-Zeichen. Positive Befunde wurden also häufig, aber nicht konsistent in allen Versuchen beobachtet.

In einer sehr umfangreichen Studie des so genannten NanoCare-Projekts (Abschnitt 3.2.3.2) wurden in überwiegender Mehrzahl negative Ergebnisse für verschiedene Parameter von In-vitro-Tests erhalten. Unter den Parametern der NanoCare-in-vitro-Versuche zielt insbesondere die Messung der ROS-Bildung in Richtung auf "Gentoxizität". Der Anteil der positiven Tests in einem großen In-vitro-Ansatz zur ROS-Bildung in dem NanoCare-Projekt beträgt 19 %.

Wie bereits weiter oben beschrieben ist es schwierig zu bestimmen, inwieweit die aufgeführten Staubarten in biologischem Milieu schädliche Ionen freisetzen bzw. löslich sind. Alveolengängige Fraktionen von Industrieruß, Titandioxid und Eisenoxid wurden als alveolengängige granuläre biobeständige Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität definiert und für die neun Worte wurde die Abkürzung GBS eingeführt. Sofern solche Stäube aus nanoskaligen Primärpartikeln bestehen, kann die Bezeichnung **Nano-GBS** verwendet werden.

Ziel der Zusammenstellung für Tab. 3.89 ist es herauszufinden, welche Faktoren oder Substanzeigenschaften das Ergebnis eines In-vitro-Gentoxizitätstets überwiegend bestimmt haben. Die Tab. 3.89 enthält keinen Vergleich mit In-vivo-Daten, dies wird weiter unten erläutert. Zunächst seien die In-vitro-Daten für sich betrachtet. Für die zusammenfassende Bewertung sind die Ergebnisse in Tab. 3.89 folgendermaßen konzentriert. Es sind nur Ergebnisse von Versuchen mit Zellkulturen aufgeführt, d. h. Versuche im zellfreien System sind für Tab. 3.89 nicht berücksichtigt. Je Staub und je Testmodell sind nur die Daten einer Dosis aufgeführt. Sofern ein positives Testergebnis in mindestens einer Dosis auftrat, ist die niedrigste Dosis angegeben, bei welcher der Effekt auftrat (d. h. der Lowest Observed Effect Level, LOEL). Sofern in einem bestimmten Testmodell einer bestimmten Studie mit einem bestimmten Staub kein positives Ergebnis festgestellt wurde, dann ist die höchste verwendete Dosis angegeben (d. h. der No Observed Effect Level, NOEL). Sofern in einer Versuchsreihe mehrere Zellarten für dasselbe Testmodell verwendet wurden, also z. B. V79- und Hel 299-Zellen für den Comet-Assay von Zhong et al. (1997), dann sind nur die Daten des empfindlicheren Ansatzes angegeben (in der Spalte "Prüfsystem" ist aber erkennbar, dass mehr als 1 Zellart benutzt wurde).

Auf diese Weise gibt Tab. 3.89 folgende Information wieder: Es ist erkennbar, ob mit einem bestimmten Staub in einem bestimmten Testmodell einer bestimmten Studie mit mindestens 1 Zellart ein gentoxischer Effekt im Sinne des Tests aufgetreten ist und welches dabei die niedrigste Dosis war (LOEL); sofern kein solcher Effekt aufgetreten ist, dann ist die höchste Dosis erkennbar (NOEL). Auf diese Weise war es möglich, die Ergebnisse von Schnekenburger et al. (2009) aus der außerordentlich umfangreichen NanoCare-Studie folgerichtig in einen Zusammenhang mit den Ergebnissen der anderen Studien mit "Nanomaterialien" zu bringen.

Tab. 3.89Nanomaterialien und diverse Partikel: Zusammenfassung der In-vitro-
Versuche zur Gentoxizität (Abkürzungen zu "Test" siehe letzte Seite
der Tabelle; Abkürzungen der Quellen s. Tab. 3.90).

Substanz	Dosis	Test	Prüf-	Gen-	Auto	ren
oder fein)	LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a
Industrieruß						
Industrieruß, Ca- bat Co., UF	137,9 µg/cm²	Comet (alk.)	V79/Hel 299	-	Zho97	-
Industrieruß Vul- can M (UF)	0,016 µg/mL	Comet	THP- 1/A549	+	DPC01	-
Industrieruß "fein"	1 µg/cm ²	Mikrokern (ZB)	RAW- 264.7	+	Pom06	-
Ruß Printex 90 UF	75 μg/mL	Comet (omF)	FE1 MML	+	Jac07	-
Ruß Printex 90 UF	75 μg/mL	lacZ/cll	FE1 MML	+	Jac07	-
Carbon black, UF	5 µg/mL	ROS	A549	+	Gar08	-
Industrieruß	100 μg/mL = 25 μg/cm ²	Comet (alk.)	A549	-	Mro08	-
Nano- Industrieruß	100 μg/mL = 25 μg/cm ²	Comet (alk.)	A549	+	Mro08	-
Industrieruß	100 μg/mL = 25 μg/cm ²	Comet (neut.)	A549	-	Mro08	-
Nano- Industrieruß	100 μg/mL = 25 μg/cm ²	Comet (neut.)	A549	-	Mro08	-
Industrieruß Nr. 2	5 µg/cm²	ROS	diverse	+	Sch09	+
Industrieruß Prin- tex 90, UF	0,02 μg/mL = 0,003 μg/cm ²	Mikrokern	A549	+	Tot09	-
Carbon black, UF	50 µg/mL	ROS	PMEF	+	Yan09	-
Carbon black, UF	5 µg/mL	Comet	PMEF	+	Yan09	-

Substanz	Dosis	Test	Prüf-	Gen-	Autoren	
oder fein)	(NOEL, LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a
Sonstige Partikel Kohlenstoff)	aus Kohlensto	ff (oder mit	hohem Geł	nalt an e	elementa	rem
C ₆₀ , Sigma- Aldrich UF	0,02 μg/mL = 0,003 μg/cm ²	Mikrokern	A549	+	Tot09	-
Kohlenstoff, UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	-	Kar08	-
Kohlenstoff, UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	-	Kar08	-
Kohlenstoff, UF	80 μg/mL = 40 μg/cm ²	ROS	A549	-	Kar08	-
Dieselrußpartikel (fein)	1,6 µg/mL	Comet	A549/TH P-1	-	DPC01	-
Dieselruß	5 µg/mL	ROS	A549	+	Gar08	-
Kerzenruß	5 µg/mL	ROS	A549	?	Gar08	-
Ruß von bren- nendem Holz	5 µg/mL	ROS	A549	?	Gar08	-
Ruß von bren- nendem Reifen	5 µg/mL	ROS	A549	?	Gar08	-
Ruß von gelber Gasherd-Flamme	5 µg/mL	ROS	A549	+	Gar08	-
Ruß von blauer Gasherd-Flamme	5 µg/mL	ROS	A549	+	Gar08	-
MWCNT-R (syn- thetisch)	5 µg/mL	ROS	A549	+	Gar08	-
MWCNT-N (syn- thetisch)	5 µg/mL	ROS	A549	+	Gar08	-

Tab. 3.89 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Substanz	Dosis	Test Prüf-	t Prüf- Ge		Auto	ren
oder fein)	LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a
Sonstige Partikel	aus Kohlensto	ff, Fortsetzı	ung		_	
Carbon Nanotu- bes	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	+	Kar08	-
Carbon Nanotu- bes	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	I	Kar08	_
Carbon Nanotu- bes	80 μg/mL = 40 μg/cm²	ROS	A549	-	Kar08	-
Carbon Nanotu- bes	50 μg/mL	ROS	PMEF	+	Yan09	-
Carbon Nanotu- bes	5 μg/mL	Comet	PMEF	+	Yan09	-
Siliziumdioxid						
SiO ₂ , Quarz Min- U-Sil 5 (fein)	17,2 µg/cm ²	Comet (alk.)	V79/Hel 299	+	Zho97	-
SiO ₂ amorph, Spherisorb	68,9 µg/cm²	Comet (alk.)	V79/Hel 299	+	Zho97	-
Quarz	100 µg/mL	lacZ/cll	FE1 MML	-	Jac07	-
Quarz	100 µg/mL	Comet (omF)	FE1 MML	-	Jac07	-
SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	-	Lim07	-
SiO ₂ kristallin, UF, Sigma Aldrich	30 µg/mL	Mikrokern (ZB)	WIL2-NS	+	Wan07 b	-
SiO ₂ kristallin, UF, Sigma Aldrich	120 µg/mL	Comet	WIL2-NS	-	Wan07 b	-
SiO ₂ kristallin, UF, Sigma Aldrich	120 µg/mL	HPRT	WIL2-NS	+	Wan07 b	-

 Tab. 3.89
 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Substanz	Substanz Dosis Test		Prüf-	Gen-	Autoren	
oder fein)	LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a
Siliziumdioxid, Fo	ortsetzung	<u> </u>				
SiO₂, Quarz Min- U-Sil 5	120 µg/mL	Mikrokern (ZB)	WIL2-NS	+	Wan07 c	-
SiO ₂ Quarz Min- U-Sil 5	120 µg/mL	Comet	WIL2-NS	-	Wan07 c	-
SiO ₂ Quarz Min- U-Sil 5	120 µg/mL	HPRT	WIL2-NS	+	Wan07 c	-
SiO₂ amorph, Glantreo 1, UF	40 µg/mL	Comet	3T3-L1	-	Bar08	+
SiO₂ amorph, Glantreo 2, UF	40 µg/mL	Comet	3T3-L1	-	Bar08	+
SiO₂ amorph, Glantreo, fein	40 µg/mL	Comet	3T3-L1	-	Bar08	+
SiO ₂ amorph, Sigma Ludox CL 420883, UF	40 µg/mL	Comet	3T3-L1	-	Bar08	+
SiO ₂ amorph, Sigma Ludox CL- X 420891, UF	40 µg/mL	Comet	3T3-L1	-	Bar08	+
SiO ₂ , "crystal structure", UF	50 µg/mL	ROS	PMEF	+	Yan09	-
SiO ₂ , "crystal structure", UF	5 µg/mL	Comet	PMEF	+	Yan09	-
Titandioxid (und SiO ₂ /TiO ₂)						
TiO ₂ P25, UF	20 µg/cm ²	Mikrokern (ZB)	RLE	-	Lin97	+
TiO ₂ UV-TITAN M160, UF	20 µg/cm ²	Mikrokern (ZB)	RLE	-	Lin97	+
TiO ₂ Kemira AFDC (fein)	20 µg/cm ²	Mikrokern (ZB)	RLE	-	Lin97	+

Tab. 3.89	Nanomaterialien 2	Zusammenfassu	ng in	vitro,	Fortsetzung
-----------	-------------------	---------------	-------	--------	-------------

Substanz (UF = ultrafein; oder fein)	Dosis (NOEL, LOEL)	Test	Prüf- system	Gen- tox. +/-	Autoren	
					Quelle	"pri- vat" ^a
Titandioxid (und SiO ₂ /TiO ₂), Fortsetzung						
TiO ₂ p-25 Nip- pon, UF	800 µg/mL	Comet	L5178Y	-	Nak97	-
TiO ₂ WA (fein)	800 µg/mL	Comet	L5178Y	+	Nak97	-
TiO ₂ WR (fein)	3200 µg/mL	Comet	L5178Y	-	Nak97	-
TiO ₂ TP-3 (fein)	3200 µg/mL	Comet	L5178Y	-	Nak97	-
TiO ₂ , Sigma	0,08 µg/mL	SCE	CHO-K1	+	Lu98	-
TiO ₂ , Sigma	0,08 µg/mL	Mikrokern (kZB)	CHO-K1	+	Lu98	-
TiO ₂ , UF	0,5 µg/cm ²	Mikrokern	SHE-F.bl.	+	Rah02	-
TiO ₂ , fein	10 µg/cm²	Mikrokern	SHE-F. bl.	-	Rah02	-
TiO ₂ , Anatas (Hombikat UV100), UF	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Comet (omF)	BEAS-2B	+	Gur05	-
TiO ₂ , Anatas (Millenium PC500), UF	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Comet (omF)	BEAS-2B	+	Gur05	-
TiO ₂ , Anatas (Kanto Chem.), fein	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Comet (omF)	BEAS-2B	+-	Gur05	-
TiO ₂ , Anatas (Aldrich-Sigma), fein	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Comet (omF)	BEAS-2B	+-	Gur05	-
TiO ₂ , Rutil (Kanto Chem.), fein	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Comet (omF)	BEAS-2B	+	Gur05	-
TiO ₂ , Anatas (Kanto Chem.), fein	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Comet (Fpg)	BEAS-2B	+	Gur05	-

 Tab. 3.89
 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung
Substanz	Dosis	Test	Prüf-	Gen-	Auto	ren			
oder fein)	(NOEL, LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a			
Titandioxid (und	Titandioxid (und SiO ₂ /TiO ₂), Fortsetzung								
TiO ₂ , Rutil (Kanto Chem.), fein	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Comet (Fpg)	BEAS-2B	+	Gur05	-			
TiO ₂ , Anatas + Rutil	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Comet (Fpg)	BEAS-2B	+	Gur05	-			
TiO ₂ , Anatas (Hombikat UV100), UF	Anatas bikat 0), UF 10 μg/mL = 1,77 μg/cm ²		BEAS-2B	+	Gur05	-			
TiO ₂ , Anatas (Kanto Chem.), fein	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Mikrokern	BEAS-2B	+	Gur05	-			
TiO ₂ , Anatas (Aldrich-Sigma), fein	10 μg/mL = 1,77 μg/cm²	Mikrokern	BEAS-2B	-	Gur05	-			
TiO ₂ , Rutil (Kanto Chem.), 200 nm	tutil (Kanto 10 μg/mL =), 200 nm 1,77 μg/cm ²		BEAS-2B	+-	Gur05	-			
0,5% TiO ₂ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	-	Lim07	-			
1,6% TiO ₂ /SiO ₂ , UF	1,6% TiO ₂ /SiO ₂ , 30 µg/mL		A549	-	Lim07	-			
TiO ₂ -P., UF	30 µg/mL	ROS	A549	+	Lim07	-			
TiO ₂ , Sigma (fein?)	50 μg/mL	Comet (alk.)	L5178Y	-	Stru07	+			
TiO ₂ , Sigma (fein?)	0,16 µg/mL	SCE	LzpB	+	Tür07	-			
TiO ₂ , Sigma (fein?)	0,4 µg/mL	Mikrokern (ZB)	LzpB	+	Tür07	-			
TiO ₂ " <i>ultrafine</i> ", Sigma-Aldrich	26 µg/mL	Mikrokern (ZB)	WIL2-NS	+	Wan07 a	-			
TiO ₂ " <i>ultrafine</i> ", Sigma-Aldrich	65 µg/mL	Comet	WIL2-NS	+	Wan07 a	-			

Tab. 3.89	Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro. Fortsetzung
14010100	runematerialien Zaeanmernaeeang in vitre, i erteetzang

Substanz	tanz Dosis Test Prüf-		Prüf-	Gen-	Auto	ren
oder fein)	LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a
Titandioxid (und	SiO ₂ /TiO ₂), Fort	setzung				
TiO ₂ " <i>ultrafine</i> ", Sigma-Aldrich	130 µg/mL	HPRT	WIL2-NS	+	Wan07 a	-
TiO ₂ , " <i>ultrafine</i> "	2500 µg/mL	Aberrati- on	СНО	-	War07 a	-
TiO ₂ (Anatas)	5 µg/mL	ROS	A549	+	Gar08	-
TiO ₂ , UF 80 μg/mL = 40 μg/cm ²		Comet	A549	+	Kar08	-
TiO ₂ , UF 80 μg/m 40 μg/c		Comet (Fpg)	A549	-	Kar08	-
TiO ₂ , UF	O ₂ , UF 80 μg/mL = 40 μg/cm ²		A549	-	Kar08	-
TiO2, Sigma A.,80 μ g/mL =fein40 μ g/cm2		Comet	A549	+	Kar09	-
TiO₂, Sigma A., UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	+	Kar09	-
TiO2, Sigma A.,80 μ g/mL =fein40 μ g/cm2		Comet (Fpg)	A549	-	Kar09	-
TiO₂, Sigma A., UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	-	Kar09	-
TiO ₂ Nr. 1.1a	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
TiO ₂ Nr. 1.1b	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
TiO ₂ Nr. 1.2	5 µg/cm ²	ROS	diverse	+	Sch09	+
Eisenoxid (und S	iO ₂ /Fe-oxid)					
0,05% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	-	Lim07	-

 Tab. 3.89
 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Substanz	Dosis	Test	Prüf-	Gen-	Autoren				
oder fein)	LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a			
Eisenoxid (und SiO ₂ /Fe-oxid), Fortsetzung									
0,1% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	-	Lim07	-			
0,5% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	+	Lim07	-			
1,0% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	+	Lim07	-			
1,6% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , UF 30 μg/mL		ROS	A549	+	Lim07	-			
3% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , 30 μg/mL		ROS	A549	+	Lim07	-			
5% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , UF	i% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , 30 μg/mL		A549	+	Lim07	-			
10% Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ , 30 μg/mL		ROS	A549	-	Lim07	-			
Fe ₂ O ₃ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	-	Lim07	-			
Fe ₂ O ₃ , UF 80 μ g/mL = 40 μ g/cm ²		Comet	A549	-	Kar08	-			
Fe ₃ O ₄ , UF 80 μ g/mL = 40 μ g/cm ²		Comet	A549	-	Kar08	-			
Fe ₂ O ₃ , UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	-	Kar08	-			
Fe ₃ O ₄ , UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	+	Kar08	-			
Fe ₂ O ₃ , UF 80 μ g/mL = 40 μ g/cm ²		ROS	A549	-	Kar08	-			
Fe ₃ O ₄ , UF	80 μg/mL = 40 μg/cm ²	ROS	A549	-	Kar08	-			

Tab. 3.89 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Substanz	Dosis	Test	Prüf-	Gen-	Autoren				
oder fein)	(NOEL, LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a			
Eisenoxid (und S	Eisenoxid (und SiO ₂ /Fe-oxid), Fortsetzung								
Fe ₂ O ₃ , Sigma A., fein	80 μg/mL = 40 μg/cm ²	Comet	A549	+	Kar09	-			
Fe ₂ O ₃ , Sigma A., UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	-	Kar09	-			
Fe ₃ O ₄ , Sigma A., fein	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	+	Kar09	-			
Fe ₃ O ₄ , Sigma A., 80 μ g/mL = UF 40 μ g/cm ²		Comet	A549	-	Kar09	-			
Fe_2O_3 , Sigma A.,80 µg/mL =fein40 µg/cm²		Comet (Fpg)	A549	-	Kar09	-			
Fe ₂ O ₃ , Sigma A., 80 μg/mL = UF 40 μg/cm ²		Comet (Fpg)	A549	-	Kar09	-			
Fe_3O_4 , Sigma A.,80 µg/mL =fein40 µg/cm²		Comet (Fpg)	A549	-	Kar09	-			
Fe ₃ O ₄ , Sigma A., UF	80 μg/mL = 40 μg/cm ²	Comet (Fpg)	A549	+	Kar09	-			
Cobaltoxid (und S	SiO ₂ /Co-oxid)								
0,5% Co ₃ O ₄ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	-	Lim07	-			
1,6% Co ₃ O ₄ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	-	Lim07	-			
Co ₃ O ₄ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	+	Lim07	-			
Manganoxid (und	SiO ₂ /Mn-oxid)								
0,5% Mn ₃ O ₄ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	+	Lim07	-			
1,6% Mn ₃ O ₄ /SiO ₂ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	+	Lim07	-			

 Tab. 3.89
 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Substanz	Dosis	Test	Prüf-	Gen-	Auto	ren		
oder fein)	LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a		
Manganoxid (und SiO₂/Mn-oxid), Fortsetzung								
Mn ₃ O ₄ , UF	30 µg/mL	ROS	A549	+	Lim07	-		
Kupferoxid		-	-					
CuO, UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	+	Kar08	-		
CuO, UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	+	Kar08	-		
CuO, UF	80 μ g/mL = 40 μ g/cm ² ROS A549 (+)		(+)	Kar08	-			
CuO, Sigma A., fein	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	+	Kar09	-		
CuO, Sigma A., UF	uO, Sigma A., 80 μg/mL = = 40 μg/cm ²		A549	+	Kar09	-		
CuO, Sigma A., fein	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	-	Kar09	-		
CuO, Sigma A., UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	+	Kar09	-		
Zinkoxid								
ZnO, UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	+	Kar08	-		
ZnO, UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	+	Kar08	-		
ZnO, UF	80 μg/mL = 40 μg/cm ²	ROS	A549	-	Kar08	-		
ZnO Nr. 9	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+		
ZnO, UF	50 µg/mL	ROS	PMEF	+	Yan09	-		
ZnO, UF	5 µg/mL	Comet	PMEF	+	Yan09	_		

 Tab. 3.89
 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Substanz	Dosis	Test	Prüf-	Gen-	Auto	ren
oder fein)	(NOEL, LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a
Diverse Metalloxi	de					
CoCr- Nanopartikel	0,5 µm³/cell	Comet (alk.)	phHFbl.	+	Pap07	+
CoCr- Mikropartikel	5 µm³/cell	Comet (alk.)	phHFbl.	+	Pap07	+
CoCr- Nanopartikel	5 µm³/cell	Mikrokern (nb)	phHFbl.	+	Pap07	+
CoCr- Mikropartikel	5 µm³/cell	Mikrokern (nb)	phHFbl.	+	Pap07	+
CoCr- Nanopartikel	50 µm³/cell	Mikrokern (ZB)	phHFbl.	+	Pap07	+
CoCr- Mikropartikel 5 µm³/cell		Mikrokern (ZB)	phHFbl.	+	Pap07	+
CoCr- Nanopartikel	500 µm³/cell	8-OHdG	phHFbl.	+	Pap07	+
CoCr- Mikropartikel	50 µm³/cell	8-OHdG	phHFbl.	+	Pap07	+
CuZnFe ₂ O ₄ , UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet	A549	+	Kar08	-
CuZnFe ₂ O ₄ , UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	Comet (Fpg)	A549	+	Kar08	-
CuZnFe ₂ O ₄ , UF	80 μg/mL = 40 μg/cm²	ROS	A549	-	Kar08	-
CeO ₂ -A Nr. 3.1	1 µg/cm ²	ROS	diverse	+	Sch09	+
CeO ₂ -B Nr. 3.2	10 µg/cm ²	ROS	diverse	+	Sch09	+
CeO ₂ -C Nr. 3.3	10 µg/cm ²	ROS	diverse	+	Sch09	+
CeO ₂ -D Nr. 3.4	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
CeO ₂ Nr. 3.5	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+

Tab. 3.89 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Substanz	Dosis	Test	Prüf-	Gen-	Autoren	
oder fein)	LOEL)		system	tox. +/-	Quelle	"pri- vat" ^a
Diverse Metalloxi	de, Fortsetzunç]				
Alooh Nr. 5.1	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
AIOOH Nr. 5.2	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
Ti-Zr-Mischoxid Nr. 6.1	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
Ti-Zr-Mischoxid Nr. 6.2	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
Ti-Zr-Mischoxid Nr. 6.3	10 µg/cm ²	ROS	diverse	+	Sch09	+
Al-Ti-Zr- Mischoxid Nr. 7.1	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
Al-Ti-Zr- Mischoxid Nr. 7.2	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
Al-Ti-Zr- Mischoxid Nr. 7.3	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
ZrO ₂ Nr. 8.1	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
ZrO ₂ Nr. 8.2	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
ZrO ₂ Nr. 8.3	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
BaSO₄ Nr. 10	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
SrCO ₃ 1 Nr. 11.1	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
SrCO ₃ 2 Nr. 11.2	10 µg/cm ²	ROS	diverse	-	Sch09	+
Kaolin, fein	0,02 μg/mL = 0,003 μg/cm ²	Mikrokern	A549	+	Tot09	-
Sonstige Stäube	(gegebenenfall	s als Kontro	olle mitgefü	hrt)		
Glass fibers, AAA-10 microfi- bers	1,7 µg/cm ²	Comet (alk.)	V79/Hel 299	+	Zho97	-
Schwebstaub (fein)	1,6 µg/mL	Comet	A549/TH P-1	-	DPC01	-

Tab. 3.89 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Substanz	ifein; Dosis Test (NOEL, LOEL)		Prüf-	Prüf- Gen-		Autoren	
(UF = uitratein; oder fein)			system		Quelle	"pri- vat" ^a	
Sonstige Stäube	(gegebenenfall	s als Kontro	olle mitgefü	hrt), Fo	rtsetzung]	
Städtischer Schwebstaub, Januar	1 µg/cm²	Mikrokern (ZB)	RAW- 264.7	+	Pom06	-	
Städtischer Schwebstaub, Februar	1 μg/cm ² Mikrokern RAW- (ZB) 264.7 +		Pom06	-			
Städtischer Schwebstaub, März	r aub, 1 μg/cm ² Mikrokern RAW- (ZB) 264.7		RAW- 264.7	+	Pom06	-	
Latex- Nanopartikel	500 µm³/cell	Mikrokern (nb)	phHFbl.	+	Pap07	+	
Latex- Mikropartikel	x- opartikel 500 µm ³ /cell		phHFbl.	+	Pap07	+	
Latex- Nanopartikel	500 µm³/cell	Mikrokern (ZB)	phHFbl.	-	Pap07	+	
Latex- Mikropartikel	500 µm³/cell	Mikrokern (ZB)	phHFbl.	-	Pap07	+	
Chrysotilasbest	5 µg/mL	ROS	A549	+	Gar08	-	
Schwebstaub, städtisch	100 μg/mL = 25 μg/cm ²	Comet (alk.)	A549	+	Mro08	-	
Schwebstaub, städtisch	100 μg/mL = 25 μg/cm ²	Comet (neut.)	A549	+	Mro08	-	

Tab. 3.89 Nanomaterialien Zusammenfassung in vitro, Fortsetzung

Abkürzungen zu "Test":

-			
8-OHdG:	8-OHdG Immunhistochemisch	Aberration: Chromo	somenaberrations-Test
Comet (alk.):	Comet-Assay (alkalisch)	Comet (Fpg):	Comet-Assay (mit Fpg)
Comet (omF):	Comet-Assay (ohne und mit Fpg)	lacZ/cll: lacZ- un	nd cll-Mutationen
Mikrokern (kZB):	Mikrokern-Test (konventionell und	Zytokinese-Block)	
Mikrokern (nb):	Mikrokern-Test, Zytokinese-Block-	Methode, nuclear bl	ebs / nucleoplasmic bridges
Mikrokern (ZB):	Mikrokern-Test (Zytokinese-Block-	Methode)	
ROS:	In-vitro-Test auf ROS-Bildung (mitt	els Dichlorfluoresce	in)
SCE:	Schwesterchromatidaustausch		
a	"privat": Hier ist ein Pluszeichen Autoren oder in den "Acknowledge unmittelbar an Studienfinanzierun der kommerziellen Nutzung von se ben entsprechen, die in der Studie	eingetragen, wenn ments" erkennen la g oder -durchführun olchen Stäuben inte geprüft wurden.	Angaben zur "Affiliation" der ssen, dass Privatunternehmen ng beteiligt waren, welche an ressiert sind, wie sie den Pro-

Tab. 3.90Institutszugehörigkeiten und Angaben zur Studienfinanzierung der Au-
toren der in Tab. 3.89 referierten Studien

Abkür- zung	Zitat	Angaben zu Affiliation und Acknowled- gements (Land, Art der Forschungsein- richtung, finanzielle Zuwendungen)	Variable "Privat"
Bar08	Barnes et al. (2008)	Multinational, Kooperation, inkl. Industrie, Ackn. EU-Projekt NanoInteract	1
DPC01	Don Porto Carero et al. (2001)	Belgien, Forschungsinstitut/Hochschule, kein Ackn.	0
Gar08	Garza et al. (2008)	USA, Hochschule/Flugzeugbau, Ackn. Support Behörde?	0
Gur05	Gurr et al. (2005)	Taiwan, Hochschule, Ackn. Support Na- tional Science Council, Republic of China	0
Jac07	Jacobsen et al. (2007)	Dänemark, Forschungsinstitut/Behörde, Ackn. ideell	0
Kar08	Karlsson et al. (2008)	Schweden, Forschungsinstitut, Ackn. diver- ser Support, keine Industrie erkennbar	0
Kar09	Karlsson et al. (2009)	Schweden, Forschungsinstitut, Ackn. diver- ser Support: staatlich und unklar	0
Sch09	Schneken- burger et al. (2009)	Deutschland, Kooperation inkl. Industrie (s. auch NanoCare-Flyer: <i>"Weitere 2,6 Mio.</i> <i>Euro tragen Industriepartner bei</i> ")	1
Lim07	Limbach et al. (2007)	Schweiz, Forschungsinstitut, Ackn. Support Behörde	0
Lin97	Linnainmaa et al. (1997)	Finnland, Behörde, Ackn. Supported by Kemira Oy (Hersteller einer Probe)	1
Lu98	Lu et al. (1998)	Taiwan, Hochschule, Ackn. Support Na- tional Science Council, Republic of China	0
Mro08	Mroz et al. (2008)	Polen, Hochschule/Forschungsinstitut, Support-Statement: European Respiratory Society, DFG	0
Nak97	Nakagawa et al. (1997)	Japan, Forschungsinstitut, Ackn. Support Mammalian Mutagenicity Society of Japan und Ministerium	0

Tab. 3.90Institutszugehörigkeiten und Angaben zur Studienfinanzierung der Au-
toren der in Tab. 3.89 referierten Studien, Fortsetzung

Abkür- zung	Zitat	Angaben zu Affiliation und Acknowled- gements (Land, Art der Forschungsein- richtung, finanzielle Zuwendungen)	Variable "Privat"
Pap07	Papageorgiou et al. (2007)	UK, Hochschule, Ackn. Support Stryker (Industrie)	1
Pom06	Poma et al. (2006)	Italien, Hochschule, Ackn. Support Hoch- schule und unklar	0
Rah02	Rahman et al. (2002)	Indien/Deutschland, Forschungsinsti- tut/Hochschule, Ackn. ideell	0
Str07	Struwe et al. (2007)	Schweiz/Deutschland, Industrie, kein Ackn.	1
Tot09	Totsuka et al. (2009)	Japan, nationale Forschungseinrichtun- gen/Hochschulen, Ackn. Ministerium	0
Tür07	Türkez und Geyikoglu (2007)	Türkei, Hochschule, Ackn. ideell	0
Wan07a	Wang et al. (2007a)	Australien, Hochschule, Ackn. diverser Support, nicht explizit Privatunternehmen	0
Wan07b	Wang et al. (2007b)	Australien, Hochschule, kein Ackn.	0
Wan07c	Wang et al. (2007c)	Australien, Hochschule, kein Ackn.	0
War07	Warheit et al. (2007)	USA, Industrie	1
Yan09	Yang et al. (2009)	China, Forschungsinstitut, Ackn. Support National Natural Science Foundation of China	0
Zho97	Zhong et al. (1997)	USA, Behörde, Ackn. ideelle Beiträge	0

Jede Zeile der Tab. 3.89 ist eine Kombination aus 1 Staub (z. B. TiO₂ P25), 1 Testmodell (z. B. Comet-Assay) und 1 Studie (z. B. Linnainmaa et al. 1997 = Lin97). Eine solche Zeile sei hier als "Datensatz" bezeichnet. Die Tab. 3.89 enthält 179 Datensätze. Jeder Datensatz enthält die Information, ob mit einem bestimmten Staub bei mindestens 1 Zellart ein positives Ergebnis mit einem bestimmten In-vitro-Testmodell einer bestimmten Studie erhalten wurde, sowie NOEL bzw. LOEL. Die Datensätze sind nach Staubart geordnet. Von den insgesamt 179 Datensätzen ist bei 100 Datensätzen ein positiver Effekt ausgewiesen, d. h. es trat ein gentoxischer Effekt im 262

Sinne des Tests auf. Zusammenfassend kann man demnach sagen: 55 % der Tests waren positiv, also etwas mehr als die Hälfte. Auch bei den einzelnen Staubarten finden sich meist sowohl positive als auch negative Befunde. Die große Frage ist daher: Weshalb treten in den In-vitro-Gentoxizitätstests in insgesamt fast gleichen Anteilen sowohl positive als auch negative Ergebnisse auf, welches sind die Einflüsse, die ein Testergebnis dominieren?

Anhand der Datensätze der Tab. 3.89 wurde der Frage nachgegangen, welche Einflüsse das Testergebnis eines In-vitro-Gentoxizitätstests mit Nanomaterialien dominieren könnten. Folgende "Einflussfaktoren" scheinen sich zur Erklärung unterschiedlicher Ergebnisse anzubieten: Vorhandensein oder Fehlen bekannter spezifischer Toxizität eines Staubs, Partikelgröße, Dosis, Testmodell und Zellart. Wir haben diese Variablen in einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse als Erklärungsmodell für die Testergebnisse berücksichtigt. Beim Studium der Originalarbeiten stößt man aber immer wieder auch auf die "Affiliation" der Autoren bzw. auf den Gesichtspunkt der Finanzierung der Studien. Die Frage nach einer möglichen Bedeutung dieses Punktes ist nicht neu, sie spielt seit vielen Jahren z. B. bei Sitzungen von WHO-Arbeitsgruppen einschließlich der Monographie-Arbeitsgruppen des Internationalen Krebsforschungsinstituts (IARC) der WHO eine Rolle (Cogliano et al., 2004). Bezüglich der Stoffgruppen des vorliegenden Projekts war es zumindest bereits von der Frage der Bewertung künstlicher Mineralfasern her bekannt, dass dort Herstellerfirmen von Mineralfasern wissenschaftliche Studien finanzierten, die zu negativen Ergebnissen ("kein adverser Effekt") führten. Dagegen wurden Studien zur Karzinogenität künstlicher Mineralfasern, die von der öffentlichen Hand bzw. von Behörden finanziert wurden, von den Autoren und später auch von den Behörden als maßgebliche Hinweise auf ein karzinogenes Potential der entsprechenden Mineralfasern gewertet (Kapitel 1, Abschnitte 3.2.1.2 und 3.2.1.4). Auch bei den Nanomaterialien wurden jetzt nach der außerordentlich umfangreichen NanoCare-Studie die Ergebnisse von annähernd 30 Staubproben letztlich im Sinne eines "negativen" Resultats interpretiert. So schrieb Krug (2009) zu dieser großen Versuchsreihe ".. keinerlei gesundheitliche Bedenken ...". Und tatsächlich sind die Ergebnisse des ROS-Tests dieser Studie bei den meisten Staubproben negativ. Bei dem NanoCare-Projekt waren die großen Chemieunternehmen, welche die Pulver, denen die Staubproben entnommen waren, herstellen und (zu) verkaufen (planen), maßgeblich beteiligt.

Man mag einwenden, die Finanzierung einer Studie sei kein wissenschaftliches Kriterium, aber die wissenschaftlichen Studien werden von Menschen gemacht und es erscheint auch "wissenschaftlich" nicht sinnvoll, "verzweifelt" nach "wissenschaftlichen" Erklärungen für divergierende Befunde zu suchen, wenn die einfachere Erklärung in der Lebenswirklichkeit der forschenden Menschen liegt. Es soll an dieser Stelle auch keine weitere Diskussion erfolgen. Vielmehr sei lediglich der Frage der statistischen Assoziation verschiedener "Faktoren" oder "Variablen" auf die unterschiedlichen Ergebnisse der Gentoxizitätstests nachgegangen. In Tab. 3.89 ist dazu eine Variable eingeführt, welche die Finanzierungsquelle der Studie repräsentiert. Diese Variable wurde in die logistische Regressionsanalyse einbezogen. Um es vorwegzunehmen: Sie zeigte sich als diejenige Variable, die mit Abstand am meisten von der Varianz der Testergebnisse erklärte. Dies sei nachstehend beschrieben.

Zunächst sei die Variable "Privat" der Tab. 3.89 erläutert. Für diese Variable ist in Tab. 3.89 dann ein Pluszeichen eingetragen, wenn Angaben zur Affiliation der Autoren oder in den Acknowledgements erkennen lassen, dass Privatunternehmen unmit-

telbar an Studienfinanzierung oder -durchführung beteiligt waren, welche an der kommerziellen Nutzung von solchen Stäuben interessiert sind, wie sie den Proben entsprechen, die in der Studie geprüft wurden. In Tab. 3.90 sind für die einzelnen Publikationen die offenkundigen Informationen zu den Auftraggebern bzw. Unterstützern der Studien zusammengestellt und es sind die entsprechenden Werte 0 oder 1 für die dichotome Variable "privat" eingetragen. Tab. 3.91 enthält die Ergebnisse logistischer Regressionsanalysen mit maximal den 7 Variablen Dosis, Spez. Tox., UF, Comet, Mikrokern, ROS und Privat. Dabei ist die Variable Dosis stetig, d. h. für diese Variable wurden in der Regressionsanalyse die NOEL- bzw. LOEL-Werte der Tab. 3.89 verwendet*. Die übrigen 6 Variablen sind dichotom, d. h. sie können nur den Wert 0 oder 1 annehmen: Spez. Tox. erhielt den Wert 1 z. B. für Quarz, Nanotubes. Kupferoxid oder wenn sonst Gründe für die Annahme wesentlicher bekannter spezifischer Toxizität gegeben sind. UF hat den Wert 1, falls die Primärpartikelgröße bei Werten kleiner als 100 nm anzusetzen ist. Comet hat den Wert 1, wenn es sich um einen Comet-Assay handelte. Entsprechend stehen die Variablen Mikrokern und ROS für den Mikrokerntest und für die ROS-Bestimmung mittels DCF. Die Variable Privat ist oben erläutert. Die Zielvariable in dieser Analyse ist das Vorliegen mindestens eines positiven Ergebnisses des Gentoxizitätstests, d. h. bei Datensätzen mit einem "+" in Tab. 3.89 trägt die Zielvariable den Wert 1, bei Datensätzen mit einem "-" trägt sie den Wert 0.

Die Regressionsanalysen wurden für jede der Variablen allein durchgeführt und es wurde eine schrittweise multivariate Regression durchgeführt, wobei in den in Tab. 3.91 aufgeführten Schritten 1 bis 5 jeweils eine zusätzliche Variable in die Analyse aufgenommen wurde. Dabei wurde das letzte Modell mit 5 Variablen gerechnet, die Variablen Dosis und Comet wurden nicht weiter berücksichtigt, weil sie in der univariaten Analyse keinen sinnvollen bzw. nennenswerten Einfluss auf das Ergebnis gezeigt hatten, die Variable Dosis hatte entgegen der Erwartung einen negativen Einfluss gezeigt, d. h. NOEL-Werte sind eher mit höheren Zahlenwerten assoziiert als LOEL-Werte. Der in der letzten Spalte von Tab. 3.91 angegebene p-Wert ist ein Maß der statistischen Signifikanz der Assoziation zwischen den jeweiligen potentiellen Einflussvariablen und der Zielvariable eines positiven Gentoxizitätstests. Der p-Wert ist umso kleiner, je unwahrscheinlicher es ist, dass die beobachteten Werte aufgetreten wären, falls die Variable in Wahrheit keinen Einfluss auf das Ergebnis des Gentoxizitätstests gehabt hatte. Tab. 3.91 zeigt, dass es bei der Variable Privat am wenigsten wahrscheinlich ist, dass die Ergebnisse der In-vitro-Gentoxizitätstests so zustande gekommen wären wie beobachtet, falls nur der Zufall eine Rolle spielte. In der Toxikologie ist es gebräuchlich, ein Ergebnis als signifikant zu bezeichnen, wenn der p-Wert kleiner ist als 0,05. In diesem Sinne zeigt außer der Variable Privat nur die Variable Mikrokern einen sinnvollen signifikanten Einfluss, d. h. der Mikrokerntest ist demnach als der empfindlichste der ausgewerteten In-vitro-Gentoxizitätstests anzusehen.

^{*} Zu der Variable *Dosis* ist anzumerken, dass es unterschiedliche Dosiseinheiten gibt. In einigen Veröffentlichungen sind die Dosen gleichzeitig in µg/mL und µg/cm² angegeben. Aus diesen Werten haben wir einen durchschnittlichen Umrechnungsfaktor von 5 abgeleitet. Für die logistische Regression sind die Zahlenwerte der Dosis in µg/mL verwendet. Sofern Dosiswerte nur in der Einheit µg/cm² vorlagen, wurden diese mit dem Faktor 5 umgerechnet. Die Dosisangabe in µm³/cell bei Papageorgiou et al. (2007) wurde aufgrund der sporadischen Angaben in der Publikation umgerechnet (s. Tab. 7.12). In der Variable *Dosis* sind deshalb diese Umrechnungsunsicherheiten enthalten.

Die vorletzte Spalte in Tab. 3.91 enthält die Werte der so genannten erklärten Varianz (= Bestimmtheitsmaß R²). Eine erklärte Varianz von z. B. 12 % sagt aus, dass 12 % der Varianz der Ergebnisse der In-vitro-Tests (d. h. der Unterschiede, dass einerseits negative und andererseits positive Ergebnisse herauskommen) durch das Modell mit den verschiedenen potentiellen Einflussvariablen (wie Dosis, spezifische Toxizität usw.) erklärt werden. Die maximal erklärte Varianz nach Tab. 3.91 von nur 12,8 % deutet darauf hin, dass eventuell ein relativ großer Anteil der unterschiedlichen Ergebnisse im Zufall oder in ungeeigneten Versuchsdesigns zu suchen sein könnte. Gleichwohl zeigt die Tab. 3.91 aber, dass die Kombination mehrerer potentieller Einflussvariablen zu hoch signifikanten Assoziationen führt und insofern keineswegs nur Zufälle eine Rolle spielen. Im Schritt 4 der Regressionsanalyse sind die Variablen Spez. Tox., UF, Mikrokern und ROS im Modell enthalten, der p-Wert beträgt dabei 0,009, d. h. es ist sehr unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse der In-vitro-Studien so herausgekommen wären, falls allein Zufall regierte und kein Einfluss dieser Variablen auf das Ergebnis eine Rolle spielte. Schritt 5 in der Tab. 3.91 zeigt, dass aber auch dann, wenn die genannten 4 Variablen bereis im Modell enthalten sind, die zusätzliche Aufnahme der Variable Privat die Modellanpassung wesentlich verbessert (p-Wert für Verbesserung von Modell 5 gegenüber Modell 4: 0,00092). Die Kombination der 5 Variablen Spez. Tox., UF, Mikrokern, ROS und Privat führt insgesamt zu einem p-Wert von 0,00017, also zu einem eindeutig hoch signifikanten Ergebnis.

Anstatt über die "abstrakt" oder "mathematisch" anmutende logistische Regression kann man auch über eine einfache deskriptive Statistik Zugang zu den Ergebnissen bekommen, was im Prinzip zu denselben Schlussfolgerungen führt. In Tab. 3.92 sind die Ergebnisse von Tab. 3.89 einfach nach Kategorien und der Art der "Ergebnisse" bzw. "Befunde" geordnet. Auch bei dieser Auswertung ist zu erkennen, dass der Mikrokerntest sich als besonders empfindlich (sensitiv) gezeigt hat, im Durchschnitt aller Studien sind rund Dreiviertel aller Tests, die mit einem Mikrokerntest durchgeführt wurden, positiv. Betrachtet man nur die Studien, bei denen ein Mikrokerntest ohne erkennbare Beteiligung eines "Stoffproduzenten" durchgeführt wurde, dann stellt man eine Quote von 89 % positiver Testergebnisse fest. Es haben also fast alle Mikrokerntests mit Nanomaterialien und Vergleichsmaterialien, die "von der öffentlichen Hand" durchgeführt wurden, Gentoxizität angezeigt (genauer: 16 positive in 18 Tests). Falls dagegen ein anderer In-vitro-Gentoxizitätstest unter Beteiligung von "Stoffproduzenten" durchgeführt wurde, war die Wahrscheinlichkeit eines *negativen* Ergebnisses hoch (genauer: 10 positive in 35 Tests).

Diese Auswertungsbefunde machen die Interpretation der In-vitro-Ergebnisse sehr schwierig. Offensichtlich ist der Zusammenhang der In-vitro-Ergebnisse mit Parametern, die nicht unmittelbar als naturwissenschaftlich anzusehen sind, so stark, dass es zweifelhaft ist, ob es gelingt, dahinter die naturwissenschaftlichen Zusammenhänge nachzuzeichnen. Man mag diesen Befund auch im Gedächtnis behalten, wenn man die In-vitro-Ergebnisse im Verhältnis zu den In-vivo-Ergebnissen betrachtet.

Tab. 3.91 Statistische Assoziation positiver Testergebnisse mit potentiellen Einflussvariablen in den ausgewerteten Studien zur In-vitro-Gentoxizität von Nanomaterialien und sonstigen Stäuben: Auswertung mit logistischer Regression.

Modell	Variable	Odds Ratio	-LogLike- lihood	Erklärte Varianz	p-Wert			
Univariate Modelle								
Dosis		0,999	120,30	2,4 %	0,024			
S	pez. Tox.	1,73	121,38	1,6 %	0,088			
	UF	0,59	121,57	1,4 %	0,111			
	Comet	0,97	122,83 0,01 %		0,917			
N	likrokern	2,90	119,88	3,1 %	0,015			
	ROS	0,46	119,82	3,4 %	0,014			
	Privat	0,31	117,25	6,2 %	0,00083			
	Schr	rittweise multiva	ariate Regress	sion				
1	Spez. Tox.	1,73	121,38	1,6 %	0,088			
2	Spez. Tox.	1,84	110.90	2 1 0/	0,0481			
۲ 	UF	0,55	119,00	3,4 70				
p-Wert fü	r Verbesserung vo	n Modell 2 geg	enüber Model	1:	0,075			
	Spez. Tox.	2,01		6,0 %	0,0096			
3	UF	0,67	117,12					
	Mikrokern	2,91						
p-Wert fü	0,021							
	Spez. Tox.	2,02						
4	UF	0,86	116.08	7,1 %	0 0000			
4	Mikrokern	2,48	110,00		0,0090			
	ROS	0,58						
p-Wert fü	r Verbesserung vo	n Modell 4 geg	enüber Model	II 3:	0,148			
5	Spez. Tox.	1,89		12,8 %	0,00017			
	UF	0,96						
	Mikrokern	3,68	110,59					
	ROS	0,71						
	Privat	0,28						
p-Wert fü	0,00092							

Tab. 3.92 Häufigkeit positiver und negativer Testergebnisse für einzelne Stoffe in den ausgewerteten Studien zur In-vitro-Gentoxizität von Nanomaterialien und sonstigen Stäuben, aufgeschlüsselt nach den potentiellen Einflussvariablen, die in der explorativen logistischen Regressionsanalyse die stärkste Assoziation mit dem Ergebnis zeigten.

Test-Art, Affiliation der Autoren bzw. Finanzierung	Anzahl posi- tive Befunde ("Effekt")	Anzahl nega- tive Befunde ("kein Effekt")	Prozentsatz positiver Befunde
Mikrokern-Test, Hochschu- len/Behörden/öffentliche For- schungseinrichtungen	16	2	88,9
Mikrokern-Test, Beteiligung priva- ter Stoffproduzenten	6	5	54,5
Mikrokern-Test, gesamt	22	7	75,9
kein Mikrokern-Test, Hochschu- Ien/Behörden/öffentliche For- schungseinrichtungen	68	47	59,1
kein Mikrokern-Test, Beteiligung privater Stoffproduzenten	10	25	28,6
kein Mikrokern-Test, gesamt	78	72	52,0
alle Testarten, Hochschu- len/Behörden/öffentliche For- schungseinrichtungen	84	49	63,2
alle Testarten, Beteiligung privater Stoffproduzenten	16	30	34,8
gesamt	100	79	55,9

Tab. 3.93Zusammenfassung der Ergebnisse von Karzinogenitätsversuchen mit
Titandioxiden (Inhalation und intratracheale Instillation bei Ratten)

Modifi- kation	Größen- klasse	Exposi- tionsart	Exposi- tions- höhe, Dosis	Tiere mit Tumor / untersucht	+/-	Ratten- Stamm	Autoren
Rutil	fein	Inhalation	250 mg/m ³	39 / 151 (25,8 %)	+	Sprague- Dawley	Lee et al., 1985, 1986
Rutil	fein		3,9 mg/m ³	3 / 111 (2,7 %)	-	F344	Muhle et al., 1991
überw. Anatas	ultrafein (= nano)		7-15 mg/m ³	32 / 100 (32 %)	+	Wistar	Heinrich et al., 1995
Anatas	fein	intra- tracheale Instillation	45 mg	2 / 39 (5,1 %)	-	Wistar	Pott et al., 1994;
Rutil	fein		60 mg	1 / 39 (2,6 %)	-	Wistar	Pott und Roller, 1994
Anatas	fein		60 mg	13 / 44 (29,5 %)	+	Wistar	Pott und Roller,
überw. Anatas	ultrafein (= nano)		15 mg	22 / 42 (52,4 %)	+	Wistar	2005; Roller, 2008

In der Tab. 3.89 sind keine Spalten für die In-vivo-Referenzinformation enthalten. Es erscheint aus mehreren Gründen nicht sinnvoll, hier Zahlenwerte für Sensitivität und Spezifität anzugeben. Zu diesen Gründen zählt zunächst, dass es schwierig ist, Stoffidentität zu definieren. In Tab. 3.93 sind nochmals die In-vivo-Ergebnisse mit Titandioxidproben zusammengefasst. Die Frage ist, wie man die in vivo und die in vitro untersuchten Proben einander zuordnet. Oder anders ausgedrückt: Definiert die chemische Summenformel TiO₂ den Stoff oder sind Anatas und Rutil zwei unterschiedliche Stoffe? In der Arbeit von Gurr et al. (2005; Tab. 3.62) wurde explizit Wert gelegt auf die Unterscheidung zwischen Anatas und Rutil, beide Varianten wurden in Nicht-Nano-Form (= fein) verwendet und es wurde die Frage untersucht, ob die Mischung der Modifikationen einen besonderen Einfluss ausüben würde. Dies schien in diesem In-vitro-Versuch sogar der Fall zu sein. In Langzeit-Inhalationsversuchen wurde aber feiner Anatas nicht geprüft, sondern nur Rutil. Einerseits dürfte man also strenggenommen in diesem Szenario nur für (feinen) Rutil die In-vitro-Prädiktivität in Bezug auf In-vivo-Inhalation berechnen. Dies erscheint aber andererseits in gewisser Weise grotesk. Denn mittels intratrachealer Instillation wurde sehr wohl auch feiner Anatas geprüft, der sich als krebserzeugend gezeigt hat. Vielmehr ist dann weiterhin die Datenlage aus Langzeit-Tierversuchen so dicht, dass es gut begründet ist anzunehmen, dass GBS jeder Art bei geeigneter Dosierung im Inhalationsversuch an Ratten eine erhöhte Lungentumorhäufigkeit erkennen lassen. Dies wird übereinstimmend von Vertretern ansonsten unterschiedlicher Interpretationsrichtungen so gesehen (Nikula et al., 1995; Oberdörster, 2002; Hesterberg et al., 2005; Roller, 2008, 2009, 2010). Unterschiede in der Interpretation bestehen nun aber darin, ob man diese Lungentumor induzierende Wirkung in der Rattenlunge als relevant für den Menschen erachtet oder als irrelevanten **Overload** einstuft. Und **hier liegt das wesentliche Problem**. Es ist in größerem Zusammenhang zu diskutieren (s. w. u.).

4.1 Fragestellung: Was ist ein signifikanter Effekt?

In dem großen Projekt NanoCare wurden rund 30 verschiedene Proben von Nanomaterialien oder ihren Modifikationen mit In-vitro-Tests geprüft. Einer der führenden Wissenschaftler des NanoCare-Projekts hat folgende zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse veröffentlicht (Krug, 2009): "NanoCare, dessen Sprecher ich ja 3 Jahre gewesen bin, hat auf seiner Internetseite (www.nanopartikel.info) den Abschlussbericht und eine Broschüre veröffentlicht aus denen ersichtlich ist, dass für die 30 verschiedenen Materialien und Modifikationen, die getestet wurden, keinerlei gesundheitliche Bedenken bestehen." Als Grundlage dieser Aussage können folgende Zitate aus der Broschüre von NanoCare (2009) und dem Abschlussbericht von Kuhlbusch et al. (2009) angesehen werden: "In den getesteten niedrigen Konzentrationen (die für den Alltag allerdings schon als hoch gelten) rufen die Nanopartikel keine krankhaften Reaktionen in der Lunge hervor - Höhere Konzentrationen lösen im Tierversuch eine Entzündungsreaktion aus, die sehr gut mit den Ergebnissen der In-vitro-Experimente übereinstimmt"; "Alle untersuchten Proben brachten no-effectlevels (NEL) oder lowest-observed-effect-levels (LOEL) in dem Mehr-Dosis-Ansatz hervor". Eine nähere Definition der Begriffe NEL und LOEL anhand statistischer Analysen bzw. überhaupt Angaben zu den statistischen Verfahren finden sich in diesen Publikationen zwar nicht, generell wird jedoch z. B. der NOEL definiert als die höchste Dosis, bei der kein statistisch signifikanter Effekt beobachtet wurde. In einer Publikation von Lenz et al. (2009) zu ZnO-Partikeln heißt es: "Since no significant in vitro cellular response was observed after challenging the A549 cells with 0.75 $\mu g/cm^2$ (for 3 h post-incubation time), the current data suggest that ZnO nanoparticles do not pose a significant health risk, if the OSHA exposure limits are obeyed. However, it is unclear whether this result also holds for a chronic exposure scenario. that is continuous delivery of the mean daily dose (0.32-1.6 ng/cm^2) over a lifetime."

In der Arbeit von Lenz et al. (2009) wird explizit die Schlussfolgerung gezogen, falls in einem Versuchsansatz keine signifikante Effektantwort beobachtet wurde, dann sei auch bei einer entsprechenden Exposition des Menschen kein signifikantes Gesundheitsrisiko zu erwarten. Die Schlussfolgerung von Lenz et al. (2009) beinhaltet sicherlich mehrere Fehler oder zumindest Probleme. Ein Problem ist, dass in der Studie nur ein begrenzter Satz von Effektparametern (konkret: zwei Parameter der mRNA-Expression) untersucht wurden. Es ist kühn, von diesen zwei Parametern generell auf die An- oder Abwesenheit eines Gesundheitsrisikos beim Menschen zu schließen. Ein weiteres Problem stellt die Ermittlung einer "entsprechenden" Exposition dar, Lenz et al. (2009) haben die Massedosis je cm² In-vitro-Kulturoberfläche einer berechneten Massedosis je cm² Lungenoberfläche des Menschen gleichgesetzt; fraglich, wie berechtigt dies ist. Ebenfalls von Bedeutung ist außerdem die Definition des Begriffes "signifikant". Der Begriff wird in dem einen Satz von Lenz et al. (2009) zweimal verwendet "keine signifikante zelluläre Antwort in vitro" und "kein signifikantes Gesundheitsrisiko". Die zweite Begriffsverwendung dürfte in einem eher allgemeinen Wortsinn zu verstehen sein, d. h. kein "bedeutendes" oder kein "bemerkenswertes" Risiko. Die MAK-Kommission verwendet ebenfalls in englischen Texten den Begriff "no significant contribution to human cancer risk", für den sie in deutschen Texten den Begriff des "kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko für den

Menschen" eingeführt hat (Neumann et al., 1997a,b; Greim, 1998, 2000; Greim und Ziegler-Skylakakis, 2007; Hartwig, 2009). In dem Satz von Lenz et al. (2009) geht für die erste Verwendung von "significant" aus dem Zusammenhang eindeutig hervor, dass dabei "statistisch signifikant" gemeint ist. Dagegen ist der Zusammenhang zwischen einem "statistisch nicht signifikanten" Ergebnis in einer toxikologischen Untersuchung und dem Schluss auf "no significant contribution to human cancer" in Arbeiten aus der MAK-Kommission (z. B. bei Greim und Ziegler-Skylakakis, 2007; Hartwig, 2009) komplexer, in dem oben erwähnten großen NanoCare-Projekt ist der Zusammenhang nicht explizit dargelegt oder ohne weiteres zu erkennen. Man vermutet aber wohl nicht zu unrecht, dass bei der Ableitung der NOEL oder NOAEL, anhand deren dann schließlich auf "keine Bedenken" (NanoCare) oder "kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko" (MAK-Kommission) geschlossen wird, auch oder gerade "statistische Signifikanz" toxikologischer Befunde eine Rolle spielen. Man kann die Aussage bei Lenz et al. (2009) auch so verstehen, dass dort eine Definition der Autoren vorgenommen wird: "Falls ein Experiment ein nicht-signifikantes Ergebnis erbringt, dann besteht - definitionsgemäß - auch beim Mensch kein signifikantes Risiko". Um die Bedeutung dieser Definition zu verstehen, muss man verstehen, was "statistisch signifikant" bzw. "nicht signifikant" bedeutet.

Schließlich sind die meisten der im vorliegenden Bericht ausgewerteten Befunde aufgrund bescheinigter oder als fehlend ausgewiesener statistischer Signifikanz als "positiv" oder "negativ" von den Studienautoren bewertet worden, zum Teil mit unterschiedlichen Tests und mit unterschiedlich gewähltem Signifikanzniveau.

Um alle diese Argumentationen und die Bedeutung der Befunde einordnen zu können, ist es daher sinnvoll, den Begriff der Signifikanz im Sinne der Statistik näher zu erörtern. Dies ist wichtig, weil die Beurteilung der experimentellen Karzinogenität von Nano-GBS ganz wesentlich vom Begriff der statistischen Signifikanz abhängt. Dies ist auch wichtig, weil zu erläutern sein wird, dass fehlende statistische Signifikanz des Ergebnisses bei einer bestimmten Dosis nicht ohne weiteres mit Evidenz für fehlende Toxizität oder mit Evidenz für eine Wirkungsschwelle gleichgesetzt werden darf. Was also bedeutet statistische Signifikanz für die Bewertung "positiver" und "negativer" Ergebnisse von Toxizitätstests, von "Sensitivität" und "Spezifität" und NOAELs? Für eine angemessene Antwort auf diese Frage ist es angezeigt, das Konzept des statistischen Tests, so wie er in Lehr- und Handbüchern und in der Praxis der Toxikologie behandelt wird, näher an seinen Ursprüngen zu erfassen und zusätzlich einige speziellere Publikationen hinzuzuziehen (Fisher, 1955; Neyman, 1957; Gigerenzer, 1993; Schervish, 1996; Sedlmeier, 1996; Perneger, 1998; Rothman, 1998; Johnson, 1999; Stern und Smith, 2001; Berger, 2003; Marks, 2003; Gigerenzer, 2004; Gigerenzer et al., 2004; Christensen, 2005; Biau et al., 2008; Sainani, 2009; Gill, ohne Datum). Demnach ist der "gebräuchliche" statistische Test das Ergebnis einer anonymen Vermischung unterschiedlicher Konzepte. Die ursprünglichen Konzepte sind einzelnen Autoren zuordenbar, insbesondere R.A. Fisher auf der einen Seite und J. Neyman sowie E.S. Pearson auf der anderen Seite. Die Auseinandersetzung mit den Ursprüngen bietet unter anderem einen Zugang zu dem scheinbaren Widerspruch, weshalb einerseits bei einem bestimmten Signifikanzniveau, z. B. 5 %, eine messerscharfe Grenze bestehen soll, die ein signifikantes Ergebnis von einem nicht signifikanten trennt, und weshalb dies andererseits vielen Medizinern und Biologen als biologisch unplausibel erscheint. Weshalb wird ein Ergebnis mit einem p-Wert von 0,049 als "signifikanter" Effekt bewertet, aber ein Ergebnis mit einem p-Wert von 0,051 wird als regulatorisch irrelevant abgewertet?

4.2 Das Konzept *proof by contradiction*

Allen statistischen Tests ist gemeinsam, dass Wahrscheinlichkeiten berechnet werden dafür, dass die beobachteten Ergebnisse auftreten, wenn alleine eine Zufallsstreuung zugrunde liegt. Der Signifikanztest nach Publikationen von R.A. Fisher* aus den 1920er bis 50er Jahren sei - anhand der oben genannten Literatur und den dort zu findenden Originalzitaten - in seinen Schritten folgendermaßen charakterisiert:

- 1. Formuliere mathematisch eine Hypothese (Nullhypothese; z. B.: wahrer Mittelwert = 5 Einheiten, oder: wahre Differenz zwischen den Mittelwerten = 0).
- 2. Finde eine statistische Verteilungsfunktion, mit deren Hilfe sich Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten der Daten unter der Annahme berechnen lassen, dass die Nullhypothese zutrifft. Gegebenenfalls ist dazu die Ableitung einer Prüfgröße (*test statistic*, z. B.: t, F, Chi²) erforderlich.
- 3. Berechne den p-Wert aus den Daten, gegebenenfalls mittels der Prüfgröße. Der p-Wert soll die Wahrscheinlichkeit dafür angeben, dass (infolge der Zufallsstreuung) mindestens so "extreme" wie die beobachteten Daten auftreten, wenn die Nullhypothese wahr ist.
- 4. Betrachte den p-Wert als "achieved significance level".

Der p-Wert ist nach diesem Denkansatz gleich dem erreichten Signifikanzniveau. Es gibt Variationen im Wortlaut, welche Bedeutung einem p-Wert ober- oder unterhalb einer gewissen Höhe beizumessen ist. Gigerenzer (2004) hat die Methode gemäß den (späten) Publikationen von R.A. Fisher aus den 50er Jahren folgendermaßen zusammengefasst:

"Fisher's null hypothesis testing:

- 1. Set up a statistical null hypothesis. The null need not be a nil hypothesis (i.e., zero difference).
- 2. Report the exact level of significance (e.g., p = 0.051 or p = 0.049). Do not use a conventional 5% level, and do not talk about accepting or rejecting hypotheses.
- 3. Use this procedure only if you know very little about the problem at hand."

Gigerenzer (2004) sowie Gigerenzer et al. (2004) weisen darauf hin, dass R.A. Fisher über einen Zeitraum von ungefähr 30 Jahren seine Interpretation verändert hat. Dies mag auch mit einem erweiterten Anwendungsbereich der Tests zusammenhängen. Gigerenzer et al. (2004) unterscheiden deshalb innerhalb dieses Konzepts zwischen der Variante, wonach *konventionsgemäß* Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant betrachtet werden, und einer zweiten Variante, bei welcher der p-Wert als Information mitgeteilt wird, anhand derer ein jeder seine eigenen Schlüsse ziehen mag. Die Arbeit von Fisher (1955) schließt mit folgendem Satz (Hervorhebungen im Original kursiv): "We have the duty of formulating, of summarising, and of communicating our conclusions, in intelligible form, in recognition of the right of **other** free minds to utilize them in making **their own** decisions."

^{*} Hier ist nicht Fisher's Exact Test gemeint, sondern das allgemeine Konzept des statistischen Testens.

Unabhängig davon, welche Interpretationen R.A. Fisher vor 80 und vor 50 Jahren vorgenommen hat, liegen einige Fakten auf der Hand. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass die beobachteten Daten oder "extremere" auftreten, falls nur Zufallsstreuung zugrunde liegt. Wenn diese Wahrscheinlichkeit klein ist, dann erscheint es vernünftig anzunehmen, dass die Daten nicht alleine durch Zufall zustande gekommen sind. Wenn die Wahrscheinlichkeit groß ist, dann ist es zwar plausibel, dass die Daten allein durch Zufall zustande gekommen sind, andere Einflüsse sind aber damit keineswegs ausgeschlossen (wenn ich 10 Lose kaufe und alle sind Nieten, dann ist damit überhaupt nicht bewiesen, dass es in dieser Lotterie keine Gewinne gibt; es ist dann zwar nicht anzunehmen, dass 50 % der Lose Gewinne sind, aber 1 % oder 2 % oder auch 10 % mögen es sein). Im übrigen gibt es kein Naturgesetz, dass sich gerade und exakt bei einem Betrag von p = 0.05 (oder p = 0.01) festmachen lässt, was eine "große" oder "kleine" Wahrscheinlichkeit ist. Die Information, die in einem p-Wert von 0,048 steckt, unterscheidet sich nicht wesentlich von der Information, die in einem p-Wert von 0,052 steckt. In diesem Konzept lässt sich ein p-Wert von 0,052 ohne weiteres als "signifikant" betrachten. Sainani (2009) hat es folgendermaßen formuliert: "Moreover, nothing magical happens at .05 - and there is little difference in the evidence provided by a P value of .051 versus a P value of .049." Ein p-Wert ist hier eine zusätzliche Information, die in den Daten enthalten ist, die selbstverständlich auch nach der Versuchsdurchführung interpretiert werden darf und die unabhängig davon ist, für wieviele Datensätze sie berechnet wird.

Charakteristisch für dieses Konzept ist es, dass es (je Test) nur eine Hypothese gibt, die so genannte Nullhypothese. Im Falle einer In-vitro-Toxizitätsprüfung mit Zellkulturen wäre das in der Regel: Die Merkmalsausprägungen unbehandelter Zellkulturen und nach Behandlung solcher Kulturen mit einer bestimmten Dosis D unterscheiden sich nicht, d. h. die Dosis hat keinen Effekt (es könnte aber auch eine andere "Nullhypothese" formuliert werden). Anhand der Daten der experimentellen Kontrollgruppe und einer mit der Dosis D behandelten Versuchsgruppe wird mit Hilfe einer Verteilungsfunktion ein p-Wert berechnet. Dieser p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass unter Gültigkeit der Nullhypothese (hier: kein Effekt der Dosis) allein aufgrund des Zufalls das erhaltene Ergebnis oder ein extremeres Ergebnis erhalten wird. Mehr sagt der p-Wert nicht aus. Falls der p-Wert groß ist, dann ist es recht wahrscheinlich, dass ein mindestens so extremes Ergebnis wie das erhaltene allein wegen der Zufallsstreuung erhalten wird. Falls der p-Wert sehr klein ist, dann ist es sehr unwahrscheinlich, dass der festgestellte Unterschied zustande kommt, wenn nur der Zufall die Hand im Spiel hat. Man hat dann zwar keinen Beweis, dass außer dem Zufall irgendetwas einen Einfluss hatte, man hat auch keine "Wahrscheinlichkeit" dafür, dass irgendeine Hypothese zutrifft, aber man mag dann unter Würdigung weiterer Informationen zum Schluss kommen, dass man das Ergebnis als "signifikant" erachtet. Der p-Wert darf gemäß diesem Konzept nach Versuchsende interpretiert werden, d. h. man darf bei einem p-Wert von 0,051 sagen: "Es ist recht unwahrscheinlich, dass ein solches Ergebnis nur aufgrund von Zufall zustande kommt, ich halte dieses Ergebnis hier für bemerkenswert. Weil ich andere Einflüsse als die verabreichte Dosis durch das Versuchsdesign weitgehend ausgeschlossen habe, schließe ich auf einen Effekt der Dosis. Falls ich einen p-Wert von 0.049 erhalten hätte, würde ich keinen Grund für eine grundsätzlich andere Bewertung sehen." Begriffe wie "Irrtumswahrscheinlichkeit", "Fehler 1. Art", "Fehler 2. Art" oder "statistische Power" gibt es in diesem Konzept nicht.

Die philosophische Basis des Fisher-Konzepts lässt sich als "Beweis durch Widerlegung" (*proof by contradiction*) beschreiben. Danach lässt sich eine Hypothese nicht bestätigen, sondern nur widerlegen. Genau genommen handelt es sich hier auch nicht um eine "Widerlegung", sondern die Hypothese wird allenfalls sehr, sehr unplausibel. Nach diesem Konzept wird "die Nullhypothese aufgestellt, um verworfen zu werden".

Die Bedeutung für Toxizitätstests bzw. NOEL sei an Beispielen erläutert. Dabei lässt sich auch eine Interpretation eines so genannten Vertrauensbereichs darstellen. Wir nehmen an, in einem In-vitro-Test sei die ROS-Bildung anhand von DCF-Fluoreszenz gemessen worden. Der Stichprobenumfang je Gruppe sei n = 5. Für die Kontrollgruppe wurden aus den einzelnen Messwerten ein Mittelwert von 5 (Fluorimetereinheiten) und eine Standardabweichung von 2 berechnet. Die (mit Nanomaterial) behandelte Dosisgruppe führte zu einem Mittelwert von 9 und ebenfalls zu einer Standardabweichung von 2. Die Frage an dieses Experiment ist: Hat das Nanomaterial einen Effekt verursacht? Die Frage zielt auf den Effekt, dieser lässt sich aber nicht "beweisen". Mit dem statistischen Test kann man allenfalls widerlegen, dass kein Effekt vorliegt. Die Nullhypothese lautet daher: Die DCF-Fluoreszenz ist ohne und mit Nano-Behandlung im Mittel gleich. Mathematisch formuliert: $\mu_{K} = \mu_{D}$, d. h. Mittelwert in der Kontrollgruppe ist gleich Mittelwert in der Dosisgruppe. Um diese Hypothese zu prüfen, kann ein t-Test durchgeführt werden. Aus den Mittelwerten, Standardabweichungen und Stichprobenumfängen kann nach einer bestimmten Formel eine Variable berechnet werden, deren Verteilung im Fall reiner Zufallsstreuung (normalverteilter) Messergebnisse bekannt ist. Im konkreten Fall unseres Beispiels erhält man den Zahlenwert t = 3,162. Dazu wird noch eine zweite Variable benötigt, welche die Verteilung der Prüfgröße t mitbestimmt, die so genannten Freiheitsgrade (FG), für unser Beispiel: FG = 8. Für t = 3,162, FG = 8 ergibt sich anhand der t-Verteilung p = 0,013. Dies bedeutet: Ein t-Wert, welcher größer oder gleich als 3,162 - oder kleiner oder gleich als -3,162 - ist, würde lediglich mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,3 % auftreten, falls eine reine Zufallsstreuung der Messwerte zugrunde liegt. Daraus kann der Toxikologe schließen: Der p-Wert von 1,3 % ist so niedrig, dass ich dieses Ergebnis als signifikant betrachte; ich gehe von einem Effekt der Prüfsubstanz aus.

Was bedeutet ein nicht-signifikantes Versuchsergebnis in diesem Konzept? Angenommen, in unserem Versuch gab es insgesamt 4 Gruppen: Kontrolle und 3 Dosisgruppen. Für die beiden oberen Dosisgruppen wurde ein signifikanter Effekt festgestellt, für die unterste Dosisgruppe dagegen nicht. Dies ist der "typische" Fall, bei dem die niedrigste Dosis als NOAEL oder NOEL bezeichnet wird. Und von manchen Autoren wird bei der Beschreibung der Ergebnisse eine Sprache gewählt, die eine Wirkungsschwelle nahelegt oder den Nachweis nur unbedeutender Effekte (bei Lenz et al., 2009) oder nicht nennenswerter Beiträge zum Risiko des Menschen (Greim, 1998, 2000) erbracht sieht. Im Fisher-Konzept ist aber bei einem nicht-signifikanten Ergebnis keine genaue Schlussfolgerung vorgesehen. Wir wissen es schlicht nicht, ob hier nur der Zufall eine Rolle gespielt hat oder ob ein Effekt verursacht wurde. der mit dem gegebenen Versuchsdesign nicht entdeckt werden konnte. Gemäß der Logik des proof by contradiction müsste bei der Frage der Wirkungsschwelle die Fragestellung verändert werden: Es geht jetzt nicht mehr um die Frage "Hat die Substanz einen Effekt verursacht?", sondern um die Frage "Hat die niedrigste Dosis keinen Effekt verursacht?". Im Falle der 3 Dosen wurde bereits anerkannt, dass die Substanz grundsätzlich toxische Eigenschaften besitzt, es müsste nun der Nachweis geführt werden, dass sie sie bei der niedrigsten Dosis *nicht* besitzt.

Beispiel dazu: Bei der niedrigsten Dosis unserer Prüfsubstanz habe man einen Mittelwert von 6 erhalten (Standardabweichung 2, Mittelwert der Kontrollgruppe 5, wie oben). Dann ergibt sich: t = 0,791, FG = 8, p = 0,45. Das heißt, die Wahrscheinlichkeit, dass solche oder "extremere" Werte allein aufgrund der Zufallsstreuung erhalten werden, beträgt 45 %. Dies ist also recht wahrscheinlich. Es scheint mir, dass manche Toxikologen dies als "Evidenz" dafür betrachten, dass bei dieser Dosis keine Toxizität vorliegt, obwohl dies eine "Überinterpretation" ist. Nachdem mit den anderen Dosen sich Toxizität bereits gezeigt hat, müsste man nun - um dies widerlegen zu können - z. B. prüfen: "Es liegt bei dieser Dosis ein Effekt in Höhe der Differenz der beobachteten Mittelwerte, also in Höhe von 6 - 5 = 1 Einheit, vor." Bereits ohne Durchführung eines statistischen Tests sieht man sofort, dass diese Hypothese anhand der Daten nicht abzulehnen ist, denn das ist die Beobachtung: Der Mittelwert war in der Dosisgruppe mit 6 Einheiten um 1 Einheit höher als in der Kontrollgruppe mit 5 Einheiten. Selbstverständlich sind die Versuchsergebnisse gut mit der Hypothese vereinbar, dass der wahre Mittelwert der Dosisgruppe μ_D = 6 beträgt und höher ist als in der Kontrollgruppe (in welcher der wahre Mittelwert μ_{K} = 5 betragen mag).

Was aber, wenn der Mittelwert der DCF-Fluoreszenz in der niedrigsten Dosisgruppe ganz genauso groß ist wie in der Kontrollgruppe? Spätestens in einem solchen Fall scheint die allgemeine "Empfindung" dem Toxikologen zu signalisieren, dass hier kein Effekt vorliegt. An dieser Stelle sei der Begriff des Vertrauensbereichs eingeführt, nämlich folgendermaßen. In unserem Beispiel mit einem Mittelwert von 6 haben wir festgestellt, dass man nicht nur die Hypothese prüfen kann $\mu_{K} = \mu_{D}$, sondern auch die Hypothese einer Übereinstimmung des empirischen Mittelwerts μ_{D} mit irgendeinem festen Wert. Angenommen, wir haben in unserem Experiment in der niedrigsten Dosis einen Mittelwert von 5 gefunden, genauso groß wie in der Kontrollgruppe. Wir prüfen nun aber die Nullhypothese: "Der wahre Mittelwert beträgt im Falle einer Behandlung solcher Zellkulturen mit genau dieser Dosis $\mu_{D} = \mu_{K} + 1 = 6$." Diese Hypothese müsste sich widerlegen lassen, um annehmen zu dürfen, dass $\mu_{K} = \mu_{D}$. Für die Ermittlung des Werts der Prüfgröße t gibt es für den Fall der Prüfung der Übereinstimmung eines empirischen Mittelwerts mit einem vorgegebenen Wert folgende Formel:

 $t = |x_m - \mu| / (s / \sqrt{n}); FG = n - 1$

mit:

- t: berechneter Wert der Prüfgröße t
- x_m: anhand der Daten berechneter Mittelwert
- μ: hypothetischer wahrer Mittelwert
- s: anhand der Daten berechnete Standardabweichung
- n: Stichprobenumfang
- FG: Freiheitsgrade

In unserem Fall erhalten wir

 $t = |5 - 6| / (2 / \sqrt{5}) = 1,118; FG = 5 - 1 = 4.$

Dies ergibt einen p-Wert von 0,33. Das heißt: Der empirisch ermittelte Mittelwert von 5 unterscheidet sich nicht signifikant von einem vorgegebenen Mittelwert von 6. Die Hypothese muss nicht notwendigerweise verworfen werden, dass die Dosis einen Effekt ausgeübt hat. Der empirische Mittelwert von 5 ist selbstverständlich nicht signifikant vom empirischen Mittelwert der Kontrolle verschieden, er ist aber auch nicht signifikant von einem hypothetischen Mittelwert von 6 verschieden. Der vorgegebene Mittelwert von 6 war hier willkürlich gewählt. Man könnte nun verschiedene hypothetische Mittelwerte annehmen und jeweils prüfen, ob die beobachteten Daten signifikant davon abweichen. Das geht aber einfacher: Man kann den **Bereich** hypothetischen. Diesen Bereich kann man Vertrauensbereich nennen. Für den Fall normalverteilter Variablen gibt es dazu folgende Formel (die der obigen Formel für t entspricht):

Vertrauensbereich des Mittelwerts = $x_m \pm t_{\alpha:FG} s / \sqrt{n}$

Dabei ist $t_{\alpha;FG}$ der Zahlenwert der t-Verteilung für ein Signifikanzniveau von α und Freiheitsgrade FG. In unserem Beispiel von $x_m = 5$, s = 2, n = 5 erhalten wir für $\alpha = 5$ % einen Bereich (95%-Vertrauensbereich) von 2,52 bis 7,48. Das heißt, es gibt keinen Grund anzunehmen, dass die beobachteten Mittelwerte von 5 nicht auf einem wahren Mittelwert von z. B. 3 oder von 7 beruhen. Die beobachteten Mittelwerte von 5 sind weder gegenüber einem wahren Mittelwert von 3 noch von 7 signifikant verschieden. Der wahre Mittelwert der Kontrollgruppe könnte 3 betragen und der wahre Mittelwert der NOAEL-Dosisgruppe könnte aufgrund eines adversen Substanzeffektes dagegen 7 betragen. Rein statistisch könnte ebenso der wahre Mittelwert der Kontrollgruppe 7 und der wahre Mittelwert der NOAEL-Dosisgruppe aufgrund eines protektiven Substanzeffektes 3 betragen. Wir **wissen nicht**, ob die wahren Mittelwerte von Kontroll- und NOAEL-Gruppe identisch sind und auch rein zufällig zu gleichen empirischen Mittelwerten geführt haben oder ob tatsächlich Substanzeffekte eine Rolle gespielt haben, die aber durch die Zufallsstreuung verwischt wurden.

Zusammengefasst: Nach dem Konzept des *proof by contradiction* können bei einem nicht signifikanten Testergebnis keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden. Das Signifikanzniveau kann dabei *nach* dem Versuch festgelegt werden. Aus dem Konzept ergibt sich zwangsläufig, dass mehrfaches Testen, z. B. für den Vergleich mehrerer Dosisgruppen mit einer einzigen Kontrollgruppe kein Problem darstellt. An der Aussage des p-Werts ändert sich nichts dadurch, dass in dem Versuch noch weitere Tests durchgeführt werden. Die Begriffe der Irrtumswahrscheinlichkeit, des Fehlers 1. Art, des Fehlers 2. Art und der statistischen Power gibt es in diesem Konzept nicht. Diese Begriffe stammen aus dem Konzept von Neyman und Pearson, das nachfolgend erläutert wird.

4.3 Das Konzept *rule of inductive behaviour* (nach J. Neyman, E.S. Pearson)

Das Konzept des Hypothesentests von Neyman und Pearson ist als ein von der "Philosophie" her anderes Konzept als das Fisher-Konzept anzusehen. Man kann es auch als Weiterentwicklung des Fisher-Konzepts verstehen (Neyman hat zeitweise am selben Institut wie Fisher gearbeitet und es wegen der Differenzen mit Fisher verlassen; im Jahr vor Fisher's Tod veröffentlichte Neyman, 1961, eine Arbeit mit dem Titel "Silver jubilee of my dispute with Fisher"). Eine Tücke im Verständnis der Konzepte für den heutigen Naturwissenschaftler besteht darin, dass im Neyman-Pearson-Konzept (NP-Konzept) eine Irrtumswahrscheinlichkeit eine Rolle spielt, zu deren Beurteilung ein Zahlenwert nach der mathematisch gleichen Formel berechnet wird wie der p-Wert des Fisher-Konzepts. Sie wird aber in einem anderen Kontext interpretiert. Lehrbücher enthalten Elemente des NP-Konzepts, wonach in einem statistischen Test zwei Hypothesen gegeneinander gestellt werden: die zu prüfende Nullhypothese H₀ und eine Alternativhypothese H₁. Im Ergebnis des Tests ist die Nullhypothese entweder abzulehnen (reject) oder zu akzeptieren (accept). Gedanklicher Hintergrund dieses Konzepts ist es, "auf lange Sicht" (on the long run), d. h. bei sehr häufiger Anwendung dieses Verfahrens - mit einer definierten Wahrscheinlichkeit - möglichst wenige Fehlentscheidungen zu treffen. Dazu gilt es als erforderlich, eine scharfe Grenze für die Entscheidung festzulegen. Das ist das mit α bezeichnete Signifikanzniveau, das hier vor der Datenanalyse festgelegt werden muss. Gebräuchlich ist das Signifikanzniveau von 5 %, d. h. α = 0,05. Wenn sich in der Datenanalyse ein p-Wert von 0,049 ergibt (berechnet nach derselben Formel wie der p-Wert des Fisher-Konzepts), dann ist das Ergebnis signifikant, die Entscheidung muss dann lauten "Nullhypothese abgelehnt". Falls der p-Wert dagegen 0,051 beträgt, dann erfolgt die "knallharte" Entscheidung "Nullhypothese gilt" (Entscheidung, nicht Beweis!). Der genaue Zahlenwert der Wahrscheinlichkeit spielt dabei keine Rolle, 0,049 und 0,001 sind signifikant, 0,051 und 0,23 sind nicht signifikant. Nur auf diese Weise ist die Interpretation des Signifikanzniveaus als Langzeit-Irrtumswahrscheinlichkeit zutreffend. So erscheinen jedenfalls die Interpretationen in der "Sekundärliteratur". Der "Erfinder" selbst hat es einmal folgendermaßen formuliert (Neyman, 1957): "A test of a statistical hypothesis H consists of a rule, so-called rule of inductive behaviour, of rejecting the hypothesis H if the observations fall into a specified category, called the "critical region" w, and of abstaining from rejecting H in all other cases. (For the sake of brevity, instead of saying "abstain from rejecting H," we say "accept H".)"

Nach diesem Konzept wird auf lange Sicht eine in Wahrheit zutreffende Nullhypothese (Toxikologie: kein Effekt) nur mit einem Fehler von 5 % verworfen, d. h. man hat mit einer "Irrtumswahrscheinlichkeit" von nur 5 % einen (adversen) Effekt angenommen. Wichtig aber, und darin besteht überhaupt der Sinn der Formulierung einer präzisen Alternativhypothese: Es sollen nicht nur Aussagen zur Wahrscheinlichkeit gemacht werden, fälschlich einen Effekt zu postulieren, sondern auch zur Wahrscheinlichkeit, fälschlich *keinen* Effekt zu postulieren. In der Toxikologie kann z. B. bei Beibehalten der Nullhypothese in der NOAEL-Frage insofern eine Fehlentscheidung getroffen werden, als tatsächlich Substanzwirkung bei dieser Dosis besteht. Im NP-Konzept ist das der Fehler 2. Art, die Wahrscheinlichkeit für ein *falsch negatives* Ergebnis. Das Signifikanzniveau ist die festgelegte Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art, d. h. dafür, fälschlich die Nullhypothese abzulehnen, in der Toxikologie also für ein *falsch positives* Ergebnis. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 %, d. h. ein Signifikanzniveau von α = 0,001, bedeutet hier, nur in 0,1 % der Fälle einen Effekt zu postulieren, obwohl die Substanz bei dieser Dosis tatsächlich keinen Effekt erzeugt hat. Die Toxikologie würde in diesem Fall anstreben, möglichst wenig "falschen Alarm" zu geben. Über die Irrtumsmöglichkeiten in die andere Richtung, nämlich dass ein NOAEL propagiert wird, obwohl die Dosis tatsächlich einen Effekt verursacht hat, wird in den Publikationen in der Regel nichts ausgesagt. In dem Konzept des *inductive behaviour* sind aber zwangsläufig beide Fehlermöglichkeiten enthalten. Die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art, also dafür, dass die Nullhypothese fälschlich beibehalten wird, wird üblicherweise mit β abgekürzt. Die Differenz 1 - β wird als statistische Power, Macht oder Teststärke bezeichnet.

Dieses Konzept erscheint relativ gut geeignet z. B. für die Qualitätskontrolle von Produkten bei einem Wirtschaftsunternehmen. Dort müssen Entscheidungen getroffen werden, z. B.: Eine Charge wird wegen "signifikanter" Abweichung vom Qualitätsstandard verworfen; alternativ: Sie wird an den Kunden ausgeliefert. Man muss sich dies an Beispielen klarmachen. Ich versuche hier, dieses Konzept konsequent auf ein Beispiel anzuwenden, das im Ansatz bei Gigerenzer et al. (2004) beschrieben ist. Es geht um eine Fabrik. Die Fabrik stelle Metallplättchen für medizinische Geräte her, 1.000 Stück am Tag. Der optimale Durchmesser der Plättchen beträgt 8 mm. Plättchen mit einem Durchmesser von 10 mm könnten unter Umständen dem Patienten schaden. Ein mittlerer Durchmesser von 10 mm ist der worst case, mit dem die Firma aufgrund der technischen Gegebenheiten rechnet. Die Qualitätskontrolle in der Fabrik nimmt täglich Proben, misst den Durchmesser der Plättchen der Stichprobe und muss dann entscheiden, ob die Plättchen ausgeliefert werden. Zu große Plättchen könnten nicht nur den Patienten schaden, sondern deshalb auch der Reputation der Firma. Die Qualitätskontrolle geht daher so vor, dass täglich die Hypothese geprüft werden muss: H_1 : μ = 8 mm, wobei zur Berechnung des β -Fehlers die Alternativhypothese formuliert wird H₂: μ = 10 mm (μ ist der unbekannte wahre Mittelwert der Tagesproduktion von 1.000 Plättchen). Falls der Mittelwert der Stichprobe nicht signifikant von 8 mm verschieden ist, dann wird H₁ akzeptiert, die Firma handelt so, als wäre der Mittelwert der Plättchen 8 mm (das heißt nicht, dass der wahre Mittelwert tatsächlich 8 mm betragen muss); Charge wird ausgeliefert. Falls sich der Mittelwert der Stichprobe signifikant von 8 mm unterscheidet, dann wird H₁ abgelehnt, die Firma handelt so, als wäre der Mittelwert zu hoch; Charge wird eingeschmolzen.

Zum Vorgehen bei dieser Qualitätskontrolle im Einzelnen: Das Signifikanzniveau (Fehler 1. Art) wird bei 10 % festgelegt, $\alpha = 0,10$; ein zu großer Fehler 1. Art, d. h. "falscher Alarm" wird teuer für die Firma, da zu viele Chargen unnötigerweise eingeschmolzen werden. Es wird ein Fehler 2. Art dagegen lediglich mit $\beta = 0,001$ akzeptiert (Power = 1 - $\beta = 99,9$ %), da ein zu großer Fehler 2. Art besonders teuer für die Firma werden kann, wenn die Reputation der Firma leidet oder gar Schadenersatzforderungen erhoben werden. Mit α , β und der Standardabweichung ist die Stichprobengröße für die Qualitätskontrolle zu berechnen. Die Standardabweichung dürfe bei den Maschinen in der Firma mit $\sigma = 2$ mm als konstant angesehen werden. Damit lässt sich abschätzen, dass zirka 25 Plättchen vermessen werden müssen, um den geplanten Test "kunstgerecht" durchzuführen. Nun ein Beispiel für ein mögliches Ergebnis der Stichprobenkontrolle. Es sei an 25 Plättchen ein Mittelwert von x_m = 8,7 mm festgestellt worden mit einer Standardabweichung von s = 2 mm. Damit kann mittels der (in Abschnitt 4.2) angegebenen Formel ein t-Wert berechnet werden:

$$t = |x_m - \mu| / (s / \sqrt{n}); FG = n - 1$$

hier:

t = $| 8,7 \text{ mm} - 8 \text{ mm} | / (2 / \sqrt{25}) = 1,75; \text{ FG} = 25 - 1 = 24$

Anhand der tabellierten t-Werte stellt man fest, dass der berechnete *t-Wert größer* ist als der tabellierte Wert $t_{\alpha;FG}$ ($t_{0,10;24} = 1,71$; d. h. der erhaltene *p-Wert* ist *kleiner* als das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,10$). Die Firma würde in diesem Fall davon ausgehen, dass die Charge nicht in Ordnung ist und keinesfalls ausgeliefert werden darf. Das bedeutet nicht, dass dort jemand glaubt, der wahre mittlere Durchmesser der Plättchen sei 10 mm, aber die Charge wird eingeschmolzen. Diese Prozedur wird in im Prinzip gleicher Weise Tag für Tag angewandt. Wenn stets das Signifikanzkriterium von $\alpha = 0,10$ exakt beachtet wird, dann wird die Firma nur in 10 % aller Chargen, die "in Ordnung" waren (genauer: $\mu = 8$ mm), die Charge einschmelzen, und sie wird nur in 0,1 % aller Chargen, die nicht "in Ordnung" waren (genauer: $\mu =$ 10 mm), diese Charge ausliefern und Schadenersatzforderungen riskieren.

Wir wollen nun ein "Gegenszenario" betrachten, in dem genau dieselben Gegebenheiten herrschen mit einer einzigen Ausnahme: der "Risikoakzeptanz" der Firma. Wir nehmen an, dass die Firma die Konsequenzen aus einem Fehler 2. Art - der Auslieferung zu großer Plättchen - als weniger gravierend einschätzt und sich mit einer Power von 90 % begnügt. Sie wird dann auf einen benötigten Stichprobenumfang von lediglich 10 Stück schließen. Angenommen, Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzniveau sind genau gleich wie oben, dann ergibt sich:

 $t = | 8,7 \text{ mm} - 8 \text{ mm} | / (2 / \sqrt{10}) = 1,11; \text{ FG} = 10 - 1 = 9$

Anhand der tabellierten t-Werte stellt man nun fest, dass der berechnete *t-Wert kleiner* ist als der tabellierte Wert $t_{\alpha;FG}$ ($t_{0,10;9}$ = 1,83; d. h. der erhaltene *p-Wert* ist *größer* als das Signifikanzniveau von α = 0,10). Die Firma würde in diesem Fall davon ausgehen, dass die Charge in Ordnung ist und ausgeliefert werden darf. Obwohl die Kenngrößen der Plättchen genau dieselben waren wie im ersten Szenario, führen sie zu einer anderen Entscheidung. Der Unterschied liegt in der Bewertung des Risikos für den Fehler 2. Art, die oben zu einem größeren Stichprobenumfang und damit größeren "Empfindlichkeit" des Tests geführt hat. Wie groß der wahre mittlere Durchmesser der 1.000 Plättchen war, wissen wir in beiden Fällen nicht.

Man kann darüber streiten, wie gut sich dieses Konzept für die regulatorische Toxikologie eignet. In der Toxikologie sollte es einerseits nicht allein darum gehen, auf lange Sicht möglichst wenige Fehlentscheidungen zu treffen. Vielmehr müssen im Einzelfall Bewertungen vorgenommen werden, die - insbesondere im Fall von Krebsrisiken - schwerwiegende Eingriffe in Leben und Gesundheit von Menschen bedeuten können. Außerdem ist es sehr schwer, *vor* einer toxikologischen Prüfung eine präzise "Alternativhypothese" zu formulieren. Andererseits weist bereits die Bezeichnung "regulatorische" Toxikologie darauf hin, dass dort Entscheidungen notwendig sind. In der Praxis ist es in der Regel unvermeidbar, "**sich so zu verhalten, als ob Annahme A oder B zutreffen würde**". Gerade bei Krebsrisiken lässt sich gar nicht "wissenschaftlich nachweisen", ob Annahme A oder B zutrifft. Für die Regulation muss aber eine Entscheidung getroffen werden. Diese wird anhand einer Interpretation konkreter Daten hergeleitet. Man hat es daher mit so etwas wie "inductive behaviour" zu tun, auch wenn man diesen Begriff nicht benutzt. Offenbar haben die Erfinder der statistischen Methoden hinsichtlich der erkenntnistheoretischen Grenzen und des ethisch Gebotenen weitergedacht als es heute in der vereinfachten Praxis der Anwendung dieser Methoden zum Ausdruck kommt. Üblicherweise tut man so, als habe man es mit folgenden beiden Hypothesen zu tun: H_0 : $\mu_D = \mu_K$, d. h. Mittelwert in der Dosisgruppe ist gleich Mittelwert in der Kontrollgruppe; versus H_A : $\mu_D \neq \mu_K$, d. h. Mittelwert in der Kontrollgruppe nicht gleich Mittelwert in der Dosisgruppe. Aber: Für die Hypothese H_A : $\mu_D \neq \mu_K$, kann man nicht eindeutig einen β -Wert oder Power-Wert angeben. H_A beinhaltet hier eine Menge von unendlich vielen Hypothesen, für die Publikation erinnern, in der jemals systematisch wie in dem Plättchenbeispiel α , β und die notwendige Stichprobengröße erörtert und festgelegt wurden. Gigerenzer et al. (2004) haben sicherlich bewusst einen sehr kleinen Fehler 2. Art (β = 0.001 = 0.1 %) wegen eines möglichen gesundheitlichen Schadens gewählt und für das Risiko finanzieller Verluste einen relativ großen Fehler 1. Art zugelassen. Dies würde man intuitiv mit ärztlicher Ethik assoziieren. Toxikologen verzichten dagegen in der Regel völlig auf die Diskussion von β (das Risiko, "nicht signifikant" zu postulieren, obwohl gesundheitsschädliche Effekte vorliegen), legen aber häufig großen Wert darauf, den Fehler 1. Art, also das "Risiko des falschen Alarms", nicht zu groß werden zu lassen (also z. B. α = 0,001 = 0,1 %).

Fehler 1. und 2. Art stehen miteinander in Zusammenhang, Verringerung des Fehlers 1. Art führt zu einem Anstieg des Fehlers 2. Art und umgekehrt. Es gibt aber für diesen Zusammenhang keine universelle Formel. Die Power hängt unter anderem ab vom Signifikanzniveau und vom Stichprobenumfang. Üblicherweise wird in Lehrtexten eine **Power von 80 %** gefordert (d. h., $\beta = 0,20$). In Abb. 4.1 habe ich für das Beispiel von Student's t-Test bei gleichen Varianzen und gleichen Stichprobenumfängen in Kontroll- und Versuchsgruppe die Abhängigkeit der Power (1 - β) vom wahren Unterschied zwischen den Mittelwerten der verglichenen Versuchsgruppen dargestellt. Die Standardabweichung ist in der Abb. 4.1 gleich 1 gesetzt, die Zahlenwerte auf der x-Achse können daher auch als Vielfaches der Standardabweichung interpretiert werden. Die Abb. 4.1 zeigt, dass mit einem Stichprobenumfang von 5 (Individuen, Petrischalen etc.) je Gruppe ein Unterschied zwischen den Mittelwerten in Höhe von weniger als der zweifachen Standardabweichung relativ häufig (in mehr als 20 % der Fälle) *nicht* als signifikant bewertet wird, obwohl in allen Fällen in Wahrheit ein Unterschied in genau dieser Höhe der doppelten Standardabweichung besteht.

Anders ausgedrückt: Angenommen es würden 100 Substanzen in einer bestimmten Dosis geprüft und bei all diesen 100 Substanzen würde die Dosis *in Wahrheit* den Mittelwert eines Toxizitätsparameters (z. B. ROS-bedingte DCF-Fluoreszenz) um den Betrag der Standardabweichung erhöhen, dann ist bei Stichprobengrößen von 5 zu erwarten, dass nur in 25 Fällen ein Effekt postuliert wird, in 75 von 100 Fällen wird die Nullhypothese "kein Effekt" (fälschlich) beibehalten werden (Power = 25 %). Wie gesagt, wir haben es in diesem Beispiel mit dem Szenario zu tun, dass die Wahrheit bekannt ist und in Wahrheit bei allen 100 Substanzen die Effekte bestehen, trotzdem wird dann hier in 75 Fällen entgegen der Wahrheit die Entscheidung getroffen: nicht signifikant. Würde der NOAEL im Sinn einer Wirkungsschwelle interpretiert, dann würde der Toxikologe hier in 75 von 100 Fällen fälschlich entscheiden, sich so zu verhalten, als ob eine Wirkungsschwelle vorliege.



Abb. 4.1 Schwäche von Experimenten mit gebräuchlichen Stichprobenumfängen (Tierzahlen) beim statistischen Erkennen von Mittelwertsunterschieden, die kleiner sind als die doppelte Standardabweichung.



Abb. 4.2 Schwäche von Experimenten mit gebräuchlichen Stichprobenumfängen (Tierzahlen) beim statistischen Erkennen von Unterschieden in prozentualen Häufigkeiten ("Risiken"), die kleiner sind als 10 oder 15 %.

% Statistische *Power* von Student's t-Test (zweiseitig)

Abb. 4.2 zeigt die mangelnde Teststärke des gebräuchlichen Tests für die Beurteilung relativer Häufigkeiten, also z. B. von Prozentsätzen tumortragender Tiere in Karzinogenitätsprüfungen. Die Teststärke ist unter anderem abhängig von der Häufigkeit des untersuchten Tumortyps bei unbehandelten Tieren (Hintergrundrisiko). Beispielhaft ist für Abb. 4.2 ein Hintergrundrisiko von 2 % verwendet. Für besonders seltene Tumoren verbessert sich die Power auf annähernd 80 % bei einem wahren Exzess-Risiko von 10 %. Bei spontan häufigen Tumoren verschlechtert sich die Power entsprechend. In jedem Fall besitzt aber eine Karzinogenitätsprüfung mit Gruppengrößen von 50 Tieren keine befriedigende Power, d. h. keine hinreichende "Sensitivität", um Exzess-Risiken von weniger als 10 % entdecken zu können.

Vor dem Hintergrund des Neyman-Pearson-Konzepts wird die Beurteilung von NO-AELs bei Lenz et al. (2009) und auch bei der MAK-Kommission verständlich - und kritikwürdig. Ein NOEL oder NOAEL ist (nach verbreitetem Verständnis) die höchste Dosis eines Versuchs, bei dem ein statistischer Test ergeben hat: nicht signifikant. Nach der NP-Logik wird nun die Entscheidung induziert: Die Nullhypothese wird akzeptiert, es liegt kein Effekt vor. Der Toxikologe, der mittels Hypothesentest (mit vorgegebener Irrtumswahrscheinlichkeit α) ein NOAEL festgestellt hat, hat die Entscheidung getroffen "es liegt kein adverser Effekt vor". Der Umstand, dass ein Untersucher diese Entscheidung getroffen hat, ist nicht gleichbedeutend mit "Evidenz", dass eine Wirkungsschwelle besteht. Die Philosophie dabei ist: Handle so, als ob kein Effekt bestünde (inductive behaviour). Das heißt nicht, dass kein Effekt besteht. Vor allem: Wenn diesem NP-Konzept (mit vorgegebener Irrtumswahrscheinlichkeit α und Als-ob-Entscheidung) gefolgt wird, dann sollten die übrigen Kriterien beachtet werden - Ermittlung von ß bzw. Power vor der Studie und diesbezügliche Transparenz. Die Power kann auch nach der Studie analysiert werden; Neyman (1957): "Now let us consider the situation when we are faced with the necessity of interpreting the results of an experiment planned and performed by some else. Here again the numerical values of the power of the test may be very useful."

Im Falle von NOAEL/Wirkungsschwelle ist zu fragen, was die Entscheidung "kein Effekt" bedeutet. Wenn ich als Untersucher selbst von den Konsequenzen meiner Entscheidung betroffen bin, dann mag dies "automatisch" zu einer Balance zwischen den Fehlern 1. und 2. Art führen. Dies mag auf das oben genannte Fabrik-Beispiel zutreffen. Ich als Unternehmer kann dort die Entscheidung treffen, die Charge zu verwerfen oder auszuliefern. Dabei sind zwei Fehler und ihre Konsequenzen möglich: Falls ich eine gute Charge verworfen und neu produziert habe, dann hatte ich unnötige zusätzliche Produktionskosten; falls ich eine schlechte Charge als gut bewertet und ausgeliefert habe, dann habe ich vielleicht einen Kunden verloren. Im Falle toxikologischer Daten mag ich für mich selbst die Entscheidung treffen, dass ich mich selbst dieser Exposition aussetze, weil der toxikologische Test nicht signifikant war, ich trage dann das Risiko des möglichen Fehlers in meiner Entscheidung. Falls ich falsch entschieden habe und doch infolge der Exposition erkranke, ist es dann ein Trost, dass ich auf lange Sicht nur in 5 % aller Fälle nach einer entsprechenden Entscheidung erkrankt wäre? In der regulatorischen Toxikologie wird aber die Entscheidung von den Toxikologen für andere getroffen. Der Toxikologe entscheidet bei fehlender Signifikanz: "NOAEL" oder "Wirkungsschwelle". Das Risiko einer Fehlentscheidung tragen Andere - die Exponierten.

Die praktische Anwendung statistischer Tests in der Frage von NOAEL und Wirkungsschwelle erscheint besonders problematisch, wenn in Bezug auf das Signifikanzkriterium eine scharfe Grenze exakt beim Wert von α benutzt und bei p < α die Nullhypothese "akzeptiert" wird, aber gleichzeitig keine eindeutige Alternativhypothese formuliert wurde, so dass β -Fehler und Power nicht kontrolliert sind. Man mag dies als Folge der Vermischung der Konzepte von Fisher und von Nevman/Pearson ansehen, und das scheint häufig die Praxis: Einerseits legt man nur eine einzige Hypothese fest, die Nullhypothese (wie im Konzept vom Fisher), andererseits redet man von Irrtumswahrscheinlichkeit und "akzeptiert" Nullhypothesen wie im NP-Konzept, dabei bleiben der β-Fehler und die Power aber (unsachgemäß) unkontrolliert. Die Power eines Tests, "irgendeinen Effekt" zu erkennen, kann man nämlich nicht sinnvoll angeben. Die Abbildungen 4.1 und 4.2 zeigen, dass die Power vom Betrag des nachzuweisenden Unterschieds (Effekts) abhängt. Bei festgelegter Stichprobengröße ist die Power, eine relativ geringe Effektausprägung zu "erkennen", gering. Bei sehr großen Stichprobenumfängen werden dagegen fast beliebige Effektausprägungen, auch sehr kleine, "signifikant". Zugespitzt kann man sagen: Es ist eher eine Frage des Stichprobenumfangs als der Toxizität einer Substanz, ob ein NOAEL gefunden wird. Entsprechend kleine Dosen werden stets mit entsprechend kleinen Effektausprägungen verbunden sein. Unter allen für diesen Bericht ausgewerteten Publikationen habe ich keine einzige gefunden, in der ein Hypothesentest regelgerecht mit Angabe von α , β und daraus abgeleitetem Stichprobenumfang berichtet wurde.

Lesen wir nochmals beim "Erfinder der statistischen Power" nach: "Whatever I said about interactions applies with equal force to other cases when a test failed to detect a significant effect. In cases of this kind, to act as if the hypothesis tested has been established is obviously precipitous. A partial protection against errors is the calculation of the power of the test. Should this calculation show that the probability of detecting an appreciable error in the hypothesis tested was large, say .95 or greater, then and only then is the decision in favour of the hypothesis tested justifiable in the same sense as the decision against this hypothesis is justifiable when an appropriate test rejects it at a chosen level of significance." (Neyman, 1957). Neyman hat hier eine Power von 95 % gefordert, um das "Akzeptieren" einer Nullhypothese (Toxikologie: kein Effekt) zu rechtfertigen. Die Realität der Toxikologie ist davon weit entfernt.

Schlussfolgerung: Es lässt sich mit *keinem* statistischen Test unterscheiden, ob die Substanz aufgrund ihrer Toxizität, aber kleinen Dosis, nur einen kleinen Effekt hervorgerufen hat, der ein "nicht signifikantes" Ergebnis vortäuscht, oder ob bei dieser Dosis tatsächlich keine Toxizität vorhanden ist. Das ganz grundsätzliche Problem, dass man schlicht *nicht weiß*, ob Messdaten wie 7 ± 2 versus 5 ± 2 die Ausprägung eines Zufalls oder der geringen Dosis eines toxisch wirksamen Stoffs sind, lässt sich auch mit noch so durchdachter Mathematik nicht lösen. Schließlich: Auch dann wenn das Ergebnis der Messdaten für Kontroll- und Testgruppe lautet: 5 ± 2 versus 5 ± 2, auch dann weiß man nicht, ob dies die Ausprägung eines Zufalls oder eines relativ kleinen toxischen Effekts ist, also ob tatsächlich Toxizität bei dieser Dosis besteht und die Mittelwerte nur deshalb gleich sind, weil die zufällige Streuung der Einzelwerte den toxischen Effekt verdeckt. Erfahrungsgemäß sträubt sich der Toxikologe intuitiv gegen diese Einsicht, weil "doch kein Effekt beobachtet" wurde.

Der Streit um die Frage, ob man beim Versuchsergebnis berechnete p-Werte angeben solle und diese dann verbal interpretieren darf, oder ob man nur angeben sollte, ob der p-Wert größer oder kleiner als das Signifikanzniveau von 5 % ist, ob also ein "signifikantes" oder "nicht-signifikantes" Ergebnis vorliegt, ist daher insoweit aufzulösen, dass es eine objektive Antwort auf diese Frage nicht gibt. Es handelt sich schlicht um zwei unterschiedliche "logische" oder "philosophische" Ansätze, zwei Schulen. Grundsätzlich - d. h. ohne Bezug auf die spezifischen Fragestellungen eines bestimmten Fachgebiets - erscheint beides legitim. Gleichgültig aber, für welches Konzept man sich entscheidet, in jedem Fall sind die Grenzen der Aussagemöglichkeiten zu beachten. Diese Grenzen sollten **transparent** dargelegt werden. Falls man ein Verfahren mit "dichotomen" Entscheidungen in signifikant und nichtsignifikant praktiziert, was dann zu einem Verhalten in dem einen oder anderen Sinne führt (*inductive behaviour*), dann ist die Frage der Sensitivität bzw. Power sorgfältig zu beachten.

4.4 Korrekturen für multiples Testen verringern die "Sensitivität" (Power) statistischer Tests

Das in Abschnitt 4.2 beschriebene, auf R.A. Fisher zurückzuführende Signifikanz-Konzept des proof by contradiction erfordert keine Korrekturen für multiples Testen. Das auf J. Neyman und E.S. Pearson zurückzuführende Signifikanz-Konzept des rule of inductive behaviour (NP-Konzept) beruht dagegen auf vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeiten, woraus sich besondere Fragen bei "multiplem" Testen ergeben, z. B. wenn mehrere Dosisgruppen mit ein und derselben Kontrollgruppe verglichen werden. Die vor dem Versuch festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit von z. B. α = 0.05 soll die Wahrscheinlichkeit dafür angeben, dass auf lange Sicht nur in exakt 5 % der Versuche "falsch positive" Entscheidungen getroffen werden; wenn man so will: eine festgelegte "Spezifität" von 95 % gegenüber der wahren Toxizität im betreffenden experimentellen System. Dies trifft nur dann zu, wenn die Entscheidung über ", positiv" oder ", negativ" auch exakt an der Grenze von p = 0.05 getroffen wird: p < 0,05 (z. B. p = 0,04999) positiv, p > 0,05 (z. B. p = 0,05001) negativ. Korrekturen für multiples Testen lassen auch einen Umkehrschluss zu: Wann immer ein Autor Korrekturen für multiples Testen vornimmt, dann gibt er damit zu erkennen, dass er dem NP-Konzept folgt*.

Falls in einem toxikologischen Test 3 Dosisgruppen eingesetzt werden und die Frage untersucht wird, ob die Substanz toxisch in dem Versuchsmodell ist, und falls $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde, dann dürfte auch nur *ein* p-Wert berechnet werden, mit dessen Hilfe die Entscheidung *"kleiner oder größer als 0,05"* getroffen wird. Üblicherweise werden aber alle 3 Dosisgruppen einzeln mit der gemeinsamen Kontrollgruppe verglichen und *drei* p-Werte berechnet. Falls dann nur einer der p-Werte kleiner ist als 0,05 und als Kriterium für die Entscheidung dient, die Substanz sei toxisch, dann ist es nicht mehr zutreffend, dass die Irrtumswahrscheinlichkeit auf lange Sicht 5 % beträgt, denn man hat ja dreimal "probiert". Gemäß der so genannten **Bonferroni**-Korrektur beträgt die Irrtumswahrscheinlichkeit für ein System mit 3 Einzeltests 1 - $(1 - 0,05)^3 = 14,3$ %. Wenn man also Wert darauf legt, dass die Anfälligkeit des

^{*} Allerdings erscheint selbst unter dem NP-Konzept eine Begrenzung der Signifkanz auf eine absolut scharfe Grenze nicht zwingend. Der Umstand, dass das Signifikanzniveau exakt bei 5,000 % liegen *muss* und nicht z. B. innerhalb eines Bereichs von 4 bis 6 % schwanken darf, ist dabei als Bestandteil der Philosophie der "modernen" Anwendung des Testens zu betrachten, eine zwingende wissenschaftliche Begründung dafür habe ich nicht gefunden.

Systems für "falsch positive" Entscheidungen auf keinen Fall zunimmt, d. h. dass die "Spezifität" des Systems auf keinen Fall abnimmt, dann muss α für jede der drei p-Wert-Berechnungen niedriger angesetzt werden, so dass sich insgesamt für die drei Berechnungen wieder eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ergibt. Nach der Bonferroni-Methode wäre dann α je Einzeltest bei 1,7 % anzusetzen, denn 1 - (1 - 0,017)³ = 5 %. Neben dem Korrekturverfahren der Bonferroni-Methode gibt es spezielle statistische Tests für solche Situationen. Für die Situation, dass mehrere Dosisgruppen gegenüber einer gemeinsamen Kontrollgruppe getestet werden, gibt es Dunnett's Test.

Manche Autoren verwenden auch für mehrere Dosisgruppen Student's t-Test und setzen aber das α -Niveau ohne Bonferroni-Berechnung (willkürlich?) niedriger an, um in Anbetracht des "multiplen Testens" einer Abnahme der Spezifität entgegen zu wirken. Im Abschnitt 3.2.1.1 dieses Berichts habe ich vermutet, dass dies der Grund war, weshalb Cavallo et al. (2004) ein Signifikanzniveau von 0,1 % bei ihrer In-vitro-Prüfung faserförmiger Stäube angesetzt haben. Bei solchen Veränderungen des Signifikanzniveaus je Test ist aber zu beachten, dass damit zwangsläufig auch die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art verändert wird (s.o.). Wenn α verringert wird, dann wird ß zwangsläufig größer. Anders ausgedrückt: Die Sensitivität, einen Effekt je Dosisgruppe zu erkennen, wird verringert. In Abb. 4.1 sind Power-Werte für das Signifikanzniveau von 5 % aufgetragen, die Grafik zeigt, dass bei einem Stichprobenumfang von 5 ungefähr Unterschiede von einer doppelten Standardabweichung oder mehr mit einer Power von mindestens 80 % erkannt werden können. Es lässt sich analog berechnen, dass die Power bei einem Signifikanzniveau von 0,1 % auf ungefähr 30 % abnimmt; nur Unterschiede von mindestens der dreifachen Standardabweichung können dann mit einer Power von mindestens 80 % erkannt werden.

Anders formuliert:

- Ein Signifikanzniveau von 0,1 % bedeutet eine sehr hohe Spezifität (unter 1.000 im Versuchsmodell untoxischen Dosen wird mit n = 5 nur 1 Dosis fälschlich als toxisch postuliert werden),
- aber eine relativ geringe Sensitivität

(unter 1.000 Dosen, die in Wahrheit einen toxischen Effekt in Höhe einer einfachen Standardabweichung verursachen, werden mit n = 5 nur 30 als toxisch postuliert werden, 970 der 1.000 Dosen werden fälschlich als untoxisch klassiert werden).

In Tab. 4.1 sind die Zusammenhänge anhand eines fiktiven Beispiels veranschaulicht. Die Tab. 4.1 sollte nicht als Anleitung missverstanden werden, wie Versuchsergebnisse zu präsentieren sind: In der Tab. 4.1 sind vielmehr alternative Analysen aufgeführt, die jeweils zu unterschiedlichen Interpretationen Anlass geben können. Dies soll einen Eindruck vermitteln, wie die Interpretation eines Experiments vom statistischen oder "philosophischen" Konzept abhängt. Abb. 4.3 zeigt die Ergebnisse des fiktiven Experiments von Tab. 4.1 grafisch; nachfolgend Erläuterungen.

1. Zunächst sei die Analyse der Daten von Tab. 4.1 mit Student's t-Test im Rahmen des **R.A. Fisher** zugeschriebenen Konzept des *proof by contradiction* geschildert:

 Für jede Dosis D_i wird die Nullhypothese formuliert, der (wahre) Mittelwert der Messwerte sei gleich dem (wahren) Mittelwert unbehandelter Individuen: μ_{Di} = μ₀. Für jede Dosis wird ein p-Wert berechnet. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass (aufgrund normalverteilter Zufallsstreuung) unterschiedliche Mittelwerte wie die beobachteten oder "extremere" auftreten, falls die Nullhypothese zutrifft.

- Bei zwei der drei Dosen ergibt sich ein p-Wert von weniger als 0,05, deshalb erscheint es sehr unplausibel, dass diese Ergebnisse alleine aufgrund von Zufallsstreuung erhalten wurden. Da wir störende Einflüsse experimentell weitgehend ausgeschlossen haben, interpretieren wir die Daten als Ergebnis eines toxischen Effekts der Substanz. Wir bemerken, dass mit zunehmender Dosis größere Mittelwerte der Messgröße auftreten.
- Bei der niedrigsten Dosis ist der p-Wert relativ hoch, d. h. diese Daten mögen sehr wohl alleine aufgrund der Zufallsstreuung zustande gekommen sein, das wissen wir aber nicht, selbstverständlich könnten auch hier toxische Einflüsse der Substanz (in einem kleineren Umfang) tatsächlich vorhanden (und von der Zufallsstreuung überdeckt) sein, an dieser Stelle können wir keine Schlussfolgerung ziehen.
- Zusammengefasst: Die Substanz zeigt dosisabhängig Toxizität, über eine Toxizitätsschwelle können wir keine Aussage machen.

Student's t-Test beruht auf der Annahme, dass die Daten normalverteilt sind. Angenommen wir hätten es hier mit einem ganz neuen Experiment zu tun, bei dem wir über die statistische Verteilung der Zielvariable nichts wissen. Wir könnten deshalb Zweifel haben, ob Student's t-Test adäquat ist. Für solche Fälle gibt es mit dem Mann-Whitney U-Test einen so genannten verteilungsfreien Test, der keine bestimmte Verteilung der Daten voraussetzt. Die Ergebnisse mit dem Mann-Whitney U-Test sind hier sehr ähnlich den Ergebnissen mit Student's t-Test. Unter dem Fisher-Konzept ergeben sich daher dieselben Schlussfolgerungen.

2. Nun sei eine Interpretation von Dunnett's Test beschrieben. Dunnett's Test dient einer Korrektur für multiples Testen. Dies ergibt nur im Rahmen des Konzepts des Hypothesentestens von **Neyman und Pearson** (*inductive behaviour*) einen Sinn. Deshalb erfolgt hier die Interpretation gemäß diesem Konzept:

- Es wird die Frage untersucht: "Weist die Substanz im Versuchsmodell Toxizität auf?" Die Nullhypothese H₀ lautet: "Die Mittelwerte aller Dosisgruppen sind gleich mit dem Mittelwert der Kontrolle (keine Toxizität)"; sie wird gegen folgende Alternativhypothese H₁ geprüft "Der Mittelwert mindestes einer Dosisgruppe ist um einen Betrag von mindestens zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der Kontrollgruppe verschieden (wegen Substanztoxizität)".
- Das Signifikanzniveau wird für diese Frage bei α = 0,05 festgesetzt. Für das Erreichen einer Power von zirka 80 % zum Erkennen eines Unterschieds in Höhe der zweifachen Standardabweichung reicht nach unseren Berechnungen eine Gruppengröße n = 5 aus. Wir erachten dies als sinnvoll, da wir schwächere Ausprägungen des untersuchten Effektes in vitro nicht als gesundheitlich bedenklich für den Menschen in vivo einschätzen (nicht "advers").
- Wegen des mehrfachen Vergleichs einzelner Dosisgruppen mit einer Kontrollgruppe wird Dunnett's Test verwendet, um insgesamt das Signifikanzniveau von 5 % nicht zu verfälschen.

Tab. 4.1Alternative Analysen und Interpretationen eines fiktiven In-vitro-
Ergebnisses: Illustrierung der Variabilität von Signifikanz und Power in
Abhängigkeit vom verwendeten statistischen Test (siehe Text).

Rohdaten		Deskriptive Statistik	p-Wert		Signifikanz, Student´s Test			
Dosis	Mess- wert	x _m ± s (n)	Mann- Wh. U	Stu- dent´s	Dunn- ett´s	α = 0,05 β(δ = 2σ) = 0,20	α = 0,001 β(δ = 4σ) = 0,20	
0	1,0		Kontrolle					
0	2,9	$2,60 \pm 1,67$				Kontrolle		
0	5,0							
0	3,1	(11 0)						
0	1,0							
1	2,0			0,373	0,722	nicht signi- fikant	nicht signi- fikant	
1	3,9	3,60 ± 1,67 (n = 5)	0,344					
1	6,0							
1	4,1							
1	2,0							
2	3,1		0,036	0,036	0,060	signifikant	nicht signi- fikant	
2	6,3	5 18 + 1 05						
2	8,0	(n = 5)						
2	6,0							
2	4,0							
3	4,0			0,0104	0,011	signifikant	nicht signi- fikant	
3	7,3	6,46 ± 1,98 (n = 5)						
3	9,0		0,021					
3	7,0						incarn	
3	5,0							
Trendanalyse, hier: lineare Korrelation/Regression								
Korrelationskoeffizient r = $0,68$			p = 0,0011			α = 0,05: signifikant		
Steigung b = 1,35						α = 0,001: nicht sign.		

Abkürzungen:

x_m: Mittelwert; s: Standardabweichung; n = Stichprobenumfang

Mann Wh. U: Mann-Whitney U-Test

Anmerkung: Falls nur 2 Dosisgruppen untersucht worden wären (nur Dosis 1 und Dosis 2), dann wäre der Effekt bei Dosis 2 gemäß Dunnett's Test signifikant (p = 0,044).

 $[\]alpha$: Neyman-Pearson-Signifikanzniveau, "Irrtumswahrscheinlichkeit", Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art (Ablehung der Nullhypothese, obwohl sie zutrifft)

 $[\]beta(\delta = 2\sigma)$ bzw. $\beta(\delta = 4\sigma)$: Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art (Annahme der Nullhypothese, obwohl die Alternativhypothese zutrifft), wenn der wahre Unterschied (δ) zwischen den Mittelwerten das 2fache bzw. 4fache der wahren Standardabweichung beträgt. Anm.: Power = Teststärke = 1 - β



Abb. 4.3 Grafische Darstellung der Ergebnisse des fiktiven Toxizitätstests von Tab. 4.1.

- Für jede Dosis wird ein p-Wert berechnet.
- Bei der dritten Dosis unterschreitet der p-Wert das Signifikanzniveau, es wird die Entscheidung getroffen: "Die Substanz weist im Versuchsmodell Toxizität auf". Wir sollten uns so verhalten, als sei die Substanz toxisch.
- Die Frage einer Wirkungsschwelle wurde nicht geprüft.

3. Alternativ könnte ein Forscher folgende Argumentation in Anlehnung an das NP-Konzept führen:

- Es wird die Frage untersucht: "Weist die Substanz im Versuchsmodell Toxizität auf?" Die Nullhypothese H₀ lautet: "Die Mittelwerte aller Dosisgruppen sind gleich mit dem Mittelwert der Kontrolle (keine Toxizität)"; sie wird gegen folgende Alternativhypothese H₁ geprüft "Der Mittelwert mindestes einer Dosisgruppe ist um einen Betrag von mindestens zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der Kontrollgruppe verschieden (wegen Substanztoxizität)".
- Wir verwenden Student's t-Test, da wir ihn für adäquat halten und davon ausgehen, dass unsere Daten annähernd normalverteilt sind.
- Das Signifikanzniveau wird für unsere Fragestellung bei α = 0,001 je Einzeltest festgesetzt. In unserem Versuch werden mehrere Dosen gegenüber einer Kontrollgruppe geprüft, wegen dieses mehrfachen Testens ergibt sich insgesamt ein Signifikanzniveau von 1-(1-0,001)³ = 0,003. Für die von uns verwendete Gruppengröße n = 5 wird damit eine Power von 80 % bei einem Unterschied ungefähr in Höhe der 4fachen Standardabweichung erreicht. Wir erachten dies als ausreichend, da wir schwächere Ausprägungen des untersuchten Effektes in vitro nicht als gesundheitlich bedenklich für den Menschen in vivo einschätzen.
- Für jede Dosis wird ein p-Wert berechnet.
- Bei keiner Dosis unterschreitet der p-Wert das Signifikanzniveau, es wird die Entscheidung getroffen: "Die Substanz weist im Versuchsmodell keine Toxizität auf". Wir können uns so verhalten, als sei die Substanz nicht toxisch. Wir weisen nochmals darauf hin, dass wir Veränderungen des Mittelwerts infolge eines Substanzeinflusses um weniger als das Vierfache der Standardabweichung nicht für relevant erachten.

Nach meinem Verständnis der Literatur wären alle diese drei Auswertungen naturwissenschaftlich korrekt. Bei den beiden Ansätzen mit festem α ergibt sich allerdings das Problem, dass Effekte innerhalb eines Zwei- bzw. Vierfachen der Standardabweichung (bei allen Dosen) als gesundheitlich unbedenklich eingeschätzt werden. Dies müsste bereits vor der Versuchsdurchführung so definiert werden - und selbstverständlich in der Publikation beschrieben. Es müsste natürlich sachlogisch begründet werden - was nur in Ausnahmefällen überzeugend möglich sein dürfte. Man darf hier das Akzeptieren von Effekten innerhalb der doppelten Standardabweichung auch nicht verwechseln mit dem Feststellen eines Messwerts am Rande des "Normbereichs" bei einem Individuum. Bei einem Individuum akzeptiert man in der Medizin gegebenenfalls Messwerte, die um die doppelte Standardabweichung vom Mittelwert der Population entfernt liegen als "normal". Bei den "Effekten" in unserem Versuch geht es aber um die Mittelwerte. Dies zeigt die Abb. 4.4. Ein tatsächlicher Unterschied der Mittelwerte um die doppelte Standardabweichung rückt die gesamten Häufigkeitsverteilungen der Messwerte in zwei Gruppen auseinander. Messwerte für einzelne Individuen der exponierten Gruppe können dann noch beträchtlich weiter vom Mittelwert der Kontrollgruppe entfernt liegen.

Insbesondere beim dritten der oben aufgeführten Auswerteansätze (Student's t-Test mit $\alpha = 0,001$) ist zu fragen, ob ein solches Ergebnis veröffentlicht werden sollte. Denn es handelt sich letztlich fast um eine "Nullinformation": Die Autoren würden hier letztlich sagen, sie hätten die Sensitivität ihres Modells relativ niedrig gewählt und hätten dabei keinen Effekt festgestellt. Der Leser muss sich fragen "Was wäre denn gewesen, wenn Ihr die Sensitivität verbessert hättet? Ist wirklich überzeugend erläutert, weshalb Mittelwertunterschiede in Höhe der dreifachen Standardabweichung irrelevant sind?". Der Leser wird umso mehr Fragen haben, wenn die Rohdaten bzw. die deskriptive Statistik in der Publikation "sparsam" dargestellt sind. In der Arbeit von Cavallo et al. (2004; s. Abschnitt 3.2.1.1) wird z. B. Student's t-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,1 % berichtet, es werden aber keine deskriptiven Zahlenwerte zu den Daten genannt, Mittelwerte kann man allenfalls aus einer Grafik abgreifen, Streuungsmaße wie z. B. die Standardabweichung finden sich gar nicht. Was ist der nützliche Informationsgewinn einer solchen Studie und Auswertung?

Mein Eindruck von der Praxis der Analyse und Bewertung toxikologischer Daten ist, dass recht häufig keiner der 3 oben skizzierten Argumentationslinien exakt gefolgt wird. Angaben zum Fehler 2. Art (Sensitivität, Power) finden sich praktisch nie. Dies ist in gewisser Weise "menschlich verständlich", denn dann müsste erklärt werden, bei welcher experimentellen Effektausprägung man eine "Relevanzgrenze" oder eine "Grenze der Adversität" sieht. In der Regel weiß man natürlich nicht, welche Relevanz quantitativ die In-vitro-Experimente für den Menschen haben. Es wird aber ethisch nicht dadurch weniger problematisch, dass man die Sensitivitätsangaben weglässt. Nochmals der "Erfinder der statistischen Power": "Whatever I said about interactions applies with equal force to other cases when a test failed to detect a significant effect. In cases of this kind, **to act as if** the hypothesis tested has been established is obviously precipitous. A partial protection against errors is the calculation of the power of the test. Should this calculation show that the probability of detecting an appreciable error in the hypothesis tested was large, say .95 or greater, **then and only then** is the decision in favour of the hypothesis tested justifiable in the same sense as the decision against this hypothesis is justifiable when an appropriate test rejects it at a chosen level of significance." (Neyman, 1957). Die Probleme werden in Bezug auf die Frage des multiplen Testens noch größer (s. u.).



Abb. 4.4 Bedeutung einer expositionsbedingten Erhöhung des Mittelwerts um den Betrag der zweifachen Standardabweichung für die Häufigkeitsverteilung normalverteilter Einzelwerte.

In den beiden Auswerteansätzen mit NP-Konzept oben wurde die Frage einer Wirkungsschwelle nicht untersucht. In der Praxis toxikologischer Studien wird aber nach einem signifikanten Ergebnis für einen "Mehrdosis-Versuch als Ganzes" häufig die Frage des NOAEL angehängt, ohne hierfür eine neue Fragestellung einzuführen (siehe auch Abschnitt 4.2). Dies erscheint an und für sich bereits problematisch und noch problematischer, wenn eine Korrektur für mehrfaches Testen durchgeführt wurde. D. h., man hat zuerst die Spezifität des Tests *je Gruppe* erhöht, um insgesamt für die mehrfachen Tests in dem Versuch die Spezifität (Irrtumswahrscheinlichkeit α) auf einem vorgegebenen Niveau zu halten. Für die einzelne Dosis besteht dabei aber eine verminderte Sensitivität, d. h. die Wahrscheinlichkeit, fälschlich ein nichtsignifikantes Ergebnis bei dieser Dosis zu postulieren, ist erhöht. Man wird also eher ein NOAEL finden als ohne Korrektur für multiples Testen (Tab. 4.1: NOAEL = kleinste Dosis gemäß Student's t-Test, aber NOAEL = mittlere Dosis gemäß Dunnett's Test). Man beachte: Hätte man in einem Versuch wie in dem Beispiel von Tab. 4.1 nur 2 anstatt 3 Dosen eingesetzt, mit diesen beiden Dosen dieselben Ergebnisse wie in Tab 4.1 erhalten und dann mittels Dunnett's Test geprüft, dann hätte man bei der zweiten Dosis Signifikanz gefunden, der NOAEL würde dann niedriger liegen. Anders formuliert: Weil man in dem Beispiel 3 anstatt nur 2 Dosen geprüft hat und obwohl man damit mehr Daten hat, die für eine Dosis-Wirkungsbeziehung sprechen, ergibt sich ein höherer NOAEL. Man kann in der Verwendung von Dunnett's Test zur Ermittlung von NOAELs einen "Kunstfehler" sehen, weil man den NOAEL aus einem Test abgeleitet hat, der eigentlich für eine andere Fragestellung - nämlich "Wird bei mindestens 1 Dosis ein Effekt verursacht?" - vorgesehen war. D. h. das Problem liegt in einer Veränderung der Fragestellung während der Analyse. Man kann versuchen, dies als Konvention zu rechtfertigen. Es ist aber in jedem Falle das Gegenteil von dem, was unter dem Vorsorgeprinzip zu verstehen ist.

4.5 Kritik am statistischen Testen

Wie mehr oder weniger jedes wissenschaftliche Thema wird auch die Frage des statistischen Testens in der diesbezüglichen wissenschaftlichen Fachgemeinde "kontrovers diskutiert". Um dies zu belegen, seien nachstehend einfach einige Publikationen mit ihren Titeln aufgeführt (chronologisch rückwärts). Es geht hier nicht darum, diese Arbeiten im Einzelnen zu bewerten. Allein anhand der Titel der Arbeiten wird deutlich, dass es mehrere Positionen geben muss.

Christensen, R. (2005) Testing Fisher, Neyman, Pearson, and Bayes. The American Statistician, 59(2)121-126

Marks, H.M: Rigorous uncertainty: why RA Fisher is important. International Journal of Epidemiology 2003;32:932–937

Berger, J.O.: Could Fisher, Jeffreys and Neyman Have Agreed on Testing? Statistical Science 2003, Vol. 18, No. 1, 1-32

Browner, W.S. (2003) The reliability of P values. Science, 301, 167-168.

Knapp, T.R. (2002) Some reflections on significance testing. Journal of Modern Applied Statistical Methods 1(2) 240-242.

Farrant, T. (2002) To p or not to p. Royal Statistical Society News, 29(10): 21.

Senn, S. (2002) Letter to the Editor: A comment on replication, p-values and evidence. Statistics in Medicine, 21: 2437-2444.

Stern, J.A.C. and G.D. Smith. (2001) Sifting the Evidence - What's Wrong With Significance Tests? Brit. Med. J. 322: 226-231.

Johnson, D. H. (1999) The Insignificance of Statistical Significance Testing. Journal of Wildlife Mangement, 63(3): 763-772.

Perneger, Th.V.: What's wrong with Bonferroni adjustments. Brit. Med. J. 316 (1998), 1236-1236

Schervish, M.J. (1996) P Values: What They Are and What They Are Not. The American Statistician, 50(3): 203-206

Sedlmeier, P.: Jenseits des Signifikanztest-Rituals: Ergänzungen und Alternativen Methods of Psychological Research Online 1996, Vol.1, No.4

Berger, J. O. and D. A. Berry. (1988) Statistical Analysis and the Illusion of Objectivity. American Scientist, 76(2): 159-165.

Bei etwas näherer Betrachtung einiger der Arbeiten stellt man fest, dass insbesondere das NP-Konzept in der Kritik steht. So schreibt z. B. Christensen (auf S. 12-13) in seinem Kommentar im Rahmen des Papiers von Berger (2003):"*I totally agree with the premise that there is vast confusion about the practical use of testing and I hope that this article puts one more nail into the coffin that Neyman-Pearson testing so richly deserves.*" Sainani (2009): "*Moreover, nothing magical happens at .05 - and there is little difference in the evidence provided by a P value of .051 versus a P value of .049.*"

Insofern ist es folgerichtig, dass auch das oben angesprochene Korrigieren für mehrfaches Testen - häufig mit dem Begriff der Bonferroni-Methode verknüpft - für medizinische Fragestellungen abgelehnt wird. Perneger (1998) schreibt: *"This paper advances the view, widely held by epidemiologists, that Bonferroni adjustments are, at best, unnecessary and, at worst, deleterious to sound statistical inference. ... Adjusting statistical significance for the number of tests that have been performed on study data - the Bonferroni method - creates more problems than it solves."*

In der Epidemiologie sind mir bereits seit vielen Jahren Tendenzen aufgefallen, auf Signifikanztests zu verzichten und eher Vertrauensbereiche (Konfidenzintervalle) anzugeben. In einer Publikation mit Empfehlungen zur Manuskriptgestaltung für die Zeitschrift Epidemiology schrieb der Herausgeber wörtlich (Rothman, 1998; Fettdruck im Original): "When writing for Epidemiology, you can also enhance your prospects if you omit tests of statistical significance". In aller Deutlichkeit: Sie können ihre Aussichten auf eine Veröffentlichung in Epidemiology steigern, wenn sie Signifikanztests weglassen. Der Herausgeber stellt klar, dass Angaben zur statistischen Signifikanz in seiner Zeitschrift gar nicht veröffentlicht werden "In Epidemiology, we do not publish them at all". Zur Erläuterung "Many data analysts appear to remain oblivious to the qualitative nature of significance testing. Although calculations based on mountains of valuable quantitative information may go into it, statistical significance is itself only a dichotomous indicator. As it has only two values, "significant" or "not significant", it cannot convey much useful information. Even worse, those two values often signal just the wrong interpretation. These misleading signals occur when a trivial effect is found to be "significant", as often happens in large studies, or when a strong relation is found "non significant", as often happens in small studies. P-values, being more quantitative, are preferable to statements about statistical significance tests, and we do publish P-values on occasion. We do not publish them as an inequality, such as P < 0.05, but as a number, such as P = 0.13. By giving the actual value, one avoids the problem of dichotomizing the continuous P-value into a two-valued measure. Nevertheless, P-values still confound effect size with study size, the two components of estimation that we believe need to be reported separately. Therefore, we prefer that P-values be omitted altogether, provided that point and interval estimates, or some equivalent, are available, '

Hierzu ist anzumerken, dass in der Praxis der Bewertung epidemiologischer Studien Vertrauensbereiche (VB) von relativen Risiken hauptsächlich als Angaben zur Signifikanz interpretiert werden: Falls der Vertrauensbereich eines relativen Risikos größer als 1 den Wert von 1 nicht einschließt (z. B. RR = 1,8; 95%-VB: 1,2-2,9), dann wird auf eine signifikante Risikoerhöhung geschlossen, schließt er ihn ein (z. B. 95%- VB: 0,9-3,3), dann wird auf "keine Risikoerhöhung" geschlossen (was gerade nicht ohne weiteres möglich ist). Die Interpretation des Vertrauensbereichs als Signifikanzinformation ist insoweit korrekt, als sie sich aus der Konstruktion des Vertrauensbereichs ergibt (s. Abschnitt 4.2). Ich möchte betonen, dass ich mich einer generellen Kritik am statistischen Testen nicht anschließe. Statistische Tests sollten aber unter sorgfältiger Berücksichtigung der Überlegungen, die den ursprünglichen Konzepten von R.A. Fisher und von J. Neyman zugrunde liegen, angewendet und interpretiert werden. Beide Konzepte haben Vor- und Nachteile, die mit Blick auf die sachlogischen Fragestellungen zu beachten sind. Problematisch erscheint gerade bei der Bewertung gesundheitsschädlicher Eigenschaften die Verwendung nicht-signifikanter Ergebnisse als Beleg für das Fehlen einer gesundheitsschädlichen Eigenschaft oder als Begründung dafür, sich so zu verhalten, als bestehe die gesundheitsschädliche Eigenschaft nicht. Das teilweise inkonsequente Gemisch der ursprünglichen Signifikanzkonzepte, das den heutigen Lehrbuchversionen des statistischen Testens zugrunde liegt, verführt offenbar zu Fehlinterpretationen oder ungerechtfertigten Schlussfolgerungen (Gigerenzer, 2004; Gigerenzer et al., 2004).

4.6 Schlussbetrachtungen "Signifikanz"

Keine Mathematik kann aus empirischen Daten eine nützliche Information erschaffen, die in den Daten nicht enthalten ist. Dies sei an einem einfachen Beispiel verdeutlicht. Die Mathematik, auf der statistische Tests von Tumorhäufigkeiten beruhen, kann man als "Kombinatorik" bezeichnen. In der Kombinatorik ist es gebräuchlich, das so genannte Urnenmodell (Wahlurne) zu verwenden und von "Ziehen mit Zurücklegen" und "Ziehen ohne Zurücklegen" zu sprechen. Anstatt des Bilds einer Wahlurne kann man sich auch das Bild einer Lostrommel vorstellen. Dieses Bild der Lotterie dient der Veranschaulichung der mathematischen Problemstellung und sollte deshalb nicht als der Ernsthaftigkeit des Problems von Krebsrisiken unangemessen missverstanden werden. Wir stellen uns also vor: Zwei riesige Lostrommeln, schwarz, undurchsichtige Wände. Angenommen, wir hätten diese Trommeln befüllt und wüssten, in Trommel 1 befinden sich 990 weiße Kugeln und 10 rote Kugeln (1 % rot); in Trommel 2 befinden sich 980 weiße Kugeln und 20 rote Kugeln (2 % rot). Einer Versuchsperson, die den Inhalt der Trommeln nicht kennt, teilen wir mit, in den Trommeln würden sich - zufällig gemischt - lauter gleich große Lottokugeln befinden, es gebe grundsätzlich weiße und rote Kugeln, in den Trommeln könnten sich nur weiße oder nur rote oder Mischungen von beiden befinden. Die Person würde jeweils eine Ziehung von 10 Kugeln vornehmen. Es ist sehr gut vorstellbar, dass jeweils 10 weiße Kugeln gezogen werden. Die Person wäre sich dann ziemlich sicher, dass die Inhalte beider Trommeln gleich sind und dass sie beide ausschließlich weiße Kugeln enthalten. Eine andere Ziehung aus der 1. Trommel: 9 weiße und 1 rote (10 % rot); aus der 2. Trommel 10 weiße Kugeln. Die Person könnte mutmaßen, dass in der 1. Trommel 10 % rote Kugeln und in der 2. Trommel nur weiße Kugeln sind. Wir wissen, dass das nicht stimmt. Es gibt aber keine mathematische Formel, mit der man aus diesen Ziehungen (= Stichproben) die Wahrheit berechnen kann, dass in der 1. Trommel 1 % rote und in der 2. Trommel 2 % rote Kugeln sind.

Was könnten statistische Tests hier beitragen? Wir wollen die beiden philosophischen Ansätze statistischer Tests unterscheiden: *proof by contradiction* und *inductive behaviour*.

Proof by contradiction (Fisher-Konzept): Unsere Testperson könnte für die erste Trommel die Hypothese aufstellen: "In der Trommel befinden sich nur rote Kugeln." Diese Hypothese wäre im Falle 0 rote / 10 Kugeln widerlegt: Es wurden weiße Kugeln gezogen, also kann die Trommel nicht allein rote Kugeln enthalten. Sie könnte eine weitere Hypothese probieren: 50 % weiße und 50 % rote Kugeln, mathematisch: P(rot) = 0,50. Anhand der Binomialverteilung lässt sich die Wahrscheinlichkeit dafür berechnen, dass im Falle von P(rot) = 0.50 die beobachteten Daten oder extremere auftreten. Weniger als Null rote Kugeln geht nicht, daher ergibt sich der p-Wert als die Wahrscheinlichkeit, dass unter 10 Kugeln 0 rote gezogen werden, p = 0,001. Dies ist nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, daher könnte die Person sagen, das Ergebnis 0 / 10 unterscheidet sich "signifikant" von einem Prozentsatz von 50 % roten Kugeln in der Trommel. Für P(rot) = 0,40 ergibt sich p = 0,006, für P(rot) = 0,30 ergibt sich p = 0,028. Die Person könnte daher "Evidenz" dafür sehen, dass sich in der Trommel weniger als 30, 40 oder 50 % rote Kugeln befinden. Rechnet man nach demselben Schema für eine Hypothese von P(rot) = 0,20, dann ist das Ergebnis mit p = 0,11 nicht signifikant. Die Person könnte nach diesen statistischen Tests dann genau das sagen, was man - zumindest nach einigem Nachdenken - auch ohne statistischen Test für richtig hält: "Es ist statistisch wohlbegründet anzunehmen, dass sich in der Kugel deutlich weniger als 50 % rote Kugeln befinden; wie groß der Anteil tatsächlich ist, ob er 0 oder 10 oder 20 % beträgt, weiß ich nicht." Mithilfe von Fisher's Exact Test könnte das Ergebnis 0 / 10 versus 1 / 10 verglichen werden. Die Fragestellung ist "zweiseitig", denn es könnten sowohl in Trommel 1 als auch in Trommel 2 mehr rote Kugeln sein. Ergebnis: p = 1,0, nicht signifikant - klar. Schlussfolgerung: "Ich weiß es nicht, ob sich in der ersten oder in der zweiten Trommel ein größerer Anteil roter Kugeln befindet oder ob sich vielleicht in beiden Trommeln gleich große Anteile roter Kugeln befinden. Was ich sagen kann: Es ist nicht anzunehmen, dass sich in einer der Trommeln mehr als 40 oder 50 % rote Kugeln befinden."

Inductive behaviour (NP-Konzept): Grundsätzlich beinhaltet dieses Konzept, dass hier das nicht-signifikante Ergebnis, z. B. von Fisher's Exact Test, als Handlungsanleitung zu verstehen wäre: Handle so, als wäre der Anteil roter Kugeln in beiden Trommeln gleich. Diese schlichte Interpretation wäre hier aber falsch. Neyman (1957, s.o.): "Should this calculation show that the probability of detecting an appreciable error in the hypothesis tested was large, say .95 or greater, then and only then is the decision in favour of the hypothesis tested justifiable in the same sense as the decision against this hypothesis is justifiable when an appropriate test rejects it at a chosen level of significance." Nur wenn eine klare Alternativhypothese formuliert wurde und quantifizierte Aussagen über den Fehler 2. Art und die Power gemacht wurden und wenn die Power hinreichend groß ist (Neyman: 95 %), dann - und nur dann - ist es gerechtfertigt, die Nullhypothese zu "akzeptieren". Im vorliegenden Beispiel wäre eine korrekte Interpretation also: "Das Design des Versuchs, je 10 Kugeln zu ziehen und dann auf mögliche Unterschiede in den Anteilen roter Kugeln zu schließen, ist nicht geeignet, sinnvolle Aussagen zu machen. Der Stichprobenumfang (d. h. die Anzahl an Kugeln je Ziehung) muss hier wesentlich erhöht werden." Letztlich ist das Ergebnis auch dieses Konzeptes hier dasselbe wie mit anderen Konzepten: "Ich weiß es nicht, ob sich in der ersten oder in der zweiten Trommel ein größerer Anteil roter Kugeln befinden oder ob sich vielleicht in beiden Trommeln gleich große Anteile roter Kugeln befinden".

Neyman (1957) äußerte folgende Überlegungen zur Formulierung der Alternativhypothesen "The experiment discussed is meant to detect the beneficial effect of the treatment if such exists. If it does exist then $p > \frac{1}{2}$. Naturally, should the value of p be greater than one-half but only slightly so, say p = .500001, the effect of treatment, though beneficial, is so small that it is not worth thinking about. It is a practical and subjective question as to what value of p, greater than one-half, represents an important advantage of the given treatment. Suppose an experimenter considers that the value of the probability p = .6 already represents an important advantage. If so, then it is important that the design of the experiment ensure a reasonable chance of detecting the beneficial effect of the treatment if its intensity is as large as p = .6 or greater." Bemerkenswert ist hier die Formulierung "not worth thinking about". Das erinnert auffallend an die Formulierung der MAK-Kommission "kein nennenswerter Beitrag zum Risiko". Neyman (1957) hat ausgeführt, dass in subjektiver Weise zu definieren ist, welchen Unterschied man als "nennenswert" oder "bemerkenswert" oder einfach "wichtig" erachtet: "represents an important advantage", siehe auch oben "appreciable error". Für diesen Unterschied sind dann eine - oder mehrere -Alternativhypothesen zu formulieren: "In order to see this, let us examine the power of the test corresponding to α = .01, with n = 15 and to the **alternative hypotheses p** = .6 and p = .7. We find $\beta(.6) = .090$ and $\beta(.7) = .297^{\circ}$. Im Beispiel von Neyman (1957) ging es um den förderlichen (günstigen) Effekt einer Behandlung. Bereits dies kann eine ethisch ganz andere Gewichtung von "not worth thinking about" bedeuten als bei der Frage eines schädlichen Effekts. Neyman (1957) diskutierte dabei eine absolute Häufigkeit von 10 und von 20 % als "important" (p = .5 bedeutet hier günstige Ereignisse bei 50 % der behandelten Individuen, p = .6 bedeutet günstige Ereignisse bei 60 %, also eine absolute Verbesserung um 10 %).

Welches könnte im Falle der Lostrommeln ein "important" Unterschied sein? Das lässt sich schwerlich begründen. Aber wir können folgendes Szenario betrachten: Wir haben ja die Lostrommeln mit je 1.000 Kugeln und mit 1 % bzw. 2 % roten Kugeln befüllt. Wir könnten der Versuchsperson, die den Inhalt der Trommeln schätzen soll, behilflich sein und ihr sagen, in der ersten Trommel befänden sich 1 % rote Kugeln, sie möge ein Versuchsdesign entwerfen, das ausreichende Power hat, einen Unterschied von 1 % zu entdecken. Dann ergäbe sich folgende Überlegung: "Ich nehme an, in der ersten Trommel befinden sich 1 % rote Kugeln, ich fomuliere die Nullhypothese: Es besteht kein Unterscheid zwischen den Trommeln, d. h. in der zweiten Trommel befinden sich ebenfalls 1 % rote Kugeln. Ich prüfe diese Hypothese auf dem Signifikanzniveau α = 0.05. Die Alternativhypothese lautet: In der 2. Trommel befinden sich 2 % rote Kugeln, Differenz: 1 %. Beim Risiko für den Fehler 2. Art folge ich den Qualitätsansprüchen wie bei Gigerenzer et al. (2004) und setze β = 0.001. d. h. Power = 99.9 %. Ich benutze die Software Epi Info 6 (Dean et al., 1995) und erhalte als notwendigen Stichprobenumfang die Anzahl von 7.700 Ziehungen je Trommel." Wir sehen an diesem Beispiel: Um eine zusätzliche Häufigkeit von 1 % gegenüber einer bereits bestehenden Häufigkeit von 1 % mit sehr großer Sicherheit entdecken zu können, ist ein Stichprobenumfang von 7.700 je Gruppe erforderlich. Reduziert man die "Qualitätsansprüche" auf das von Neyman (1957) vorgeschlagene Niveau von 95 %, dann wäre eine Stichprobengröße von 4.000 nötig, bei einem in Lehrbüchern oft erwähnten Power-Niveau von 80 % wären immerhin noch 2.500 Ziehungen je Trommel erforderlich (bei zweiseitiger Fragestellung; bei einseitiger Fragestellung wären es rund 2.000 Ziehungen).

Dieses Beispiel eines Vergleichs von prozentualen Häufigkeiten von 1 und 2 % ist hier natürlich nicht mit Blick auf Lotterieverfahren gewählt, sondern mit Blick auf die "Nachweischancen" von Krebsrisiken in diesem Häufigkeitsbereich. Die Berechnungen zeigen: Würde man nur die Mindestansprüche an die Power für inductive behaviour, nämlich eine Power von 80 %, erfüllen wollen, dann müssten in einem Karzinogenitätstest mindestens 2.000 Tiere je Gruppe eingesetzt werden, um ein Exzess-Risiko in Höhe von 1 % zu entdecken, falls das wahre Hintergrundrisiko 1 % betragen würde. Zwanzig Prozent aller derartig durchgeführten Versuche würden ein nicht-signifikantes Ergebnis erbringen in den Fällen, in denen in Wahrheit ein Exzess-Risiko von 1 % besteht. Es ist klar, dass mit Gruppengrößen von 50 oder 100 Tieren Exzess-Risiken von 1 % oder kleiner nicht entdeckt werden können. Wenn man bei einem nicht-signifikanten Ergebnis eines Karzinogenitätsversuchs mit 50 Tieren je Gruppe also sagt "Ich akzeptiere die Nullhypothese, ich handle so, als ob die Nullhypothese (kein erhöhtes Risiko) zuträfe", dann bedeutet dies zwangsläufig, dass man ein Exzess-Risiko in Höhe von zirka 10 % als "not appreciable" oder "not worth thinking about" bewertet, d. h. ebenfalls "akzeptiert".

Es gibt also zwei erkenntnistheoretisch vertretbare Möglichkeiten, nicht-signifikante Ergebnisse aus einem Karzinogenitätstest mit 50 Tieren je Gruppe zu interpretieren. Die erste Möglichkeit ist: "Das Ergebnis ist nicht signifikant, d. h. ich kann hier keine klare Aussage machen. Ich weiß es nicht, ob die Tumorrisiken in beiden Gruppen gleich sind oder ob die Substanz ein zusätzliches Tumorrisiko von z. B. 5 % verursacht hat, das ich mit meinem Versuch nicht entdeckt habe." Die zweite Möglichkeit ist: "Das Ergebnis ist nicht-signifikant. Wenn wir davon ausgehen, dass ein zusätzliches Tumorrisiko von 10 % bei diesen Tieren für den Menschen unbedeutend ist, dann akzeptiere ich die Nullhypothese und handle so, als ob kein Exzess-Risiko bestünde. Falls wir davon ausgehen, dass ein zusätzliches Tumorrisiko von 10 % bei diesen Tieren für die Bewertung des Risikos des Menschen bedeutend ist, dann muss ich diesen Versuch als ungeeignet dafür ansehen, eine Entscheidung zu treffen." Kurz: Entweder nimmt man ein Exzess-Risiko von 10 % als unbedeutend hin oder man bekennt sich zu Nicht-Wissen mit allen Konsequenzen.

Solche Überlegungen und Darlegungen der Aussagekraft von signifikanten und nicht-signifikanten Ergebnissen findet man in der Regel in toxikologischen Publikationen nicht. Im Grunde sind entsprechende Überlegungen auf alle toxikologischen Ergebnisse anzuwenden (nicht nur Karzinogenitätsdaten). Besonders kompliziert wird es, wenn nicht-karzinogene Effekte als Vorläufer oder Verursacher von karzinogenen Effekten angesehen werden (Overload, Entzündung) und wenn von NOAELs für die nicht-karzinogenen Effekte auf unbedeutende Krebsrisiken (*not significant, not worth thinking about, nicht nennenswert*) geschlossen wird. Dabei spielen neben den statistisch-mathematischen Sachverhalten Bewertungen der biologischen Zusammenhänge eine Rolle. Dies wird im Kapitel "Diskussion" (Abschnitte 5.2 bis 5.7) erörtert.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisse des vorgenommenen Vergleichs "in vitro versus in vivo"

In den vergangenen Jahren erschienen mehrere Veröffentlichungen, in denen die Ergebnisse der Prüfung organischer Chemikalien in Kurzzeit-Gentoxizitätstests - in vitro bzw. in vivo - mit Ergebnissen von Langzeit-Karzinognitätstests verglichen wurden. Als Referenzinformation dienten dabei z. B. bei Kirkland et al. (2005, 2006, 2007a, 2007b), Kirkland und Speit (2008) und Thybaud et al. (2007a, 2007b) unter anderem Daten der Carcinogenic Potency Database. Die Applikationsarten in dieser Datenbank sind vor allem Inhalation und orale Applikation, es sind aber auch Daten nach intraperitonealer Injektion dort enthalten. Auch die Studie von Sasaki et al. (2000) bezieht sich als Referenzinformation auf "Karzinogenität", wobei sich diese nach unterschiedlichen Applikationsarten gezeigt hat (einschließlich intraperitoneale und subkutane Injektion). Im Ergebnis stellten Kirkland et al. (2007a) einen hohen Anteil "falsch positiver" Testergebnisse fest: "When the standard battery of two or three in vitro genotoxicity tests was performed, at least 80% of the 177 noncarcinogenic compounds tested gave a false positive result in at least one test." Die Aussagekraft der Tests erschien den Autoren so schlecht, dass Kirkland et al. (2007b) einen Wunsch nach radikal neuen In-vitro-Verfahren zum Ausdruck brachten und damit eine Einschätzung der bisherigen fast als wertlos nahelegen (Fettdruck hinzugefügt): "Finally, the future of in vitro testing may lie with radically new assays rather than supplementary investigations to interpret the relevance of results from existing assays. If new assays with improved prediction of human hazard were available, there would be fewer in vitro positive results to investigate."

Ziel des Projekts des vorliegenden Berichts war es, einen ähnlichen Vergleich wie er in den genannten Arbeiten für organische Verbindungen durchgeführt wurde, für anorganische Stoffe vorzunehmen, insbesondere wenn es sich um mehr oder weniger schlecht lösliche Partikel handelte. Der Begriff Partikel schließt dabei unregelmäßige und langgestreckte, also faserförmige Partikel (Fasern) ein. *Ein* Ergebnis lässt sich ganz klar erkennen: Eine zu hohe Quote an falsch positiven Ergebnissen ist - im Gegensatz zu den genannten Schlussfolgerungen zu organischen Stoffen - nicht das Hauptproblem der In-vitro-Gentoxizitätstests mit anorganischen Partikeln. Eine solche Interpretation hängt aber auch davon ab, wie man die "Referenzinformation" definiert. Es ist hier bereits in der Einleitung und im Methodenteil ausgeführt, dass die inhalative Exposition im Blickpunkt steht und dass es in der Literatur unterschiedliche Bewertungen der Karzinogenitätsversuche mit inhalativer und sonstiger Exposition gibt. Darauf wird auch weiter unten nochmals einzugehen sein.

Zunächst seien aber die In-vitro-Ergebnisse in der Zusammenschau betrachtet und Karzinogenitätsdaten gegenübergestellt, wobei - wie auch bei den oben genannten Arbeiten zu organischen Stoffen - alle Applikationsarten berücksichtigt sind. In den Abschnitten 3.2.1.2 und 3.2.3.3 habe ich bereits für Faserstäube und für Nanomaterialien dargelegt, dass sich anhand der verfügbaren Daten keine einfache Angaben von Sensitivität und Spezifität in der üblichen Weise und in aussagekräftiger Weise machen lassen. Ich habe deshalb nach Alternativen gesucht. In Abschnitt 3.1.4 sind aufgrund der vorhandenen Expositions-Wirkungsinformationen die Stoffe bzw. Stoffklassen in 3 Gruppen der krebserzeugenden Wirkungsstärke eingeteilt. Für den aktuellen Zweck erscheint eine größere "Auflösung" der Angaben zur Wirkungsstärke in Anbetracht der Streuungen und Unsicherheiten nicht sinnvoll. Innerhalb der Potenzklassen enthält die Tab. 3.25 deshalb auch keine Aussage über die Reihenfolge der Wirkungsstärken, sondern diese Reihenfolge in Tab. 3.25 ist alphabetisch.

Tab. 5.1	Zusammenfassung der In-vitro-Versuche zur Gentoxizität (Abkü	irzun-
	gen siehe letzte Seite der Tabelle).	

Substanz bzw Substanzklasse	in vitro Gen- tox. (% positiv) ^a	Quelle ^b (in vitro)	in vivo Karzi- nogenität; Potenzklasse ^c	Quelle ^d (in vivo)
Faserförmige Stä	ube			
Krokydolith (Asbest)	17 / 18 = 91 %	HB84, RIE94, Jan94, Cav04, Car06, HF96, Pel95, MK97	Epidemiologie, Inh.+i.tr.+I.p. Ratte; PK 3	McC94, Pot87, PR76- 97; Rev.: HEI91, Sil09
Amosit (Asbest)	3 / 5 = 60 %	Kov04, MK97, Cav04	Epidemiologie, Inh.+I.p. Ratte; PK 3	Dav86, Dav96, Cul00, PR76- 97; Rev.: HEI91, Sil09
Chrysotil (Asbest)	15 / 17 = 88 %	HB84, RIE94, MK97, Pel95, Wan99, HF96, Gar08	Epidemiologie, Inh.+I.p. Ratte; PK 3	DaJ88, Mas95a, PR76-97; Rev.: HEl91, Sil09
Erionit	3 / 3 = 100 %	Jan94, RIE94	Epidemiologie, Inh. +i.tr.+I.p. Ratte; PK 3	Wag85, Pot91a, PR76-97; Rev.: IARC87
Wollastonit	5 / 5 = 100 %	Kov04, Wan99	in empfind- lichen Model- len (i.p.) keine Kanz. nach- weisbar; PK n.a.	PR76-97
SiC-Whiskers	4 / 5 = 80 %	RIE94, Wan99	Inh.+i.tr.+I.p. Ratte; PK 3	Davi96, Cul00, Pot91a, PR76- 97
Kaliumtitanat- fasern	3 / 5 = 60 %	MK97, Wan99	Inh.+I.p. Ratte; PK 3	Lee8184, PR76-97

Substanz bzw Substanzklasse	in vitro Gen- tox. (% positiv) ^a	Quelle ^b (in vitro)	in vivo Kar- zinogenität; Potenz- klasse ^c	Quelle ^d (in vivo)
Faserförmige Stä	ube, Fortsetzunç)		
Glasfasern, dünn	12 / 14 = 86 %	HB84, RIE94, Pel95, Zho97, Wan99	Inh. +i.tr.+I.p. Ratte; PK 3	Dav96, Cul00, Pot 87, Pot91a, PR76-97
Keramikfasern, glasig	6 / 12 = 50 %	Cav04, Wan99, Jan94, HF96, MK97	Inh.+I.p. Rat- te; PK 2	Mas95a, Mas95b, PR76-97
Steinwolle	15 / 21 = 71 %	Cav04, Car06, HF96, Kov04, Pel95, Wan99	I.p. Ratte; PK 2	PR76-97
Glaswolle	7 / 17 = 41 %	HB84, RIE94, Car06, Kov04, Wan99, Jan94, Cav04, MK97	I.p. Ratte; PK 2	PR76-97
Metalle/Metallver	bindungen			
Cd- Verbindungen	52 / 116 = 51 %	IARC93	Epidemio- logie, Inh.+i.tr. Rat- te; PK 3	Gla90, Tak83, Pot87; Rev.: IARC93, Ro06
Co-Metalle /Carbide	26 / 36 = 72 %	IARC06	n.g.	./.
Co- Verbindungen	65 / 118 = 55 %	IARC06	Inh. Ratte (sulfat); PK n.a.	NTP98
V_2O_5	14 / 24 = 58 %	IARC06	Inh. Maus; PK 3	NTP02
GaAs	1 / 3 = 33 %	IARC06	Epidemio- logie, Inh. Ratte; PK 3	NTP00; Rev.: IARC06

Tab. 5.1Zusammenfassung der In-vitro-Versuche zur Gentoxizität, Fortsetzung.

Substanz bzw Substanzklasse	in vitro Gen- tox. (% positiv) ^ª	Quelle ^b (in vitro)	in vivo Kar- zinogenität; Potenz- klasse ^c	Quelle ^d (in vivo)	
Metalle/Metallverl	bindungen, Forts	setzung			
Ni, metallisch (elementar)	1 / 2 = 50 %	Gre01	I.tr.+i.p. Rat- te; PK 3	Pot87, Pot91b; Rev.: Gre01, IARC90	
Ni-sulfat	8 / 9 = 89 %	Gre01	Epidemio- logie, Inh.+I.p. Rat- te; PK 2	NTP96c, Pot91b; Rev.: Gre01, IARC90	
Ni, oxidisch	4 / 5 = 80 %	Gre01	Epidemio- logie, Inh. +i.tr.+I.p. Rat- te; PK 2	NTP96a, Pot87, PR94, Pot91b; Rev.: Gre01, IARC90	
Ni, sulfidisch	11 / 14 = 79 %	Greim (2001)	Epidemio- logie, Inh. +i.tr.+I.p. Rat- te; PK 3	NTP96b, Pot87, Pot91b; Rev.: Gre01, IARC90	
Chrom(VI)- Verbindungen	86 positive	IARC (1990)	Epidemio- logie, Inh. Ratte; PK 3	Gla86; Rev.: IARC90, Ro06	
Nanomaterialien und diverse Partikel (UF = ultrafein; oder fein)					
Industrieruß UF	9 / 11 = 82 %	Zho97, DPC01, Jac07, Gar08, Mro08, Sch09, Tot09, Yan09	Inh.+i.tr. Rat- te; PK 2	Nik95, Hei94, Hei95, PR94, PR0508, Das96, Kol08	
Industrieruß fein	1 / 3 = 33 %	Pom06, Mro08	i.tr. Ratte; PK 1	PR0508, Das96	

ıng.

Substanz bzw Substanzklasse	in vitro Gen- tox. (% positiv) ^ª	Quelle ^b (in vitro)	in vivo Kar- zinogenität; Potenz- klasse ^c	Quelle ^d (in vivo)
Nanomaterialien	und diverse Part	ikel, Fortsetzur	ng	
C ₆₀ UF	1 / 1 = 100 %	Tot09	in empfind- lichem Modell (Maus i.p.) keine Kanz. nachweisbar; PK n.a.	Tak08
Kohlenstoff UF	0/3=0%	Kar08	n.g.	./.
Dieselrußpartikel	1 / 2 = 50 %	DPC01, Gar08	Epidemio- logie, Inh.+i.tr. Rat- te; PK 2	Rev.: UBA99, EPA02, MSHA06, Gre08
Ruß v. brennend. Kerze/Holz/ Rei- fen	3?/3=?	Gar08	n.g.	./.
Ruß von Gas- herd-Flamme	2 / 2 = 100 %	Gar08	n.g.	./.
Carbon Nanotu- bes	5 / 7 = 71 %	Gar08, Kar08, Yan09	l.p. transgene Maus; PK n.a.	Tak08
SiO ₂ kristallin UF	4 / 5 = 80 %	Wan07b, Y- an09	n.g.	./.
Quarz (fein)	3 / 6 = 50 %	Zho97, Jac07, Wan07c	Epidemio- logie, Inh.+i.tr.+i.p. Ratte; PK 3	Pot84, Muh91, PR0508, Kol08; Rev.: IARC97, Ro03
SiO₂ amorph UF	1 / 6 = 17 %	Zho97, Lim07, Bar08	Instillation Ratte; PK 1	PR0508, Kol08
SiO ₂ amorph fein	0 / 1 = 0 %	Bar08	n.g.	./.

Tab. 5.1Zusammenfassung der In-vitro-Versuche zur Gentoxizität, Fortsetzung.

Substanz bzw Substanzklasse	in vitro Gen- tox. (% positiv) ^ª	Quelle ^b (in vitro)	in vivo Kar- zinogenität; Potenz- klasse ^c	Quelle ^d (in vivo)
Nanomaterialien	und diverse Part	ikel, Fortsetzur	ng	
TiO₂ UF	11 / 20 = 55 %	Lin97, Nak97, Rah02, Gur05, Lim07, Wan07a, War07, Kar08, Kar09, Sch09	Inh.+i.tr. Rat- te; PK 2	Hei95, PR0508
TiO₂ fein	15 / 22 = 68 %	Lin97, Nak97, Lu98, Rah02, Gur05, Stru07, Tür07, Gar08, Kar09	Inh.+i.tr. Rat- te; PK 1	Lee8586, PR94, PR0508
TiO ₂ /SiO ₂ UF	0 / 2 = 0 %	Lim07	n.g.	./.
Fe ₂ O ₃ UF	0 / 6 = 0 %	Lim07, Kar08, Kar09	n.g.	./.
Fe ₂ O ₃ fein	1 / 2 = 50 %	Kar09	i.tr. (Hämatit) Ratte; PK 1	PR94
Fe ₃ O ₄ UF	2 / 5 = 40 %	Kar08, Kar09	n.g.	./.
Fe ₃ O ₄ , fein	1 / 2 = 50 %	Kar09	i.tr. (Magnetit) Ratte; PK 1	PR94, Pot87
Fe ₂ O ₃ /SiO ₂ UF	5 / 8 = 63 %	Lim07	n.g.	./.
Co ₃ O ₄ UF	1 / 1 = 100 %	Lim07	n.g.	./.
Co ₃ O ₄ /SiO ₂ UF	0 / 2 = 0 %	Lim07	n.g.	./.
Mn₃O₄ UF	1 / 1 = 100 %	Lim07	n.g.	./.
Mn ₃ O ₄ /SiO ₂ UF	2 / 2 = 100 %	Lim07	n.g.	./.
CuO UF	5 / 5 = 100 %	Kar08, Kar09	n.g.	./.
CuO fein	1 / 2 = 50 %	Kar09	n.g.	./.
ZnO UF	4 / 6 = 67 %	Kar08, Sch09, Yan09	n.g.	./.

Tab. 5.1Zusammenfassung der In-vitro-Versuche zur Gentoxizität, Fortsetzung.

Substanz bzw Substanzklasse	in vitro Gen- tox. (% positiv) ^ª	Quelle ^b (in vitro)	in vivo Kar- zinogenität; Potenz- klasse ^c	Quelle ^d (in vivo)
Nanomaterialien	und diverse Part	ikel, Fortsetzur	ng	
CoCr UF	4 / 4 = 100 %	Pap07	n.g.	./.
CoCr fein	4 / 4 = 100 %	Pap07	n.g.	./.
CuZnFe ₂ O ₄ UF	2/3=67 %	Kar08	n.g.	./.
CeO ₂ UF	3 / 5 = 60 %	Sch09	n.g.	./.
AIOOH UF	0 / 2 = 0 %	Sch09	i.tr. (Al-oxid) Ratte; PK 2	PR0508
Ti-Zr-Mischoxid UF	1 / 3 = 33 %	Sch09	n.g.	./.
Al-Ti-Zr- Mischoxid UF	0 / 3 = 0 %	Sch09	n.g.	./.
ZrO ₂ UF	0/3=0%	Sch09	n.g.	./.
BaSO₄ UF	0 / 1 = 0 %	Sch09	n.g.	./.
SrCO ₃ UF	0 / 2 = 0 %	Sch09	n.g.	./.
Kaolin fein	1 / 1 = 100 %	Tot09	i.tr. Ratte; PK 1	PR0508
Städtischer Schwebstaub (fein)	5 / 6 = 83 %	DPC01, Pom06, Mro08	Epidemio- logie; PK n.a.	Pop02
Latex UF	1 / 2 = 50 %	Pap07	n.g.	./.
Latex fein	1 / 2 = 50 %	Pap07	n.g.	./.

 Tab. 5.1
 Zusammenfassung der In-vitro-Versuche zur Gentoxizität, Fortsetzung.

^a Häufigkeit positiver Ergebnisse pro Gesamtzahl (ausgewerteter) Versuche mit der Substanz (vgl. Tab. 3.89).

^b Abkürzungen siehe Tab. 3.90

^c Hier sind nur die Expositionsarten - einschließlich "Epidemiologie" (= inhalative Exposition des Menschen) - angegeben, für die karzinogene Effekte als nachgewiesen gelten bzw. es ist angegeben, wenn keine "positiven" Befunde oder keine Daten (n.g. = nicht geprüft) vorliegen. Potenz-klassen (PK) gemäß Tab. 3.25 (n.a. = nicht anzugeben).

, -	. .					
Abkürzungen:						
Cullen et al. (2000)	DaJ88	Davis und Jones (1988)				
Dasenbrock et al. (1996)	Dav86	Davis et al. (1986)				
Davis et al. (1996)	EPA02	USEPA (2002)				
Glaser et al. (1990)	Gla86	Glaser et al. (1986)				
Greim (2001)	Gre08	Greim (2008)				
HEI-AR (1991)	Hei94	Heinrich et al. (1994)				
	gen: Cullen et al. (2000) Dasenbrock et al. (1996) Davis et al. (1996) Glaser et al. (1990) Greim (2001) HEI-AR (1991)	Gen: DaJ88 Cullen et al. (2000) DaJ88 Dasenbrock et al. (1996) Dav86 Davis et al. (1996) EPA02 Glaser et al. (1990) Gla86 Greim (2001) Gre08 HEI-AR (1991) Hei94				

Hei95	Heinrich et al. (1995)	IARC87	IARC (1987)
IARC90	IARC (1990)	IARC93	IARC (1993)
IARC06	IARC (2006)	Kol08	Kolling et al. (2008)
Lee8184	Lee et al. (1981), Lee und Reir	nhardt (1984)	2 . ,
Lee8586	Lee et al. (1985, 1986)	Mas95a	Mast et al. (1995a)
Mas95b	Mast et al. (1995b)	McC94	McConnell et al. (1994)
MSHA06	MSHA (2006)	Muh91	Muhle et al. (1991)
Nik95	Nikula et al. (1995)	NTP00	NTP (2000)
NTP02	NTP (2002)	NTP96a	NTP (1996a)
NTP96b	NTP (1996b)	NTP96c	NTP (1996c)
NTP98	NTP (1998)	Pop02	Pope et al. (2002)
Pot84	Pott et al. (1984)	Pot87	Pott et al. (1987)
Pot91a	Pott et al. (1991a)	Pot91b	Pott et al. (1991b)
PR0508	Pott und Roller (2005), Roller ((2008)	
PR76-97	Pott et al. (1976), Pott et al. (1984), Pott et al.	(1987), Pott et al. (1989), Pott et al
	(1990), Pott et al. (1991a), Rol	ler et al. (1996, 19	997)
PR94	Pott et al. (1994), Pott und Rol	ler (1994)	
Ro03	Roller (2003)	Ro06	Roller et al. (2006)
Sil09	Silverstein et al. (2009)	Tak08	Takagi et al. (2008)
Tak83	Takenaka et al. (1983)	UBA99	UBA (1999)
Wag85	Wagner et al. (1985)		
Rev.:	Review	./.	keine Daten

% Positive In-vitro-Ergebnisse



Abb. 5.1 Korrelationsdiagramm In-vitro-Versuche zur Gentoxizität versus karzinogene Potenz in vivo.

Substanz bzwSubstanzklasse	in vitro Gentox. (% positiv)ª
Faserförmige Stäube	90 / 122 = 74 %
Karzinogene Metalle/Metallverbindungen (einschließlich lösliche) ohne Chrom(VI)-Verbindungen	194 / 327 = 59 %
Chrom(VI)-Verbindungen	86 positive
Nanomaterialien (Industrieruß UF, C_{60} UF, Carbon Nano- tubes, SiO ₂ kristallin UF, SiO ₂ amorph UF, TiO ₂ UF, Fe ₂ O ₃ UF, Fe ₃ O ₄ UF, ZnO UF, CoCr UF, CeO ₂ UF u.a.)	62 / 119 = 52 %
Diverse Partikel (Industrieruß fein, Dieselrußpartikel, diverse Ruße, Quarz (fein), SiO ₂ amorph fein, TiO ₂ fein u.a.)	39 / 58 = 67 %
Insgesamt (ohne Chrom-VI-Verbindungen)	385 / 626 = 62 %
Besondere Auswertung für Nanomaterialien und sonstige Stäube (Tab. 3.92)	
Mikrokern-Test, Hochschulen/Behörden/öffentliche For- schungseinrichtungen	16 / 18 = 89 %
kein Mikrokern-Test, Beteiligung privater Stoffproduzenten	10 / 35 = 29 %

Tab. 5.2 Kurz-Zusammenfassung der In-vitro-Versuche zur Gentoxizität

^a Häufigkeit positiver Ergebnisse pro Gesamtzahl (ausgewerteter) Versuche mit der Substanz (vgl. Tab. 3.89).

Es hat sich gezeigt, dass es anhand der Dosisinformationen der In-vitro-Versuche nicht möglich ist, daraus quantitative Angaben über die Wirkungsstärken der Partikel in vitro über die einzelnen Studien hinweg zu machen. Dazu sind die Dosismaße, Dosisangaben und Versuchsdesigns zu unterschiedlich. In Tab. 3.89 habe ich die Ergebnisse der In-vitro-Versuche mit Nanomaterialien und sonstigen Partikeln so zusammengefasst, dass ich die Anzahl der Versuche mit mindestens einer positiv getesteten Dosis in Relation zur Gesamtzahl der mit der betreffenden Partikelart insgesamt durchgeführten Versuche aufgeführt habe. Falls eine Partikelart besonders stark wirksam ist, dann wäre zu erwarten, dass sie in einem hohen Anteil der Versuche einen Effekt zeigt, falls sie besonders schwach wirksam ist, wäre zu erwarten, dass sie selten oder nie einen Effekt zeigt. Der Anteil positiver Tests mit einer Partikelart mag daher als indirektes Maß der Wirkungsstärke der Partikelart angesehen werden.

In Tab. 5.1 sind alle Informationen der Auswertungen dieses Projekts zusammengefasst, wobei insofern nach einzelnen Stoff differenziert ist, als man "Krokydolith",

"Glasfasern, dünn", "Industrieruß ultrafein" oder "Dieselruß" als jeweils einen "Stoff" betrachten mag. in Tab. 5.2 sind die Ergebnisse der In-vitro-Versuche noch stärker komprimiert, indem dort nur nach Substanzklassen wie "faserförmige Stäube" und "Nanomaterialien" aufgeschlüsselt ist. In Tab. 5.1 sind die Erkenntnisse aus Epidemiologie und Tierversuchen als so genannte In-vivo-Daten den Häufigkeiten positiver und negativer In-vitro-Gentoxizitätstests gegenübergestellt. Wie oben beschrieben mag dabei bei den In-vivo-Daten die Potenzklasse nach Tab. 3.25 und bei den Invitro-Daten die prozentuale Häufigkeit positiver Ergebnisse als so etwas wie ein Potenzmaß dienen. In Abb. 5.1 sind diese Potenzmaße in Form eines Korrelationsdiagramms miteinander verglichen. Es scheint sich zu zeigen, dass über alle Stoffe bzw. Studien hinweg sich praktisch keine Korrelation zwischen den Wirkungsstärken in vivo und in vitro findet. Diese scheinbar schlechte Korrelation sollte aber nicht darüber hinweg täuschen, dass sich praktisch für alle der betrachteten Stoffe positive Invitro-Befunde finden und gleichzeitig auch mindestens in einem Studientyp ein positiver In-vivo-Karzinogenitätsbefund findet, sofern der Stoff überhaupt in vivo daraufhin untersucht wurde. In vivo sind allerdings konsistent über die Studientypen hinweg relativ klare Unterschiede in den Wirkungsstärken festzustellen, die sich in vitro über die Studien hinweg so nicht wiederfinden lassen.

Tab. 3.24 zeigt, dass Asbest und andere biobeständige Faserstäube, sowie Quarz und bestimmte Metallverbindungen eine relativ hohe karzinogene Potenz haben, so dass sich für einige dieser Stoffe auch epidemiologisch erhöhte Lungenkrebsrisiken haben entdecken lassen. Dieselruß hat in vivo eine schwächere karzinogene Potenz gezeigt, die epidemiologischen Befunde werden dabei in der Literatur nicht einheitlich im Sinne eines Nachweises eines erhöhten Krebsrisikos interpretiert. Die Tierversuche haben im Vergleich zu den genannten Stoffgruppen für nicht-ultrafeine GBS wie "feiner" Industrieruß und "feines" Titandioxid geringere krebserzeugende Potenz gezeigt, für diese Stoffe gibt es auch nur sehr unklare epidemiologische Befunde ohne eindeutigen Hinweis auf ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko beim Menschen. Tab. 5.1 und Abb. 5.1 veranschaulichen, dass sich diese Potenzunterschiede in der Summe der In-vitro-Tests nicht haben reproduzieren lassen.

Im übrigen zeigt Abb. 5.1 eine "schlechte Prädiktivität" der In-vitro-Tests unabhängig davon, wie man die Aussagekraft der Inhalations- und Intratrachealstudien mit GBS bei Ratten beurteilt. Diese GBS sind nach Tab. 3.25 der Potenzklasse 1 zugeordnet, dem entsprechen in Abb. 5.1 die Punkte auf der linken Seite über der x-Skaleneinheit 1. Einige Autoren erachten diese Versuche an Ratten mit GBS als irreführend, weil es sich nach ihrer Meinung um einen irrelevanten Überladungseffekt handelt. Schließt man sich dieser Position an, dann sind die In-vitro-Ergebnisse über dem x-Skalenwert 1 "falsch positiv", weil sie einen Effekt anzeigen, der beim Menschen "eigentlich" als irrelevant zu bewerten ist. Erachtet man die Zuordnung der Stoffe zu den In-vivo-Potenzklassen dagegen als gerechtfertigt, dann zeigt Abb. 5.1 eben eine schlechte Korrelation, weil sich in den In-vitro-Versuchen nicht konsistent eine höhere Wahrscheinlichkeit positiver Testergebnisse mit den Stoffen der höheren Potenzklassen fand. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass der Prozentsatz positiver Ergebnisse nur ein indirektes Potenzmaß ist, außerdem könnte z. B. TiO₂ als negative Kontrolle in mehreren Versuchen, z. B. mit Metallverbindungen, mitgeführt worden sein, die hier nicht näher ausgewertet wurden.

Die beschriebene sehr ungünstige Beurteilung der In-vitro-Studien ist außerdem stark zu relativieren, wenn man eine differenziertere Betrachtung einzelner Studien-

ergebnisse vornimmt. Sofern nämlich innerhalb eines Labors, einer Arbeitsgruppe oder einer Studie verschiedene Partikelarten im Vergleich untersucht wurden, ist die Wahrscheinlichkeit höher, relativ **gute Übereinstimmung mit In-vivo-Informationen** zu erkennen. Innerhalb dieses Projektes wurden mehrere solche Beispiele gefunden. Die Beispiele sind:

- Im Zelltransformationstest von Hesterberg und Barrett (1984) findet sich eine höhere Wirkungsstärke von langen dünnen Fasern als von dickeren oder gemahlenen Fasern; Abb. 3.2, Tab. 3.27.
- Riebe-Imre et al. (1994) haben eine höhere Wirkungsstärke im Zelltransformationstest von langen dünnen Fasern als von dickeren Fasern festgestellt, außerdem eine Rangfolge Asbest > Ni > NiO > TiO₂; Abb. 3.3, Tab. 3.28-3.30.
- Anhand mehrerer Studien lässt sich eine Korrelation zwischen der Beständigkeit von Glassorten in zellfreien Tests und der karzinogenen Potenz entsprechender Glasfasern in vivo zeigen; Abb. 3.6.
- Für die Studie von Garza et al. (2008) lässt sich eine Korrelation der dort gemessenen ROS-Bildung in A549-Zellen mit der karzinogenen Potenzklasse darstellen (untersuchte Stoffe: TiO₂, Chrysotilasbest, Carbon black, MWCNT, Dieselruß, diverse andere Ruße); Abb. 3.11, Tab. 3.79.
- Zhang et al. (1998) fanden eine Korrelation zwischen Verlust an Superhelix von ΦX174-RFI-DNA mit Lipidperoxidation in BAL-Zellen (und Lungengewicht); die Potenz von Ni- und Co-Partikeln in dem zellfreien Test war höher als von TiO₂; Abb. 3.12, Tab. 3.64.
- Wiemann und Bruch (2009) postulieren die Korrelation eines Summenindexes f
 ür Toxizität in vitro mit dem Summenindex f
 ür Toxizität in vivo (ausgewertete Stoffe: BaSO₄, CeO₃, AlOOH, TiO₂, Ti-Zr, CeO₂, Ti-Al-Zr, DQ12); Abb. 3.13.
- In einer zusammenfassenden Analyse der In-vitro-Gentoxizitätstests von Nanomaterialien und sonstigen Stäuben zeigte sich eine Quote positiver Ergebnisse von 89 %, wenn nur die Mikrokern-Tests berücksichtigt wurden, die ausschließlich an Hochschulen/Behörden/öffentlichen Forschungseinrichtungen durchgeführt wurden; Tab. 3.91, 3.92.

Es ist auch auf einige sicherlich behebbare Schwächen mancher In-vitro-Studien hinzuweisen. Zunächst ein Gesichtspunkt, der eigentlich gar nicht unbedingt als Schwäche der Publikationen zu bezeichnen ist, der aber eine Schwierigkeit bei der Bewertung der Studien und vor allem bei der Kommunikation darüber darstellt: Oft enthalten die Publikationen keine Zahlenwerte für die Ergebnisse in Form von Tabellen. Vielmehr sind die Werte z. B. in Form von Balkengrafiken dargestellt. Das hat für den Leser den Vorteil, dass sich Ergebnisse sozusagen mit einem Blick erfassen lassen. Es macht es aber schwieriger, über die Ergebnisse - gerade auch im Veraleich - mit anderen Studien schriftlich zu berichten. Dazu müssen die Werte aus den Grafiken "abgegriffen" werden, wobei auch die Unsicherheit verbleiben kann, einen Wert zu ungenau "abgegriffen" zu haben. Mag man diesen Gesichtspunkt noch als eher "kosmetischer" Art einordnen, wird es inhaltlich problematischer, dass gelegentlich auch keine Streuungsmaße in den Publikationen angegeben werden. Was bedeutet es, wenn zwei Balken abgebildet sind und einer der Balken ist einen halben Zentimeter höher als der andere? Ist dieser Unterschied bedeutungslos, weil die Streuung der Werte einer einzelnen Stichprobe ohnehin einem Umfang von zwei Zentimetern entsprechen würde oder entspricht die Standardabweichung lediglich einer Auslenkung von einem Millimeter?

Anstatt von Streuungsmaßen sind manchmal Angaben zur statistischen Signifikanz veröffentlicht. Diese Angaben sind dann aber nicht nachvollziehbar. Ein Extrembeispiel diesbezüglich ist die Publikation von Cavallo et al. (2004; Tab. 3.32). Dort wurde z. B. eine Probe von Glaswolle in mehreren Dosierungen geprüft. Die Ergebnisse sind in Form einer Grafik präsentiert, man erkennt deutlich erhöhte Messwerte bei mehreren Dosisstufen. Im Vergleich zu einem Kontrollwert von 5 sind die Werte z. B. auf das 6fache auf 32 erhöht. Trotz dieser deutlich erkennbaren Erhöhung und einer erkennbaren Dosis-Wirkungsbeziehung beurteilen die Autoren diesen Test als negativ. Das Ergebnis sei auf dem gewählten Signifikanzniveau von 0,1 % nicht signifikant. Der Leser kann aufgrund fehlender Streuungsangaben weder nachvollziehen, weshalb eine so starke Messwerterhöhung nicht signifikant ist, noch kann er abschätzen, inwieweit das Ergebnis z. B. auf dem eher üblichen 5%-Signifikanzniveau signifikant wäre (vertiefende Erläuterungen zu nicht-signifikanten Ergebnissen siehe Kapitel 4). Einen weiteren Sonderfall stellt die große NanoCare-Studie dar, in deren wissenschaftlichem Abschlussbericht zu den umfangreichen In-vitro-Studien weder Zahlenwerte in Tabellen genannt sind noch irgendwelche Streuungsmaße noch Angaben zur statistischen Auswertung enthalten sind (Abschnitt 3.2.3.2).

Eine weitere Schwierigkeit beim Vergleich verschiedener In-vitro-Studien sind die unterschiedlichen Dosismaßstäbe. Man findet die Dosiseinheiten μ g/mL, μ g/cm², μ M und μ m³/cell. Zum Teil sind Umrechnungen zwischen zwei Einheiten angegeben, zum Teil auch nicht, so dass sich zwei Experimente, von denen für eines die Dosis in μ g/mL und für das andere in μ g/cm² berichtet wird, nicht ohne weiteres vergleichen lassen. Außerdem ist für mich nicht klar, ob die Experimente zweier Labors in der Dosiseinheit μ g/mL korrekt verglichen werden, weil gegebenenfalls die Zellkonzentration oder Zelldichte unterschiedlich ist und deshalb trotz vielleicht gleicher Massenkonzentration der Prüfsubstanz die Dosis je Zelle unterschiedlich ist.

Zusammengefasst: In einzelnen Studien findet man zum Teil gute Korrelationen von In-vitro- und In-vivo-Ergebnissen. Gleichzeitig ist eine ganz beträchtliche Variabilität der In-vitro-Versuchs- und Protokolldesigns festzustellen mit einer ebenfalls beträchtlichen Variabilität der Ergebnisse. Insgesamt wurden in mehr als der Hälfte der Invitro-Tests gentoxische Effekte festgestellt. Für faserförmige Stäube wurden am konsistentesten positive Befunde erhalten (zirka 70 %). Jedoch ist über alle Stäube und Studien hinweg keine klare Korrelation der Wahrscheinlichkeit positiver In-vitro-Befunde mit den In-vivo-Potenzklassen zu finden. Eine nähere Auswertung der Invitro-Gentoxizitätstests von Nanomaterialien und sonstigen Partikeln (179 Datensätze) hat außerdem Hinweise auf "laborspezifische" Faktoren gegeben, die das Ergebnis beeinflussen können und die sich nicht mit stoffspezifischen Eigenschaften assoziieren lassen (Abschnitt 3.2.3.3; Tab. 3.91-3.92). Aus all diesen Befunden kann geschlossen werden, dass eine In-vitro-Studie mit mehreren unterschiedlichen Partikelarten noch durchgeführt werden sollte, in der gezielt die Korrelation der Ergebnisse mit In-vivo-Informationen untersucht wird. Vorschläge für eine solche Studie werden weiter unten gegeben.

Letztlich hängt die Interpretation der In-vitro-Ergebnisse aber in wesentlichem Maße davon ab, wie man die In-vivo-Daten bewertet. Dieser Gesichtspunkt wurde bereits in der Einleitung und im Methodenteil angesprochen und soll nachfolgend näher ausgeleuchtet werden. Zu diesem Fragenkomplex gehört auch die Frage "Falls ein Tierversuch Karzinogenität zeigt und ein In-vitro-Test mit derselben Substanz Gentoxizität zeigt, gibt es dabei überhaupt einen ursächlichen Zusammenhang oder liegen zwei verschiedene Mechanismen in vivo und in vitro vor?". Konkret betrifft dieser Gesichtspunkt z. B. GBS und das Postulat der sekundären - entzündungsvermittelten -Gentoxizität. Eine von Phagozyten in vivo vermittelte Gentoxizität könnte mit einem In-vitro-Test an einer Zell-Linie gar nicht erfasst werden. Solche Aspekte sind für die regulatorische Toxikologie z. B. in Bezug auf eine aktuelle Bewertung von Titandioxid durch die MAK-Kommission (Hartwig, 2009) von Bedeutung (Abschnitte 5.7.2-5.7.3).

5.2 Reprise: Referenzdaten zur Beurteilung von In-vitro-Tests - Vorsorgeprinzip, Forschungsbedarf

Die Art und Weise der Bewertung von Karzinogenitätsstudien, die z. B. in den 80er Jahren bei Institutionen wie der IARC oder der deutschen MAK-Kommission verbreitet war, wurde noch im Jahr 2000 von den IARC-Mitarbeitern Rice und Wilbourn folgendermaßen zusammengefasst: "In the absence of adequate data on humans, it is biologically plausible and prudent to regard agents and mixtures for which there is sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals, usually rats and mice, as if they presented a carcinogenic risk to humans." Kurz: Wenn sich ein Stoff im Tierversuch als krebserzeugend gezeigt hat, dann ist es aufgrund der Erfahrungen gut begründet, diesen Stoff auch beim Menschen als krebserzeugend anzusehen. Dieses Bewertungsschema ist inzwischen angesichts der Realität in der regulatorischen Toxikologie als überholt anzusehen (Greim, 1998, 2000; AGS, 2008; Bolt, 2008; Roller, 2010). Bolt (2008) hat die Ansicht zum Ausdruck gebracht, dass ein wesentlicher Zuwachs an naturwissenschaftlicher Erkenntnis seit den 80er Jahren eine erheblich komplexere Bewertungsweise erfordert. Demnach reicht es im Ergebnis nicht aus, wenn eindeutige Karzinogenitätsnachweise im Tierversuch vorliegen, sondern es ist zusätzlich dringend erforderlich, Informationen über Wirkungsmechanismen bzw. über das so genannte Wirkprinzip zu berücksichtigen. Dabei wird davon ausgegangen, dass bei sehr vielen Stoffen so gute Kenntnisse über das Wirkprinzip vorliegen, dass es nicht zu rechtfertigen wäre, den Stoff als gleichermaßen krebserzeugend beim Menschen zu betrachten wie es aufgrund der erhöhten Tumorhäufigkeiten im Langzeit-Versuch erscheint. Dagegen habe ich ausführlich dargelegt, dass weniger ein erheblich gewachsener medizinischer Wissensstand, sondern vielmehr veränderte gesellschaftliche Bedingungen als Ursache eines veränderten Bewertungsschemas krebserzeugender Stoffe anzusehen sind (Roller, 2010).

Die veränderte Bewertungsweise von Langzeit-Karzinogenitätsversuchen ist im Hinblick auf die Beurteilung der Prädiktivität von In-vitro-Tests außerordentlich wichtig. Denn sie bedeutet in letzter Konsequenz, dass es überhaupt **keine allgemein anerkannte Referenzgrundlage zur Beurteilung von In-vitro-Tests** gibt.

Die Katze beißt sich in den Schwanz: Die Relevanz der Ergebnisse von Langzeit-Karzinogenitätsversuchen wird gegebenenfalls deshalb bezweifelt, weil In-vitro-Tests keine "primäre Gentoxizität" gezeigt hätten, gleichzeitig wird die Aussagekraft von Invitro-Tests in Zweifel gezogen, weil diese nicht validiert seien. Die Beispiele von Quarz und Chrysotilasbest (Abschnitt 5.4) zeigen außerdem, dass auch epidemiologisch eindeutig erhöhte Krebsrisiken kaum Klarheit schaffen, weil auch deren Relevanz mit Hinweisen auf heutzutage unrealistische, historische Expositionsbedingungen in Zweifel gezogen werden kann. Daher muss die Aussagekraft von epidemiologischen Studien, von Langzeit-Karzinogenitätsversuchen und von In-vitro-Gentoxizitätstests einzeln und in ihrer Wechselbeziehung näher beleuchtet werden.

Die Fragestellung ist sehr schön an einer Publikation von Hesterberg et al. (2005) zu erkennen:

- Hesterberg et al. (2005) ziehen die Aussagekraft der epidemiologischen Daten zur Dieselrußkarzinogenität stark in Zweifel, sie halten die Nachweiskraft der sehr umfangreichen (statistisch signifikant positiven) epidemiologischen Studien im Ergebnis nicht für "überzeugend", wörtlich heißt es dort auf S. 390: "*epidemiology … does not provide persuasive evidence*".
- Die eindeutig nachgewiesenen Lungentumoren bei Ratten werden als speziesspezifischer Überladungseffekt abgewertet; S. 401: "*rat findings are a speciesspecific ... effect that is not relevant*".
- Hinsichtlich der Bedeutung von In-vitro-Gentoxizitätstests schreiben Hesterberg et al. (2005) auf S. 407: "extrapolation form directly exposed bacterial or cell line cultures to intact human beings ... is problematic at best".

Das Dilemma ist seit Jahrzehnten bekannt: Ein zusätzliches expositionsbedingtes Lungenkrebsrisiko in Höhe von 1 zu 100 oder auch nur 1 zu 1.000, ist in Anbetracht der Schwere der Erkrankung viel zu hoch, als dass es der Einzelne vernünftigerweise für sich selbst ignorieren würde. Das Grundgesetz der Bundesrepublik Deutschland wurde bisher großenteils auch so verstanden, dass eine Situation, in der begründet mit einem erhöhten Krebsrisiko von 1 zu 100 oder 1 zu 1.000 zu rechnen ist, nicht ohne weiteres anderen Menschen zugemutet werden darf (AGS, 2008). Gleichzeitig sind aber Krebsrisiken in Höhe von 1 zu 100 oder 1 zu 1.000 empirisch kaum zugänglich. Eine naturwissenschaftliche Aussagesicherheit kann deshalb nicht bestehen. Der naturwissenschaftliche oder gar juristische "Nachweis" einer konkret stoffbedingten Verursachung eines Lungenkrebsrisikos in Höhe von 1 zu 100 ist nicht möglich, von niedrigeren Risikohöhen ganz zu schweigen. Für solche Situationen wurde der Begriff des Vorsorgeprinzips geprägt. Es ist aber schwierig, den Begriff des Vorsorgeprinzips eindeutig zu fassen. Offensichtlich gibt es Unterschiede im Verständnis dieses Begriffs.

Kürzlich erschien aus dem Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU) die Stellungnahme eines Juristen zur Frage: "*Das Vorsorgeprinzip und seine Auswirkungen auf die Nanotechnologie*" (Calliess, 2008). Es erscheint sinnvoll, diesen Artikel vor dem Hintergrund der Bewertung von Nanomaterialien näher zu betrachten. Ich sehe dort 3 Stufen der Anwendung des "Vorsorgeprinzips":

- 1. Vorsorgeanlass
- 2. Widerlegbare Gefährlichkeitsvermutung (Beweislastumkehr)
- Erschüttern des Besorgnisanlasses durch den Risikoverursacher (S. 47): Er muss nicht etwa den Beweis der Schadensunmöglichkeit erbringen, sondern es genügt, wenn Tatsachen ermittelt und vorgebracht werden, aus denen sich - im Verhältnis zum potentiellen Schaden - eine begründete Wahrscheinlichkeit für die Unmöglichkeit eines Schadenseintritts ergibt.

Nach dem Schema von Rice und Wilbourn (2000) wäre die Bewertung nach dem ersten Schritt praktisch zu Ende. Im Falle von Nano-GBS würden zumindest die Lungentumoren bei Ratten einen Vorsorgeanlass (oder Besorgnisanlass) begründen. Positive Ergebnisse aus In-vitro-Gentoxizitätstests liegen ebenfalls vor. Nano-GBS wie Industrieruß sind als strukturverwandt mit Dieselruß zu betrachten, für Dieselruß gibt es Hinweise auf erhöhte Lungenkrebsrisiken in epidemiologischen Studien. Es bestünden demnach gute Gründe, grundsätzlich besorgt zu sein und - für praktische Zwecke - z. B. eine quantitative Risikoabschätzung auf der Grundlage der Tierversuche und epidemiologischen Daten zu Dieselruß vorzunehmen. Es wäre klar, dass damit kein naturwissenschaftlicher Nachweis eines erhöhten Lungenkrebsrisikos z. B. in Höhe von 1 zu 100 beim Menschen erbracht wäre. Juristisch wäre es also vielleicht eine "Gefährlichkeitsvermutung". Aber wäre diese widerlegbar? Wie sollte sie widerlegt werden? Wie sollte eine Wahrscheinlichkeit für die Unmöglichkeit eines Schadenseintritts begründet werden? Gesetzt den Fall, es gäbe für die krebserzeugende Wirkung keine Wirkungsschwelle, dann ginge es eben nicht um die Frage der Unmöglichkeit des Schadenseintritts, sondern um die Frage der Wahrscheinlichkeit des Schadenseintritts. Im Wissen um die erkenntnistheoretischen Grenzen naturwissenschaftlicher Methoden würde man auf absehbare Zeit keine "begründete Wahrscheinlichkeit für die Unmöglichkeit eines Schadenseintritts" erwarten. Man würde so handeln, als ob ein Risiko in der berechneten Höhe bestünde. Selbstverständlich wäre man stets bereit, eine Einschätzung aus guten Gründen zu revidieren. Allerdings sind mir z. B. aus der Geschichte der MAK-Werte keine Fälle bekannt, wo ein MAK-Wert nachträglich - wegen klarer Hinweise auf geringere Schädlichkeit - erheblich hinaufgesetzt werden musste. Dagegen lässt sich an vielen Beispielen von MAK-Werten zeigen, dass der MAK-Wert wegen zusätzlicher Hinweise auf höhere Schädlichkeit der Substanz gesenkt werden musste. Das Papier von Calliess (2008) sieht jedoch ein "Erschüttern des Besorgnisanlasses" gewissermaßen als Bestandteil des Vorsorgeprinzips (als Regelfall?) vor. Da Professor Calliess Mitglied des SRU ist und seine Standpunkte auf der Website des SRU veröffentlicht wurden, ist jedenfalls anzunehmen, dass es sich nicht nur um eine Einzelmeinung handelt. Ich greife daher hier den Begriff des "Erschüttern des Besorgnisanlasses" auf.

Das Wechselspiel der Aussagekraft von epidemiologischen Studien, von Langzeit-Karzinogenitätsversuchen und von In-vitro-Gentoxizitätstests sowie das Thema zukünftiger Forschungsplanung sei daher nachfolgend im Lichte folgender Fragen betrachtet:

- Welche Daten sind geeignet, Besorgnis hinsichtlich karzinogener Effekte zu begründen?
- Welche Daten sind geeignet, einen Besorgnisanlass hinsichtlich karzinogener Effekte zu erschüttern?
- Welche Studien sollten geplant und zukünftig durchgeführt werden, um einen erheblichen zusätzlichen Informationsgewinn zur Bewertung von Nano-GBS zu erlangen?

5.3 Welche Erkenntnisse über krebserzeugende Wirkungen von Nanomaterialien sind von zukünftigen epidemiologischen Studien zu erwarten?

In der epidemiologischen Studie von Wellmann et al. (2006) an Beschäftigten in der Industrieruß-Produktion wurde eine statistisch signifikant erhöhte Maßzahl des relativen Risikos (SMR, Standardized Mortality Ratio) von 2,18 gefunden. Das Lebenszeit-Lungenkrebsrisiko beträgt im Durchschnitt der männlichen Allgemeinbevölkerung in den Industriestaaten ungefähr 5 bis 9 %, derzeit kann man für Deutschland einen Wert von 7 % ansetzen (Steindorf und Becher, 1994; Roller et al., 2006; Roller, 2009). Ein relatives Risiko von 2,18, in der Studie von Wellmann et al. (2006) erfasst in Form der SMR, entspricht rechnerisch also einem zusätzlichen absoluten Exzess-Lungenkrebsrisiko von $(2,18 - 1) * 7 \% \approx 8 \%$. Auf der Risikoskala von AGS (2008) ist dies ein Risiko, das um das Zwanzigfache höher ist als das tolerable Risiko und um das Zweihundertfache (!) höher als das vorläufig akzeptable Risiko von 4:10.000. Gleichwohl wurden die Ergebnisse der Studie von Wellmann et al. (2006) nicht als Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Lungenkrebsrisiko und Rußexposition anerkannt. Man stellte fest, dass es keine klare Expositions-Risikobeziehung gebe (Büchte et al., 2006; Morfeld et al., 2006); außerdem kann man angesichts der mannigfachen Einflüsse, denen Menschen in ihrem Alltag ausgesetzt sind, in epidemiologischen Studien stets nicht näher bekannte oder erfassbare störende Einflüsse vermuten. Allein dieses Beispiel zeigt, wie schwierig es ist, aus epidemiologischen Studien klare Informationen über eindeutige Zuordnungen bestimmter Stoffexpositionen und Lungenkrebsrisiken zu erhalten.

In den Tabellen 3.21-3.23 sind Zahlenwerte für Verhältnisse berechneter Risikohöhen zu Expositionskonzentrationen verschiedener Stäube aufgeführt. Zum Teil wurden diese Werte aus epidemiologischen Daten erhalten, zum Teil aus Karzinogenitätsversuchen mit Ratten. Anhand dieser Zahlen habe ich die Stäube in 3 "Potenzklassen" eingeteilt (Tab. 3.24-3.26). Für die Tab. 5.3 wurden diese Zahlen benutzt, um diejenigen Expositionshöhen abzuschätzen, oberhalb derer statistisch signifikante Erhöhungen des Lungenkrebsrisikos in epidemiologischen Studien zu erwarten sind. Als realistische Expositionsdauer in solchen Studien ist für Tab. 5.3 nicht die maximale Lebensarbeitszeit von 40 Jahren angesetzt, sondern ein Mittelwert von 20 Jahren (auch eine kontinuierliche Expositionsdauer von 20 Jahren für ein entsprechend großes Kollektiv ist zukünftig unwahrscheinlich). Wenn also die wahren expositionsbedingten Lungenkrebsrisiken des Menschen nicht deutlich höher sind als bei Roller et al. (2006) abgeschätzt, dann müssten die Langzeit-Mittelwerte von Nano-GBS in 20 Jahre dauernden Expositionen mindestens 2,5 mg/m³ betragen, um expositionsbedingt eine SMR größer als 2, mithin ein statistisch signifikant erhöhtes Lungenkrebsrisiko, erwarten zu lassen. Eine so hohe Exposition ist an heutigen Arbeitsplätzen nicht zu erwarten. Bei Nicht-Nano-GBS müsste der Langzeit-Mittelwert 25 mg/m³ betragen, um "etwas zu sehen". Für die Berechnungen ist hier eine lineare Expositions-Risikobeziehung (ERB) angenommen. Sollte die ERB tatsächlich sublinear sein, dann bedeutet dies in diesem Fall, dass eine signifikante Risikoerhöhung noch weniger zu erwarten ist, auch dann wenn das Exzess-Risiko tatsächlich größer ist als Null.

Tab. 5.3Zur Frage: Ist die Entdeckung partikelbedingt erhöhter Lungenkrebs-
risiken in zukünftigen epidemiologischen Studien zu erwarten?

Stoff	Datenquelle	Potenz ^a % ER (Exzess- Risiko) pro mg/m ³	Mindestexposition für epidemiolog. "Risikonachweis" 5 % ER nach 20 J. Exposition ge- genüber Langzeit- Mittelwert	Expositions- grenze zu "tolerablem Risiko" ER 0,4 % nach 40 J. Exp. gg. Langzeit- Mittelwert	
Asbest	Epidemiologie	100	100 µg/m ³	4 µg/m ³	
Cr(VI)-Verbdgn.	Epidemiologie	100	100 μg/m ³	4 µg/m ³	
Cd-Verbindungen	Epidemiologie	25	400 μg/m ³	16 µg/m³	
Quarz	Epidemiologie	20	500 μg/m ³	20 µg/m ³	
Ni-Verbindungen	Epidemiologie	10	1.000 μg/m ³	40 µg/m ³	
Dieselruß/Nano- GBS (Dichte 2)	Epidemiologie /Inhal.vers.	4	2.500 µg/m ³	100 µg/m³	
GBS, "groß-fein" (Dichte 2)	Inhal/Inst versuche	0,4	25 mg/m ³	1 mg/m ³	
Zum Vergleich:					
Zulässiger Jahresmittelwert Partikel PM ₁₀ (einschließlich Asbest, Cr, Cd, Ni, GBS usw.) in Städten gemäß BImSchV 22 2002: 40 μg/m ³					
Allgemeiner Staubgrenzwert der MAK-Kommission von 1997: 1,5 mg/m ³ = 1.500 µg/m ³					

Fazit: Es ist nicht zu erwarten, dass zukünftige epidemiologische Studien Hinweise auf ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko infolge von Expositionen gegenüber Nano-GBS liefern werden, auch dann, wenn das expositionsbedingte Lungenkrebsrisiko bei Menschen tatsächlich genauso hoch ist wie bei Ratten.

^a Steigung einer als linear angenommenen Expositions-Risikobeziehung: Verhältnis des Exzess-Risikos (ER, Lebenszeitrisiko) zum Langzeit-Mittelwert einer 40jährigen Exposition am Arbeitsplatz.

Legt man das aus Inhalationsversuchen abgeleitete Risiko für einen Quarzstaub zugrunde, dann müsste eine große Kohorte kontinuierlich für 20 Jahre am Arbeitsplatz gegenüber einem Langzeit-Mittelwert von mindestens 500 µg/m³ alveolengängigem reinem Quarzstaub (mit der Potenz des stark wirksamen "Modellstaubs" DQ12) exponiert sein, damit man mit einem relativen Risiko bzw. einer SMR = 2 rechnen könnte. Eine solche Studie wird es nicht geben. Zur Erinnerung: Selbst dann, wenn in einer epidemiologischen Studie eine SMR von ungefähr 2 aufgetreten ist, statistisch signifikant, dann bestehen häufig Zweifel, ob ein Kausalzusammenhang besteht oder ob Störeinflüsse maßgeblich sind (s.o., Studie von Wellmann et al., 2006).

Aus Tab. 5.3 geht klar hervor: Es ist nicht zu erwarten, dass zukünftige epidemiologische Studien Hinweise auf ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko infolge von Expositionen gegenüber Nano-GBS liefern werden, auch dann, wenn das expositionsbedingte Lungenkrebsrisiko bei Menschen tatsächlich genauso hoch ist wie bei Ratten. Gründe für einen "Besorgnisanlass" hinsichtlich eines durch Nano-GBS bedingten Lungenkrebsrisikos sind aus epidemiologischen Studien nicht zu erwarten. Das heißt, es ist ebenfalls nicht zu erwarten, dass aus Erfahrungen am Menschen schwerwiegende Schadenersatzansprüche aufgrund inhalativer Nano-GBS-Exposition begründet werden können. Gleichzeitig mag das wahre durch Nano-GBS bedingte Lungenkrebsrisiko des Menschen genauso hoch sein wie bei Ratten. Dieser scheinbare Widerspruch muss betont werden. Er ergibt sich aus den Grenzen epidemiologischer Methoden.

5.4 Welche Aussagekraft über das Fehlen eines krebserzeugenden Potentials von Nanomaterialien ist in vorliegenden epidemiologischen Studien enthalten?

Gemäß der Wortwahl von Calliess (2008) kann man die Frage auch so formulieren: Inwiefern können epidemiologische Studien einen bestehenden Besorgnisanlass hinsichtlich eines erhöhten Lungenkrebsrisikos (z. B. aufgrund von Tierversuchen) erschüttern? Die technische Information zu dem Produkt "NIPex® - Pigment Blacks for Toner" von EVONIK INDUSTRIES enthält Aussagen zur Produktsicherheit, es heißt dort (Tauber et al., 2010): *"With respect to carcinogenicity, carbon black is classified by IARC with a 2B rating, which means it is regarded "a possible human carcinogen". This classification is based on long-term experiments on rats. However, mouse and hamster did not develop lung tumor under similar testing conditions. Here, the significance of the animal species and the tumor triggering mechanism has not yet been determined. Long term investigations on large groups of workers at carbon black facilities in Germany, the UK and the USA were carried out on behalf of the International Carbon Black Association. The results from these mortality studies, however, show no link between exposure to carbon black and higher lung cancer mortality rates in humans."*

Den letzten Satz mag man folgendermaßen übersetzen: "Die Ergebnisse dieser Mortalitätsstudien zeigen jedoch keine Verbindung zwischen der Exposition gegenüber Industrieruß und höheren Lungenkrebsmortalitätsraten bei Menschen." Die Studien zeigen keine Verbindung. Was heißt das? Man liegt sicherlich nicht falsch mit der Vermutung, dass die meisten Leser diesen Satz so verstehen werden, als würde er aussagen: Die Studien haben gezeigt, dass beim Menschen kein expositionsbedingtes Lungenkrebsrisiko besteht. Das steht da aber nicht. Die Studien haben nicht gezeigt, dass eine Verbindung besteht. Das ist eine andere Aussage als "Die Studien haben gezeigt, dass keine Verbindung besteht". Dieser feine, aber wichtige Unterschied führt immer wieder zu Missverständnissen, nicht nur bei Laien. Auch in Diskussionen in Gremien wird gelegentlich so argumentiert, als spreche ein nichtsignifikantes Ergebnis einer epidemiologischen Studie gegen das Vorhandensein eines Risikos beim Menschen. Es wird in dem Sinn argumentiert, als werde dadurch der "Besorgnisanlass erschüttert".

An dieser Stelle ist Bezug auf das Kapitel 4 zu nehmen. Dort ist erläutert, was ein nicht (statistisch) signifikantes Ergebnis bedeuten kann. Nach dem Ansatz von R.A, Fisher ist aus einem nicht signifikanten Ergebnis keine eindeutige Schlussfolgerung zu ziehen: also Nullinformation anstatt Nullrisiko. Häufig wird in der regulatorischen Toxikologie mit Signifikanztests aber so umgegangen, als würde dem Konzept von J. Neyman gefolgt. Demnach dient das Ergebnis eines statistischen Tests als Entscheidungskriterium, festgemacht am fixierten Signifikanzniveau von 5 %: Annahme eines Risikos versus Annahme keines Risikos. Es wird zwar praktisch nie näher angegeben, dass diesem Konzept gefolgt wird; aus der Art, wie die Ergebnisse beurteilt werden, ergibt sich dies aber zwangsläufig. Der Fehler, der regelmäßig bei diesem Verfahren gemacht wird, ist der, dass keine Aussage zu Risikohöhe gemacht wird, die man als *"hinnehmbar"* oder *"wert, entdeckt zu werden"* erachtet, und keine Angaben zu den Chancen der Studie, eine solche Risikohöhe überhaupt entdecken zu können. In jedem Fall gilt: Ein nicht signifikant erhöhtes Krebsrisiko ist kein Beleg für das Fehlen eines erhöhten Krebsrisikos.

Bezüglich der Bewertung von Nano-GBS und speziell von Industrieruß habe ich in Abschnitt 5.3 bereits die Arbeit von Wellmann et al. (2006) in der Industrieruß-Produktion genannt. Dort war das Lungenkrebsrisiko bei den Beschäftigten insgesamt verdoppelt. Diese Verdopplung konnte aber nicht mit ausreichender Aussagesicherheit ursächlich zu einer Rußexposition in Beziehung gebracht werden. In der EVONIK-Information heißt es "mortality studies, however, show no link" (Tauber et al., 2010). Es erscheint wichtig festzustellen, dass diese Art der Argumentation nicht ein besonderer Fall bei GBS oder Nano-GBS ist, sie ist vielmehr generell verbreitet. Unsicherheiten in der Aussagekraft epidemiologischer Studien werden nicht nur bei Nano-GBS, sondern bei fast allen Stäuben, die grundsätzlich als Lungenkrebs erzeugend gelten, in irgendeiner Weise als (scheinbare) Belege zur Erschütterung des Besorgnisanlasses angeführt. Ich habe dies für die Beispiele Quarz, Nickel, Chrom und Dieselruß kürzlich beschrieben (Roller, 2010). Nachfolgend sei das Beispiel des Chrysotilasbests angeführt, ein Stoff, dessen Verwendung in Deutschland grundsätzlich verboten ist. Das Verbot gründet sich auf jahrzehntelange Erfahrungen mit Asbest und auf fast Zwanzigtausend als Berufskrankheit anerkannte Krebsfälle (ca. 18.500 Lungenkrebs- und Mesotheliomfälle anerkannt 1978-2003; Butz, 2005; Roller, 2010). Dabei war in Deutschland Chrysotilasbest die am meisten verwendete Asbestart (ca. 90 %). Eine Exposition einzelner Personen ausschließlich gegenüber einhundertprozentig reinem Chrysotilasbest war aber selten, häufig lassen sich, gegebenenfalls in geringer Menge, Anteile anderer Asbestarten, der so genannten Amphibole, nachweisen. Aktuell wird deshalb von der kanadischen Asbestindustrie die lange bekannte Argumentationsweise aufgegriffen, Chrysotil habe, wenn überhaupt, nur eine wesentlich geringere krebserzeugende Potenz als Amphibolasbeste. Amphibolasbestprodukte werden heute nicht mehr produziert, wohl aber werden in verschiedenen Ländern Chrysotilprodukte hergestellt bzw. verwendet (ca. 2 Millionen Tonnen weltweit jährlich im Jahr 1999 bzw. 2003). Umfangreiche Informationen darüber lassen sich auf der Website des *Chrysotile Institute* (2010), das offensichtlich im Auftrag der (staatlichen) kanadischen Chrysotilindustrie tätig ist, nachlesen ("*The Chrysotile Institute, a non profit organization established in 1984, is directed by a Board of directors made up of industry, labour and government representatives*").

Das Prinzip eines "sicheren Umgangs" mit Chrysotilasbest wird dort folgendermaßen charakterisiert: "Canadian chrysotile industry, as well as the governments of Canada and Québec and the national trade unions, supports the safe-use principle - which is a risk assessment / risk management approach - not only for chrysotile, but for all minerals and metals." und "Because it can be used safely, Canada supports the safe use principle". Auf der Website finden sich auch Literaturhinweise, welche eine relativ geringe Gefährlichkeit von Chrysotil belegen sollen. Ein großer Teil der Dokumente wird zum Download angeboten; ich führe hier die dort genannten Titel auf:

- Review of the differences between chrysotile and amphibole asbestos. David M. Bernstein, Ph.D. Download document
- Safety in the Use of Chrysotile Requirements and Achievements. Download document
- Asbestos: The cause of 100,000 Deaths...yearly? MYTH OR REALITY?. Download document
- The Basics of Chrysotile Asbestos Dust Control. Download document
- Undeniable facts about chrysotile. Download document
- Mortality from occupational exposure to relatively pure chrysotile: a 39-year study. Download document
- Today's chrysotile world 2008. Download document
- Is Abestos Killing 100,000 People Each Year? Download document
- Asbestos Fibre Types and Health Risks. Are Perceptions Related to FACTS? Download document
- The Asbestos saga. Why so much emotion? Download document
- *IBE* Opinion Paper. Asbestos on the carcinogenic substances list. Scientists re-establish facts
- The health effects of chrysotile: Current perspective based upon recent data. David M. Bernstein, John A. Hoskins
- Chrysotile as a Cause of Mesothelioma: An Assessment Based on Epidemiology. Charles M. Yarborough, Exponent, Inc., New York, New York, USA
- The Toxicological Response of Brazilian Chrysotile Asbestos: A Multidose Subchronic 90-Day Inhalation Toxicology Study with 92-Day Recovery to Assess Cellular and Pathological Response. By: David M. Bernstein, Rick Rogers, Paul Smith, Jörg Chevalier
- Inhalation Toxicology, Second Edition. By: David M. Bernstein

- An Exposure Study of Bystanders and Workers During the Installation and Removal of Asbestos Gaskets and Packing. by: Carl Mangold, Katherine Clark, Amy Madl and Dennis Paustenbach
- CASITILE, THE NEW ASBESTOS: Time to clear the air and save £20 billion. By: Professor John Bridle and Sophie Stone MSc BSc (Hons)
- Understanding Chrysotile Asbestos: A New perspective Based upon Current Data. By: David M. Bernstein
- The toxicological response of Brazilian chrysotile asbestos: A multi-dose subchronic 90-day inhalation toxicology study with 92 day recovery to assess cellular and pathological response. By: David M. Bernstein
- Occupational Environmental Medicine
- The Asbestos Dilemma: I. Assessment of risk
- The Asbestos Dilemma: II. The ban
- Alarm rising in Denmark over plastic piping. Environment Daily 1395, 28/02/03
- Special Report: Asbestos-Cement Pipe
- Understanding Mesothelioma
- Special Report : Among The Least Hazardous Industrial Fibres

Es würde hier zu weit führen, die Artikel oder Arbeiten einzeln zu besprechen. Soweit ich mir die Artikel angesehen habe, war festzustellen, dass sie als Stütze der Aussage dienen sollen, das Risiko durch Chrysotilasbest sei nicht so groß, dass es ein Verbot erfordere, Risikozahlen in mancher Literatur seien irreführend übertrieben und ein sicherer Einsatz von Chrysotil sei möglich und von Nutzen für die Gesellschaft. Dabei sind eben auch einzelne epidemiologische Studien zitiert, die nach den Interpretationen ihrer Autoren eher gegen ein erhöhtes Krebsrisiko durch Chrysotil an (neueren) Arbeitsplätzen sprechen sollen. Als Beispiel sei hier die Arbeit von Sichletidis et al. (2008) näher betrachtet. Sie ist in der Liste des Chrysotile Institute unter ihrem Titel "*Mortality from occupational exposure to relatively pure chrysotile: a 39-year study*" aufgeführt (s.o.).

An ihrem Ende enthält die Arbeit von Sichletidis et al. (2008) die Schlussfolgerung: "We conclude that occupational exposure to relatively pure chrysotile under strict permissible levels does not increase the relative risk for mesothelioma and lung cancer." Es wird dann zwar noch der Satz nachgestellt "Decreased overall mortality of workers indicates a healthy worker effect, which - together with the relatively small cohort size - could have prevented small risks to be detected", doch was ist in diesem Zusammenhang "a small risk"? Vor allem stellen die Autoren fest "chrysotile … does not increase … risk", und in diesem Sinne wird die Arbeit wohl auch von Chrysotile Institute (2010) zitiert. Was also waren die Ergebnisse der Studie von Sichletidis et al. (2008)? Nachfolgend einige Charakteristika der Kohorte:

Anzahl Kohortenmitglieder:317Davon verstorben:52Davon an Lungenkrebs verstorben:16 (31 % aller Verstorbenen)SMR, Lungenkrebs:1,71, 95%-Konf.int. 0,98-2,78 (erwartete Fälle: 9,35)

Rauchverhalten: "We should notice that consumption of cigarettes (pack years) of the living workers was less than that of the general population, while those who died had similar pack years as the general population".

Die Lungenkrebshäufigkeit in dieser Kohorte ist sehr hoch, 31 % der Verstorbenen. Das erscheint ungewöhnlich, denn die Häufigkeit von Lungenkrebs in der männlichen Allgemeinbevölkerung in den Industriestaaten liegt bei 5 bis 9 % und das maximal erreichte Alter von 79 Jahren der verstorbenen Exponierten ist nicht besonders hoch (obwohl eine niedrige SMR für alle Ursachen für einen healthy worker effect spricht). Ich habe deshalb in der WHO-Datenbank nachgesehen (WHO, 2010): Im Jahr 2003 (das Jahr, worauf sich Sichletidis et al., 2008, bei ihrer "SMR"-Berechnung beziehen) findet sich der höchste Anteil an Lungenkrebs unter allen Verstorbenen mit 17,8 % in der Gruppe der 55-59Jährigen. Unter Zusammenfassung der Altersklassen 45-74 Jahre ergibt sich ein Prozentsatz von 14,4 %. In früheren Jahren war der Anteil an Lungenkrebs geringer bzw. der Anteil nahm über die Jahre hinweg bis zum Jahr 2003 zu. Selbst wenn man also für Griechenland - wegen besonders hohen Zigarettenkonsums - eine höhere Lungenkrebsmortalität als in anderen Industriestaaten annimmt, dann ist ein Anteil von fast einem Drittel Lungenkrebstodesfällen in einer Kohorte mit einem maximalen Alter von nur 79 Jahren "nicht niedrig". Die SMR von 1,71 wird von den Autoren als "nicht-signifikant" eingestuft. Ein p-Wert wird nicht angegeben, die untere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls liegt bei 0,98, ist also nur wenig vom Wert 1,00 entfernt. Anhand des Werts von 9,35 erwarteten Fällen lässt sich der p-Wert für zweiseitige Fragestellung mit p = 0.059 berechnen. Nach dem Konzept von R.A. Fisher wäre dies ohne weiteres als "signifikant" zu bezeichnen (Abschnitt 4.2, 4.5, Sainani, 2009: "nothing magical happens at .05). Bei der Studie liegt es außerdem nahe, eine einseitige Fragestellung vorauszusetzen: Es bestand nicht die Frage, ob durch die Tätigkeit der Exponierten ihr Lungenkrebsrisiko gesenkt wurde, sondern nur die Frage, ob es erhöht wurde. Bei einseitiger Fragestellung ist die SMR mit p = 0,03 zweifellos signifikant erhöht. Letztlich sind solche Überlegungen aber nicht entscheidend: Es ist offenbar nicht zu klären, inwieweit ein doch erhöhter Raucheranteil - noch erheblich über das ohnehin starke Rauchverhalten der griechischen Allgemeinbevölkerung hinaus - zu dem relativ hohen Lungenkrebsanteil in der Kohorte beigetragen hat, inwieweit sonstige Einflüsse und inwieweit Chrysotil zu dem hohen Lungenkrebsrisiko der Kohorte beigetragen haben.

Klar ist jedenfalls, dass bei einem Gesamtanteil von mehr als 30 % Lungenkrebs in einer Gruppe von 52 verstorbenen Männern ein expositionsbedingtes Lungenkrebsrisiko in absoluter Höhe von 1 oder 2 % nicht abzugrenzen ist. Bei einem Anteil von "nur" (im Verhältnis zu 17,8 % unter den 55-59Jährigen des Jahres 2003) zirka 12 % Lungenkrebs in der Allgemeinbevölkerung würde ein relatives Risiko von 1,71 einem absoluten Exzess-Risiko von zirka 8 % entsprechen. Die Studie von Sichletidis et al. (2008) war offenbar nicht aussagefähig genug (die Power war nicht vorhanden), ein Exzess-Risiko von 8 % zu entdecken. Denn die Studie wurde ja als "nicht-signifikant" beurteilt, obwohl das Maß des relativen Risikos mit 1,71 ermittelt wurde. Wenn daher Sichletidis et al. (2008) davon schreiben, dass gegebenenfalls *"small risks*" nicht entdeckt werden konnten, dann ist dieses Risiko immerhin im Bereich von einigen Prozent - als absolutes Exzess-Risiko - anzusetzen, also um ein Vielfaches höher als gemäß AGS (2008) als akzeptabel oder tolerabel zu beurteilen. Wie hoch hätte der Anteil von Lungenkrebs in der Kohorte von Sichletidis et al. (2008) sein müssen, um einen klaren kausalen Zusammenhang mit der Chrysotilexposition entgegen allen Zweifeln wahrscheinlich zu machen?

Die Studie von Sichletidis et al. (2008) mit einem "nicht-signifikanten" Anteil von 31 % Lungenkrebstodesfällen unter den Verstorbenen zeigt also: Lungenkrebsrisiken müssen "extrem hoch" sein, um als "auffällig erhöht", "signifikant" oder gar als "wahrscheinlich ursächlich mit der Exposition verbunden" beurteilt zu werden. Selbst dann, wenn auffällige oder statistisch signifikante Ergebnisse vorliegen, kann eine Vielfalt sonstiger oder konkurrierender Einflüsse die Interpretation eines Kausalzusammenhangs erschweren. Die Studie von Sichletidis et al. (2008) im Rahmen der Argumentation des Chrysotile Institute (2010) zeigt außerdem, dass es offenbar verführerisch ist, die Aussageunsicherheit in epidemiologischen Studien als scheinbaren Beleg für eine "Unbedenklichkeit" auch vormals als gesundheitsschädigend erkannter Stoffe zu benutzen. Es wäre "blauäugig", solche Gesichtspunkte bei veröffentlichten Einschätzungen zur "Gefährlichkeit" von Nanomaterialien auszublenden.

Die Beispiele zu Industrieruß und Chrysotil sollten hier zur Anschauung der Anwendung genereller Konzepte auf konkrete Einzelfälle dienen. Man kann die Bewertung epidemiologischer Studien jedoch auch unter allgemeinen, abstrakten Gesichtspunkten analysieren. Dazu sei nachfolgend näher erläutert, welche Charakteristika einer Kohortenstudie vorhanden sein müssten, um sachgemäß damit einen bestehenden "Besorgnisanlass zu erschüttern". Die folgenden Überlegungen sollen sich auf Stoffe wie mineralische Dämmwollen, Cobalt- und Vanadiumverbindungen, elementares Nickel oder Nano-GBS beziehen, bei denen Grund zur Vermutung einer krebserzeugenden Wirkung (aufgrund von Tierversuchen bzw. In-vitro-Studien) besteht. Im Falle eines völligen Nicht-Wissens über einen Stoff gilt selbstverständlich die Regel, dass jedes nicht signifikante Ergebnis einer epidemiologischen Studie keine weiteren Konsequenzen hat: Vor der Studie bestand kein Grund zu einer Gefährlichkeitsvermutung, nach der Studie besteht er noch immer nicht, unabhängig von Umfang der Studie. Die Interpretation der Studie ist aber komplizierter, wenn aus anderen Gründen eine "Gefährlichkeitsvermutung" besteht und das nicht-signifikante Ergebnis dazu verwendet werden soll, die Gefährlichkeitsvermutung auszuräumen oder zu "erschüttern". Dann müssen Bedingungen erfüllt sein, die es hinreichend wahrscheinlich machen, dass die Studie überhaupt ein Risiko hätte entdecken können, wenn es denn bestehen würde. Dazu gehört bei Krebsrisiken zunächst eine ausreichend lange Beobachtungszeit der Kohorte. Es genügt nicht ein bestimmter Kohortenumfang, also eine Mindestzahl an Personen. Sondern die Personen müssen so lange beobachtet worden sein, at risk gewesen sein, dass sich eine Lungenkrebserkrankung hätte entwickeln und entdeckt werden können. Wenn also in einer Kohorte zwar 100.000 Personen gezählt worden wären, dann würde diese Zahl für die Aussagekraft nicht ausreichen, falls die Personen z. B. längstens 10 Jahre beobachtet worden wären. Es ist nahezu ausgeschlossen, dass sich in dieser Zeit eine Lungenkrebserkrankung entwickelt. Auch 20 oder 30 Jahre Beobachtung reichen nicht aus, denn bei einer gewissen Zahl von Kohortenmitgliedern mögen sich die Erkrankungen erst später entwickeln, also erst später wird der volle Umfang des Risikos erkennbar sein.

Tab. 5.4 Zur Frage: Wann ist die Interpretation einer epidemiologischen Studie zum Lungenkrebsrisiko als "negativ" gerechtfertigt? Berechnung des benötigten Stichprobenumfangs unter folgenden Bedingungen: Signifikanzniveau α = 0,05, Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art β = 0,05 (Power = 95 %).

Kleinstes als "er- heblich" einge- schätztes absolu- tes Exzess-Risiko (ER;	Charakteristika einer Kohortenstudie, deren nicht- signifikantes Ergebnis nach einer begründeten Risiko- vermutung ^a als Anlass verwendet werden dürfte, sich so zu verhalten, als ob bei der Exposition X kein erhöhtes Risiko bestünde (<i>inductive behaviour</i>)			
Lebenszeitrisiko, Hintergrundrisiko Po = 7 %)	Gegenüber X (Langzeit-Mittelwert) 40 Jahre lang exponierte Gruppe			Referenzgruppe
10 1 707	Anzahl Personen [⋼]	Personen- jahre ^b	Erwartete Fälle ^b	Anzahl Perso- nen ^b
10 %		7.100	10	Population
10 %	290	14.500	20	290
1 %		490.000	680	Population
1 %	18.000	900.000	1.260	18.000
0,4 % (4 : 1.000)		2,9 Mill.	4.000	Population
0,4 % (4 : 1.000)	110.000	5,5 Mill.	7.700	110.000
0,1 % (1 : 1.000)		46 Mill.	64.000	Population
0,1 % (1 : 1.000)	1,7 Mill.	85 Mill.	119.000	1,7 Mill.

^a Z. B. aufgrund von Tumorbefunden in einem Karzinogenitätsversuch oder aufgrund eines signifikant erhöhten Tumorrisikos bei einer höheren Exposition in einer epidemiologischen Studie.

b Die Charakteristika sind nach zwei unterschiedlichen statistischen Ansätzen berechnet. Die jeweils obere Zeile bezieht sich auf eine Studie, in der die Allgemeinbevölkerung (= Population) als Referenzgruppe dient bzw. in der die SMR berechnet wird. Dabei beruht die Statistik auf der Poisson-Verteilung: Zur Power-Ermittlung wurde hier zunächst das relative Risiko als RR = (P_0 + ER) / P₀ gebildet, daraus wurde nach der Formel auf S. 278 von Breslow und Day (1987) die Zahl der erwarteten Fälle berechnet. Damit lässt sich gemäß einer mittleren Lungenkrebsmortalitätsrate von 0,0014 pro Jahr die Zahl der Personenjahre abschätzen (auf eine Abschätzung der ungefähren Kohortengröße wurde verzichtet, daher die Eintragung "--" bei der "Anzahl Personen"). Die jeweils untere Zeile bezieht sich auf das Szenario einer Kohortenstudie mit interner Referenzgruppe und gleichen Gruppengrößen. Zur Berechnung der Gruppengrößen (im Verhältnis 1:1 bezüglich exponierter Kohorte und Referenzgruppe) wurde die Software Epi Info von Dean et al. (1995) benutzt. Die Anzahl erwarteter Fälle ist dabei gleich in exponierter Kohorte und Referenzgruppe, sie beträgt jeweils $P_0 = 7$ % der Gruppengröße. Die Personenjahre in der exponierten Kohorte wurden hier abgeschätzt, indem die Anzahl der Personen mit einer mittleren Beobachtungszeit von 50 Jahren multipliziert wurde; dieselbe Anzahl an Personenjahren kommt für die jeweils gleich große Referenzgruppe noch hinzu.

Kohortenstudien zum Lungenkrebsrisiko werden häufig so durchgeführt, dass anhand von Daten der Allgemeinbevölkerung die Anzahl erwarteter Lungenkrebsfälle berechnet und mit der Anzahl der beobachteten Lungenkrebsfälle verglichen wird (Berechnung der *Standardized Mortality Ratio*, SMR). Signifikanzberechnungen beruhen dabei auf der Poisson-Verteilung. Entsprechende Power-Berechnungen sind in Tab. 5.4 enthalten. Zusätzlich sind dort Ergebnisse von Power-Berechnungen aufgenommen, die auf Fisher's Exact Test beruhen. Dies bezieht sich auf ein Szenario, in dem zwei gleich große Gruppen lebenslang verfolgt werden. Als mittlere, notwendige Follow-up-Zeit ist dabei der Wert von 50 Jahren angesetzt; dort würde also eine Kohorte von 20.000 Personen, einem epidemiologischen Beobachtungsaufwand von 1 Million Personenjahren entsprechen.

Hintergrund der in Tab. 5.4 aufgeführten Ergebnisse von Berechnungen zur statistischen Power sind die in Kapitel 4 beschriebenen erkenntnistheoretischen Überlegungen. In Tab. 5.4 ist durch einen Rahmen das Exzess-Risiko von 0,1 % hervorgehoben. Dieses Risiko liegt zwischen dem nach AGS (2008) als "vorläufig akzeptabel" beurteilten Risiko von 0,04 % (4:10.000) und dem als "tolerabel" gekennzeichneten Wert von 0,4 % (4:1.000). Die Tab. 5.4 zeigt, dass man eine sehr große Kohorte mit Zigtausenden von erwarteten Lungenkrebsfällen und zig Millionen Personenjahren untersuchen und mit dem "externen Standard" der männlichen Allgemeinbevölkerung Deutschlands (40 Millionen) vergleichen müsste, um bei einem nicht-signifikanten Ergebnis Folgendes feststellen zu dürfen: "Ein Exzess-Risiko von weniger als 0,1 % halten wir nicht für schwerwiegend, wir haben in unserer Studie keine signifikante Erhöhung gefunden. Daher verhalten wir uns nun so, als ob kein erhöhtes Risiko bestünde." Es ist klar, dass eine solche Studie praktisch nicht durchführbar ist. Selbst dann wenn man ein höheres Risiko von z. B. 1 % als "unerheblich" o.ä. beurteilen würde, wäre eine geeignete Studie kaum durchführbar. Anhand realistischer Studien kann allenfalls dann ein nicht-signifikantes Ergebnis als Begründung für ein "Verhalten, als ob kein Risiko bestünde" verwendet werden, wenn man nur Exzess-Lungenkrebsrisiken von 10 % oder mehr als "erheblich", "unzumutbar", "nennenswert", "large risk" usw. beurteilt. Dies entspricht jedoch nicht der im Grundgesetz verbrieften Ethik.

<u>Fazit:</u> Realistische epidemiologische Studien sind nicht geeignet, bestehende Verdachtsmomente auf ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko zu entkräften, es sei denn, man würde Exzess-Krebsrisiken in Höhe von z. B. 1 % oder mehr als "unerheblich" bewerten. Eine solche "Risikoakzeptanz" verbietet sich durch das bestehende Grundgesetz. Realistische epidemiologische Studien sind folglich nicht geeignet, einen gegebenen Besorgnisanlass hinsichtlich eines erhöhten Lungenkrebsrisikos zu erschüttern.

5.5 Planung von In-vivo-Studien

5.5.1 Welche Karzinogenitätstests können durchgeführt werden, um genauere Informationen zur Expositions-Risikobeziehung für Nano-GBS zu erhalten?

Eine Ratte ist kein Mensch. Deshalb lassen sich stets Thesen aufstellen, dieser oder jener Stoffwechselvorgang sei bei Menschen anders als bei Ratten. Ein stoffbedingt nachgewiesenes erhöhtes Tumorrisiko bei Ratten ist deshalb kein zweifelsfreier wissenschaftlicher oder gar juristischer Nachweis, dass derselbe Stoff, womöglich in derselben Konzentration, bei Menschen dasselbe Tumorrisiko verursacht wie bei den Ratten. Über Jahrzehnte hinweg wurde inzwischen aber Erfahrung angesammelt, die zeigt, dass es "klug", "verantwortungsbewusst" oder "*prudent*" (Rice and Wilbourn,

2000) ist, Stoffe, die sich im Tierversuch eindeutig als karzinogen gezeigt haben auch als karzinogen beim Menschen anzusehen. Diese Erkenntnis hat ihren Niederschlag in einer großen Reihe institutioneller (und rechtlicher) Bewertungsschemata gefunden (IARC-Monographien, z. B. IARC, 2006; EU, 2008; Greim, 1998, 2000; AGS, 2008). Roller et al. (2006) haben gezeigt, dass jedenfalls Inhalationsversuche an Ratten bei Stoffen, für die es relativ klare epidemiologische Daten gibt, tendenziell eher zu einer Risikounter- als Risikoüberschätzung für den Menschen neigen. Auch wenn in den letzten Jahren wieder vermehrt Zweifel an einer "voll umfänglichen" Aussagekraft von Karzinogenitätstests - allerdings nur bei "positiven", d. h. gesundheitlich ungünstigen Ergebnissen - laut geworden sind (Greim, 1998, 2000; Bolt, 2008; AGS, 2008), so haben doch kürzlich die IARC sowie die MAK-Kommission anerkannt, dass die bei Ratten z. B. durch Titandioxid hervorgerufenen Lungentumoren auch für den Menschen einen Bersorgnisanlass darstellen bzw. grundsätzlich relevant sind (Baan, 2007; Greim, 1999; Greim und Ziegler-Skylakakis, 2007; Hartwig, 2009). Geht man deshalb davon aus, dass sich durch Experimente an Rattenlungen nützliche Erkenntnisse hinsichtlich des Lungenkrebsrisikos des Menschen gewinnen lassen, dann lohnt es, eine Karzinogenitätsstudie zum Verlauf der Expositions-Risikobeziehung zu planen.

Nano-GBS wirken krebserzeugend in der Rattenlunge. Das ist bekannt. Unterschiedliche Meinungen gibt es über den Verlauf der Expositions-Risikobeziehung. Während Roller (2008) von einem praktisch linearen Verlauf ohne Schwelle ausgeht, favorisieren andere Autoren einen sublinearen (nach unten durchhängenden) Verlauf bzw. einen Verlauf mit einer Wirkungsschwelle. Erkenntnistheoretisch ist es sehr schwierig bis unmöglich, einen "Negativbeweis" anzutreten bzw. eine Wirkungsschwelle zu beweisen oder zu widerlegen (Kapitel 4, Abschnitte 5.7.1-5.7.3). Mit Hilfe des Konzepts des *inductive behaviour* von J. Neyman (Kapitel 4) ist es aber möglich, wissenschaftlich und empirisch fundierte Aussagen darüber zu machen, ob von einem sublinearen Verlauf ausgegangen werden darf. Ein entsprechendes Experiment ist aber sehr aufwendig. Eine Inhalationsstudie scheidet aufgrund des Aufwands und der Kosten aus. Eine Instillationsstudie müsste bei einer Dosis von 1 mg, verteilt auf 10 Instillationen, also 0,1 mg je Instillation, auch von Vertretern der Overload-These akzeptiert werden.

Bei einer Planung sei von der 19-Stäube-Studie und der Studie von Kolling et al. (2008) ausgegangen. Der am besten untersuchte Nano-GBS ist dort der Industrieruß Printex 90. Die niedrigste Dosis dieses Rußes in der 19-Stäube-Studie waren geplante 7,5 mg, wegen Fehlinstillationen sind ca. 10 mg anzusetzen, dabei wurden 67 % Tiere mit Tumor beobachtet (Tab. 3.20). Rechnet man linear um, dann wären bei einer Dosis von 1 mg ca. 7 % Tiere mit Tumor zu erwarten. In der Studie von Kolling et al. (2008) wurden 5 mg instilliert, es wurden zwei histologische Auswertungen verwendet. Mit der Standardmethode mit 6 Schnitten je Lunge wurden 14,3 % Tiere mit Tumor gefunden, mit einer erweiterten Methodik mit 60 Schnitten je Lunge fand man 42,9 % Tiere mit Tumor. Leider wurden in der Studie von Kolling et al. (2008) so nur die kleine Zahl von 7 Ratten untersucht, auch handelt es sich nicht um den normalen Altersdurchschnitt wie in der 19-Stäube-Studie, sondern um ausgewählt langlebige Tiere. Dieses Verfahren ist dem besonderen Untersuchungsziel des Vergleichs histologischer Methoden geschuldet. Umgerechnet auf 1 mg wären nach der Studie von Kolling et al. (2008) bei Standardhistologie ca. 3 % und bei erweiterter Methodik ca. 8 % Tiere mit Tumor zu erwarten. Diese Zahlen sind eher eine Überschätzung des Lebenszeitrisikos, da bei Kolling et al. (2008) besonders alte Tiere untersucht wurden.

Eine Schnittzahl von 60 Schnitten je Lunge dürfte für eine groß angelegte Studie zu aufwendig sein. Ich schlage daher vor, einen "Mittelweg" zu gehen, die Standardhistologie für einen solchen Versuch zu erweitern, aber nur auf ungefähr das Doppelte, d. h. auf zirka 12 Schnitte je Lunge. Die genaue Zahl und Schnittführung sollte in Absprache mit den Pathologen festgelegt werden. Die Ergebnisse der Studie von Kolling et al. (2008) zeigen im Vergleich mit der 19-Stäube-Studie erwartungsgemäß (Biologie!) eine gewisse Variation, Es ist nicht möglich, das bei 1 mg aufgrund linearer Dosis-Risikobeziehungen erwartete Exzess-Risiko auf 1 % genau anzugeben. Insgesamt dürfte aber die Erwartung eines Exzess-Risikos im Bereich von 3 bis 8 % liegen, ein Exzess-Risiko von 2 % mag ungefähr die Grenze markieren, unterhalb deren nicht von einem linearen, sondern von einem sublinearen Verlauf zu sprechen ist. Setzt man gemäß den Erfahrungen an Wistar-Ratten außerdem ein Hintergrundrisiko von 0,5 % an, dann wäre nach einer Instillation von 1 mg bei weiblichen Wistar-Ratten mindestens mit einem Lebenszeit-Risiko für primäre Lungentumoren von insgesamt 2,5 % zu rechnen. Dies wäre der Fall bei linearen Dosis-Risikobeziehungen im Bereich von ungefähr 2 bis 20 % Risiko bzw. 0,5 bis 10 mg. Es kann nun ein Versuchsdesign berechnet werden, anhand dessen gegen die Hypothese einer linearen Dosis-Risikobeziehung entschieden werden kann.

Üblicherweise werden die Ergebnisse von Karzinogenitätstests mittels Fisher's Exact Test einseitig geprüft, d. h. das Signifikanzniveau wird bei einseitig α = 0.05 bzw. zweiseitig α = 0.10 angesetzt. Wie in Kapitel 4 ausführlich beschrieben muss für das Konzept des inductive behaviour (dem hier explizit, sonst in der regulatorischen Toxikologie in mehr oder weniger konsequenter Weise implizit gefolgt wird) zusätzlich die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art festgelegt werden. Da es um Krebsrisiken geht, erscheint ein Fehler 2. Art von β = 0.20 - wie er als Standard in Lehrbüchern vorgeschlagen wird - hier nicht ausreichend. Gigerenzer et al. (2004) haben für den Fall gesundheitlicher Schädigung einen β -Fehler von 0,001 (0,1 %), d. h. eine Power von 99,9 %, angesetzt. Der Erfinder dieser Art des Testens hat als Standard eine Power von 95 %, d. h. einen β -Fehler von 0,05 genannt (Neyman, 1957). Wir wollen letzterem Vorschlag folgen und definieren β = 0.05. Mit Hilfe der Software Epi Info (Dean et al., 1995) stellt man fest, dass sich mit einem Stichprobenumfang von N_0 = 1.000 und N_1 = 1.000 mit α (zweiseitig) = 0,10 und β = 0,05 bei einem Hintergrundrisiko $P_0 = 0.5$ % Entscheidungen über ein Gesamtrisiko der Exponierten von $P_1 = 2,3 \%$ treffen lassen.

Die Entscheidungsphilosophie ist wie folgt zu begründen. Am Ende des Versuchs wird mittels Fisher's Exact Test mathematisch die Nullhypothese geprüft $P_1 - P_0 = ER = 0$. Die konkrete Alternativhypothese lautet $P_1 - P_0 = ER \ge 2$ %. Ein Exzess-Risiko von 2 % ist zu groß, um es als "vernachlässigbar" oder - mit den Worten von Neyman (1957) - als "*not worth thinking about*" zu betrachten. Daher ist es nicht gerechtfertigt, bei einem nicht-signifikanten Ergebnis zu entscheiden, es bestehe kein Risiko. Ein nicht-signifikantes Ergebnis ist nur in dem Sinne zu interpretieren, dass kein Exzess-Risiko besteht, das mindestens 2 % beträgt, daraus wird der Schluss gezogen, dass die Dosis-Risikobeziehung nicht linear ist. Mit einem statistisch signifikanten Ergebnis ist dagegen in jedem Fall die Hypothese abzulehnen, dass kein Exzess-Risiko bestehe. Es ist dann auch der Schluss zu ziehen, dass das Ergebnis mit der Annah-

me einer linearen Dosis-Risikobeziehung vereinbar ist bzw. dass man sich verhalten sollte, als ob eine lineare Dosis-Risikobeziehung bestünde.

Damit ergibt sich folgendes Versuchsdesign mit den nachgenannten Ergebnismöglichkeiten. Man führe eine Langzeit-Karzinogenitätsstudie mit intratrachealer Instillation an weiblichen Wistar-Ratten durch. Eine Kontrollgruppe von 1.000 Tieren soll 10 Instillationen von je 0,4 mL Trägerlösung je Tier erhalten. Eine Testgruppe von ebenfalls 1.000 Tieren soll 10 Instillationen von je 0,1 mg Ruß Printex 90, suspendiert in 0,4 mL der Trägerlösung je Tier, erhalten. Die Tiere sollen zweieinhalb Jahre lang (130 Wochen) beobachtet werden. Falls ein nicht-signifikantes Ergebnis erhalten wird, dann ist dieses nur aussagekräftig, wenn in keiner der Gruppen der Median der Überlebenszeiten kürzer war als 104 Wochen. Alle Lungen sollen nach einer einheitlichen histologischen Methode von qualifizierten Pathologen untersucht werden, Schnittzahl im Detail noch festzulegen, z. B. bei 12 Schnitten je Lunge. Die Studie sollte im Geist der Guten Laborpraxis (GLP) durchgeführt werden, eine formale Einhaltung der GLP-Bedingungen würde m.E. nur die Kosten erhöhen, ist aber nicht erforderlich.

Mögliche Ergebnisse und ihre Interpretation: Aufgrund der bestehenden Erfahrungen ist folgendes Ergebnis möglich: Kontrollgruppe Tumorhäufigkeit 5 / 1.000, Testgruppe Tumorhäufigkeit 12 / 1.000, p > 0,05, nicht signifikant. In diesem Fall dürfte man entscheiden, dass die Exzess-Tumorhäufigkeit sicherlich kleiner ist als die erwarteten 2 %. Das heißt, nach einem solchen Ergebnis dürfte man "sich verhalten, als ob" die wahre Dosis-Risikobeziehung sublinear wäre. Das heißt nicht, dass damit "bewiesen" wäre, dass die wahre Dosis-Risikobeziehung sublinear ist. Der 95%-Vertrauensbereich von 12 / 10.000 reicht von 0,6 bis 2,1 %. Es wäre erst recht nicht "bewiesen", dass dort eine Wirkungsschwelle ist, aber die Tumorhäufigkeit wäre unter kontrollierten Bedingungen nicht signifikant erhöht und es wäre somit gerechtfertigt, im Sinne einer sublinearen Dosis-Risikobeziehung zu entscheiden. Stattdessen wäre auch folgendes Ergebnis möglich: 7 / 1.000 versus 7 / 1.000. Selbstverständlich wäre auch dieses Ergebnis nicht signifikant. Außerdem läge aber in der Testgruppe ein 95%-Vertrauensbereich bis maximal 1,4 % vor, was zusätzlich die Hypothese einer sublinearen Dosis-Risikobeziehung stützen würde. Bei einem so engen Vertrauensbereich erhielte sogar die These einer Wirkungsschwelle eine gewisse Stützung. Selbstverständlich wäre aber auch folgendes Ergebnis denkbar: 5 / 1.000 versus 15 / 1.000, p < 0,05. Dieses Ergebnis wäre statistisch signifikant, daraus wäre zu schließen, dass man "sich so verhalten sollte, als ob" eine lineare Dosis-Risikobeziehung bestünde.

Falls es gelingen sollte, einen solchen Versuch ohne Störung zu Ende zu führen, wären daher die Chancen gut, in jedem Fall eine nützliche Information hinsichtlich der Bewertung der Dosis-Risikobeziehungen von Nano-GBS zu erhalten. Der Versuch wäre sehr aufwendig, er übersteigt in seinem Aufwand grundsätzlich aber *nicht* die 19-Stäube-Studie, in der mehr als 2.000 Ratten eingesetzt wurden. Hinsichtlich der Staubcharakterisierung ergibt sich z. B. ein erheblich geringerer Aufwand als in der 19-Stäube-Studie. Ein erhöhter Aufwand ergibt sich in dem beschriebenen Versuchsdesign allenfalls in der Histologie, wobei aber wegen der geringen Dosis nur ein relativ kleines Spektrum an Veränderungen in niedriger Inzidenz zu erwarten ist. Der öffentlich finanzierte Anteil am Etat des NanoCare-Projekts wurde im Bereich von 5 Millionen Euro angesetzt, die vorgeschlagene Studie müsste mit einem geringeren Etat zu bezahlen sein. Wichtig wäre es, auf zusätzliche Untersuchungen, etwa
an Satellitengruppen oder vorzeitig getöteten Tieren, zu *verzichten*. Erfahrungsgemäß verkleinern solche Untersuchungen letztlich doch das Material, das für die eigentliche Fragestellung zur Verfügung steht. Die Gruppengrößen von 1.000 Tieren sind aber das Minimum für eine solche Fragestellung. Würde man die Power nur von 95 auf 99 % erhöhen, dann wären bereits 1.400 Tiere je Gruppe erforderlich; würde man außerdem ein ER von 1 % als kritisch für diese Frage ansehen, dann wären zirka 4.000 Tiere je Gruppe erforderlich. Bei dem Versuchsdesign mit insgesamt 2.000 Ratten wäre es auch hinnehmbar, den Versuch z. B. auf zwei Staffeln aufzuteilen mit je 500 Tieren je Gruppe und Staffel, vorausgesetzt die Tiere würden aus derselben Zucht bezogen. Es ist allerdings fraglich, ob es in Deutschland noch Institute gibt, die willens und in der Lage wären, eine so große Karzinogenitätsstudie durchzuführen, ohne Aussicht auf mehrere Publikationen bzw. mit gegebenenfalls nur einer einzigen Veröffentlichung und dieser erst 3 Jahre nach Beginn der Studie.

5.5.2 Sonstige Fragestellungen

Unabhängig von der in Abschnitt 5.5.1 beschriebenen Fragestellung besteht die Frage nach der Wirkung von Bariumsulfat (BaSO₄). Im NanoCare-Projekt wurde überraschend eine deutlich geringere Wirkung von BaSO₄-Partikeln im Vergleich mit anderen Partikeln, z. B. TiO₂, festgestellt (Kuhlbusch et al., 2009). Sollte dieser Befund in einem Langzeit-Tierversuch bestätigt werden, dann könnte damit die GBS-These bzw. das Modell des allgemeinen Partikeleffekts (wie bei Greim und Ziegler-Skylakakis, 2007; Roller, 2008; Hartwig, 2009) in Frage gestellt sein. Bevor allerdings diesbezüglich weit reichende Schlüsse gezogen werden, müsste es sich in einem Langzeit-Versuch an der Rattenlunge bestätigen, dass es Partikel gibt, die wesentlich geringere Effekte hervorrufen als die bisher untersuchten GBS.

An dieser Stelle sei noch ein Hinweis auf weitere Fragestellungen gegeben, die zwar nicht direkt GBS betreffen, die aber unter dem Thema zu planender Studien zu erwähnen sind. Der erste dieser Gesichtspunkte betrifft hydrophobiertes TiO₂. Es war gewissermaßen ein Seitenbefund der 19-Stäube-Studie, dass überraschend akute Toxizität eines hydrophobierten TiO₂-Nanomaterials festgestellt wurde (Pott et al., 1998a,b; Roller, 2008). Meines Wissens hatte dieser Befund bisher weder praktische Konsequenzen für den Arbeitsschutz noch wurden die Gründe bzw. Zusammenhänge dieser Toxizität bisher hinreichend geklärt.

Des weiteren bestehen erhebliche Verdachtsmomente hinsichtlich spezifischer Toxizität von Partikeln aus aluminiumhaltigen Stoffen. Die Aluminium-Nanomaterialien, die in der 19-Stäube-Studie geprüft wurden, waren bei der makroskopischen Befunderhebung mit einem besonderen Erscheinungsbild der Lungen - einer fast gummiartigen Konsistenz - asoziiert, die bei keinem anderen Staub auffiel. Bei Bellmann et al. (2006) ist eine nähere histologische Analyse der Fibrose beschrieben, mit folgendem zusammenfassenden Ergebnis: *"Der aufgrund makroskopischer Befunde entstandene Verdacht auf eine chronische spezifische lungentoxische Wirkung von Aluminiumoxidstaub wurde histologisch bestätigt."* Meines Wissens haben die bisherigen Erkenntnisse über die spezifische Toxizität allerdings keine besonderen Folgen in der regulatorischen Toxikologie bewirkt. Auch diesem Gesichtspunkt sollte zumindest - z. B. mit Blick auf Dosis-Wirkungsbeziehungen - in gezielten Versuchen nachgegangen werden. Dasselbe gilt auch für ceriumhaltige Stäube, weil CeO₂-Partikel im NanoCare-Projekt besondere Zytotoxizität gezeigt haben. Schließlich sollte noch der Frage nach der kanzerogenen Potenz von ultrafeinem amorphen Siliziumdioxid nach Inhalation nachgegangen werden. Ultrafeines amorphes Siliziumdioxid wurde sowohl in der 19-Stäube-Studie als auch in der Studie von Kolling et al. (2008) mittels intratrachealer Instillation auf Kanzerogenität geprüft (Tab. 3.20). Das geprüfte amorphe SiO₂ ist nicht als GBS zu betrachten, die Bio-Beständigkeit ist geringer als bei TiO₂ und es hat sich signifikante spezifische Toxizität gezeigt. Für eine aktuelle Bewertung der karzinogenen Potenz erscheint der Versuch von Kolling et al. (2008) besser geeignet (Tab. 3.23). Die Gesamtdosis war bei Kolling et al. (2008) niedriger, dennoch war die Tumorhäufigkeit (mit normaler Schnittzahl) höher. Dies dürfte damit zusammenhängen, dass die Gesamtdosis auf eine größere Zahl von Einzelinstillationen (30 versus 10) verteilt war. Vermutlich war dadurch im Zusammenhang mit der Löslichkeit die wirksame Langzeit-Dosis höher. Falls diese Annahme zutrifft, dann wäre nach Inhalation (mit einer "zeitlich noch gleichmäßiger verteilten Gesamtdosis") mit einer eher höheren Wirkungsstärke zu rechnen. Dies sollte mittels Inhalationsversuch überprüft werden.

5.6 Welche In-vitro-Gentoxizitätstests mit Nanomaterialien können durchgeführt werden, um genauere Informationen zur Prädiktivität in Relation zu Karzinogenitätsversuchen zu erhalten?

Es ist nur dann sinnvoll, einen Tierversuch wie den in Abschnitt 5.5.1 beschriebenen oder einen ähnlichen zu planen, wenn man aus solchen Tierversuchen grundsätzlich nützliche Informationen hinsichtlich des Risikos beim Menschen erwartet. Ebenso ist es nur sinnvoll, eine In-vitro-Studie wie die nachfolgend beschriebene oder eine ähnliche zu planen, wenn man die Aussagekraft der Tierversuche anerkennt. Wenn man dies nicht tut, sondern im wesentlichen den Argumentationen von Abbott (2005), Gold et al. (2008) und Kirkland et al. (2007a,b) folgt, dann wäre die Grundlage, auf der bisher die regulatorische Toxikologie stand, derartig erschüttert, dass man letztlich sagen müsste "*Nichts geht mehr"*. Das halte ich jedoch für unbegründet, da die genannten "Argumentationen" insgesamt nicht schlüssig sind. Deshalb skizziere ich nachfolgend eine In-vitro-Studie, die zu einer Validierung von In-vitro-Gentoxizitätstests für "Fasern und Stäube" in Relation zu Langzeit-Karzinogenitätsversuchen beitragen kann.

Ausgangspunkt der Überlegungen ist die Feststellung aus dem aktuellen Projekt, dass die Ergebnisse von In-vitro-Gentoxizitätstests über alle Studien hinweg nicht gut mit In-vivo-Daten korrelieren, dass jedoch einzelne Studien recht gute Korrelationen zeigen. Das Design, die Durchführung und die Auswertung in einzelnen Studien waren sehr unterschiedlich, zum Teil wurde nur ein bestimmter Partikeltyp geprüft, so dass die Vergleichsmöglichkeit bzw. eine Abschätzung der relativen Wirkungsstärke zu anderen Partikelarten fehlt. Eine sinnvolle Abschätzung der Prädiktivität von Invitro-Gentoxizitätstests erscheint deshalb nur möglich, wenn innerhalb eines einheitlichen Designs ganz verschiedene Partikelarten geprüft und miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse einer solchen, neuen Studie sollten dann mit den Erfahrungen zur karzinogenen Potenz dieser Partikelarten in vivo verglichen werden. Bei der Staubauswahl sind sicherlich mehrere Varianten möglich, ich führe nachfolgend ein mögliches Beispiel auf und ordne die Staubarten gleichzeitig den Potenzklassen gemäß Tab. 3.25 zu. Staubarten mit vermutlich der höchsten Wirkungsstärke, Potenzklasse 3: Amphibolasbest (z. B. Krokydolith oder Amosit) - dünne, kristalline Keramikfasern (Whiskers) - Quarz - Ni (elementar) UF - Ni (elementar) F

Staubarten der Potenzklasse 2: GaAs UF oder V₂O₅ UF - GaAs F oder V₂O₅ F / NiO UF - NiO F - Stein- oder Glasfasern (mittlerer Durchmesser ca. 1 µm) - Dieselruß - TiO₂ UF / ZrO₂ UF / Carbon Black UF

Staubarten der Potenzklasse 1: Ti O_2 F / Zr O_2 F / Carbon Black F

Bei Stäuben wie GaAs und V₂O₅ ist nicht genau absehbar, wie sich bei einzelnen Proben die Wirkungsstärke darstellen wird. Auch sind die Reihenfolgen der Wirkungsstärken in den Gruppen generell nicht sicher vorhersehbar. Wichtig scheinen jedoch bestimmte Gesichtspunkte: Es sollten spezifisch toxische Stäube im Vergleich mit GBS geprüft werden. Die spezifische Toxizität sollte sich dabei sowohl in der Fasergestalt als auch im Potential der Freisetzung toxischer Ionen bzw. entsprechenden Oberflächeneigenschaften vermuten lassen. Es sollten sowohl ultrafeine (UF) als auch nicht-ultrafeine (feine, F) Stäube untersucht werden, und im Ergebnis sollten die ultrafeinen stärker wirksam sein als die feine Variante des chemisch gleichen Stoffs. Im Ergebnis sollte auch geprüft werden, ob bei GBS die These bestätigt werden kann, dass neben der Partikelgröße das Volumen das bessere Dosismaß darstellt als die Partikelmasse. Es geht bei einer solchen Studie nicht um die Frage "Effekt oder kein Effekt", sondern bei all den aufgeführten Stäuben ist grundsätzlich mit einem Effekt zu rechnen, gemäß In-vivo-Information ist aber mit erheblichen Unterschieden in der Wirkungsstärke zu rechnen, diese sollten sich in vitro wiederfinden lassen (falls die Unterschiede auf der Wirkung je Zelle beruhen; die Frage, inwieweit die Verteilung der Partikel im Gewebe in vivo eine Rolle spielt, mag anschließend untersucht werden).

Da in einem solchen Versuch notwendigerweise viele verschiedene Stäube untersucht werden müssen, ist das Spektrum untersuchter Parameter zu begrenzen. Mein Vorschlag ist, den Mikrokern-Test und den Comet-Assay zu verwenden, da dies gut eingeführte und verbreitete Tests sind. Dies ist nur als eine mögliche Variante zu verstehen; sollte ein Labor über ein neues Prüfmodell und begründete Anhaltspunkte für dessen Aussagekraft verfügen, dann spricht nichts dagegen, ein solches neues Modell zu prüfen. Ein Zytotoxizitätstest wie der MTT-Assay sollte mitgeführt werden. Auch die Zahl der eingesetzten Zellarten sollte gezielt ausgewählt und begrenzt werden. In einem solchen Versuch müssen je Staub mehrere Dosen verwendet werden. Es ist aber nicht notwendig, für jeden einzelnen Staub das gesamte Dosisspektrum einzusetzen, vielmehr ist damit zu rechnen, dass Asbest eine höhere Wirkungsstärke hat als TiO₂, so dass sich mit Asbest mit niedrigeren Dosen Effekte finden lassen müssten als mit TiO₂. Dazu sind gegebenenfalls Vorversuche "range finding study" erforderlich. Am Ende sollte aber eine in sich geschlossene Studie vorliegen mit den Ergebnissen mindestens je eines Parameters der Gentoxizität und der Zytotoxizität für jeden von zirka 15 - 20 Stäuben, die unter gleichen In-vitro-Versuchsbedingungen geprüft und ausgewertet wurden und sich mit den vorliegenden In-vivo-Daten (z. B. hier Tab. 3.21-3.25) vergleichen lassen. Sofern es sich um bekannte Staubarten, wie z. B. UICC-Krokydolithasbest, Quarz DQ12, TiO₂ P25 o.ä. handelt, kann sich auch die "Charakterisierung" dieser Proben darauf beschränken, anhand verlässlicher Quellen angeben zu können, dass es sich um "UICC-Krokydolithasbest", "dünne Keramikfasern", "DQ12", "GBS mit Primärpartikelgrößen unterhalb 50 nm" usw. handelt. Eine intensive Charakterisierung mit Angabe z. B. von Zeta-Potential oder anderen Oberflächeneigenschaften erscheint für ein solches "auf Empirie" gerichtetes Design nicht erforderlich. Unabhängig davon, wie intensiv die Proben "charakterisiert" wurden, konnte in den Analysen für diesen Bericht anhand der In-vitro-Ergebnisse - auch unter Einbeziehung der als besonders intensiv charakterisiert hervorgehobenen Proben des NanoCare-Projekts - kein besonders guter Zusammenhang mit bestimmten Partikeleigenschaften herausgestellt werden (Tab. 3.87-3.88, 3.91). Wenn sich zukünftig klare und plausible Unterschiede in den Wirkungsstärken zeigen, dann kann die Suche nach möglichen Ursachen solcher Unterschiede in Zellkulturversuchen durch gezielte Analyse einzelner definierter Partikeleigenschaften intensiviert werden.

5.7 Blick auf Nanomaterialien im Zusammenhang von In-vivo- und In-vitro-Informationen

5.7.1 Allgemeines

Sind Nanomaterialien toxisch? Diese Frage ist fast so allgemein, als würde man fragen "Sind chemische Stoffe toxisch?". Nanopartikel und Nanomaterialien sind neu geschaffene Oberbegriffe für unterschiedliche chemische Stoffe. Die Bildung dieser Begriffe hat sicherlich sinnvolle Diskussionen und Forschungen stimuliert, sie hat aber auch Verwirrung gestiftet. Dies mag zumindest zum Teil darauf beruhen, dass die Begriffe sowohl auf lange bekannte, sehr gut untersuchte als auch auf tatsächlich relativ neue Stoffe mit teilweise unbekannten Eigenschaften zutreffen. Daher ist es nicht verständlich, wenn generalisierte Aussagen gemacht werden, man wisse über Nanomaterialien nur sehr wenig und es ginge vor allem darum, unbekannten Risiken vorzubeugen. Es gibt z. B. Nanomaterialien aus Nickel und aus Cadmium- und Arsenverbindungen. Nickel, Cadmium und Arsen sind bekannte toxische Stoffe, für die es zum Teil sehr detaillierte (rechtliche) Bestimmungen gibt. Es ist kein Grund erkennbar, weshalb nicht die bestehenden toxikologischen Erkenntnisse und Umgangsbestimmungen auch auf Nanomaterialien aus diesen Stoffen (gegebenenfalls als Mindeststandard) angewendet werden sollten. Es ist aber wohl so, dass der größte Teil der wirtschaftlich bedeutenden Nanomaterialien aus weniger toxischen Stoffen besteht, insbesondere aus amorphem Siliziumdioxid (Aerosil®), aus elementarem Kohlenstoff (Carbon black, Industrieruß) und Titandioxid (bzw. nach dem Aerosil®-Verfahren hergestellte pyrogene Metalloxide).

Wenn über die Toxikologie der zuletzt genannten beiden Stoffe bzw. Stoffgruppen -Industrieruß und ultrafeines pyrogenes Titandioxid - und über ähnliche Stoffe gesprochen wird, erscheint deshalb häufig ein eigener Begriff angezeigt. Weiter oben wurde hierzu der Begriff **Nano-GBS** vorgeschlagen als Abkürzung für *Nanomaterialien in Form von granulären biobeständigen Stäuben ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität*. Im Folgenden soll nur von Nano-GBS die Rede sein. Nach meiner festen Überzeugung ist die Bildung einer solchen eigenen Stoffgruppe gerechtfertigt, denn die Datenlage aus Langzeit-Tierversuchen ist so dicht, dass es gut begründet ist anzunehmen, dass GBS jeder Art bei geeigneter Dosierung im Inhalationsversuch an Ratten eine erhöhte Lungentumorhäufigkeit erkennen lassen. Dies wird auch übereinstimmend von Vertretern ansonsten unterschiedlicher Interpretationsrichtungen so gesehen (Nikula et al., 1995; Oberdörster, 2002; Hesterberg et al., 2005; Roller, 2008, 2009, 2010; Hartwig, 2009). Unterschiede in der Interpretation bestehen nun aber darin, ob man diese Lungentumor induzierende Wirkung von GBS im allgemeinen und auch von GBS mit besonders kleinen Primärpartikeldurchmessern, also von Nano-GBS, in der Rattenlunge als relevant für den Menschen (auch bei niedrigen Expositionen) erachtet oder als so etwas wie **Overload** einstuft. Und **hier liegt das wesentliche Problem**. Zur Erläuterung der unterschiedlichen Interpretationsrichtungen und ihren Einfluss auf die Bewertung der Prädiktivität der In-vitro-Daten seien hier nochmals prägnant die Beobachtungen aus verschiedenen empirischen Untersuchungen in Form von drei Punkten zusammengefasst.

- Epidemiologische Untersuchungen an beruflich gegenüber Dieselmotoremissionen exponierten Beschäftigten haben ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko erkennen lassen. Mehrere Autoren und Institutionen haben die Evidenz im Sinne eines *ursächlichen* Zusammenhangs des Lungenkrebsrisikos mit der Exposition interpretiert. Epidemiologische Studien zu synthetischen Nano-GBS sind nicht aussagekräftig.
- Karzinogenitätsversuche mit Ratten haben mit verschiedenen Nano-GBS eindeutig Induktion von Lungentumoren nachgewiesen. Dosisbezogen war die Wirkung ungefähr genauso groß wie mit Dieselruß oder stärker als mit Dieselruß. Gefilterte Dieselmotoremissionen (ohne Partikelanteil) haben nicht zu erhöhten Lungentumorhäufigkeiten bei Ratten geführt.
- 3. Für alle hier anhand von Zeitschriftenpublikationen ausgewerteten Gruppen von Nanomaterialien (einschließlich Nano-GBS) liegen Effektbefunde aus In-vitro-Gentoxizitätstests vor.

Diese Punkte sind als Fakten zu bezeichnen. Diese Fakten lassen sich - wie bei wissenschaftlichen Daten üblich - auf unterschiedliche Weise interpretieren. Ich möchte die Interpretationsvielfalt hier auf zwei extrem gegensätzliche Grundpositionen begrenzen, welche die Gesamtproblematik umspannen:

A Die Sensitivität von In-vitro-Gentoxizitätstests zur Erkennung einer krebserzeugenden Wirkung von Nano-GBS ist begrenzt (durchschnittlich derzeit zirka 50 %). Die Spezifität lässt sich nicht ermitteln, weil keine geeigneten In-vivo-Daten vorliegen, welche eine krebserzeugende Wirkung hinreichend sicher ausschließen (entweder liegen positive Karzinogenitätsbefunde vor oder die Stoffe wurden nicht adäquat untersucht).

Gegensatz dazu:

B Epidemiologische Untersuchungen zum stoffbedingten Krebsrisiko, In-vivo-Karzinogenitätsversuche und In-vitro-Gentoxizitätstests besitzen nur geringe Aussagekraft zur Bewertung des Krebsrisikos des Menschen unter heutigen Expositionsbedingungen.

Zwischen diesen "Extremen" gibt es sicherlich viele Zwischenpositionen. Position A ist die Antwort auf die Frage nach der Prädiktivität von In-vitro-Gentoxizitätstests unter der Voraussetzung, dass die vorliegende empirische Evidenz für Karzinogenität von Nano-GBS anerkannt wird. Position B ist zugespitzt formuliert. In einem weiteren Sinne ist sie auf ganz verschiedene anorganische Stoffe anwendbar, also auch auf faserförmige Stäube und als krebserzeugend eingestufte Metallverbindungen. So werden die **formal statistisch positiven epidemiologischen** Befunde mit Mineral-wollen, Dieselruß, Nickel-, Chrom- und Cadmiumverbindungen für heutige Expositi-

onsverhältnisse teilweise nicht anerkannt, weil entweder die zusätzlich zur statistischen Signifikanz zur Anerkennung eines Kausalzusammenhangs für erforderlich gehaltene Evidenz angeblich nicht ausreicht oder weil die früher höheren Expositionskonzentrationen eine Extrapolation auf heutige niedrigere Expositionskonzentrationen angeblich nicht zulassen (siehe Roller et al., 2006; Roller, 2010). In Abschnitt 5.4 habe ich erläutert, dass auch für Chrysotilasbest inzwischen die epidemiologischen Daten von manchen Autoren als Beleg für die Möglichkeit eines "sicheren Umgangs" mit dem Stoff interpretiert werden. Position B ist sicherlich für Nano-GBS von besonderer Bedeutung. Position B muss hier diskutiert werden, weil entsprechende Einschätzungen - in unterschiedlichem Grad der Verallgemeinerung - veröffentlicht sind. Zum Teil sind die Aussagen nicht so prägnant wie hier in der Position B formuliert, aber konsequent weitergedacht führen auch solche "gemilderten" Bewertungen letztlich zu der Position B. Gold et al. (2008) haben die pauschalisierte Aussage veröffentlicht, Karzinogenitätsversuche an Ratten und Mäusen hätten keinen großen Nutzen. Wörtlich heißt es dort als conclusion: "The chronic, high dose rodent cancer test is not much use in understanding human cancer risk. Tumor development is likely due to high dose effects or processes that are not relevant to humans". Hier wird eine generell hohe Wahrscheinlichkeit ausgedrückt, dass die Tumoren in Karzinogenitätstests so etwas wie ein Artefakt durch (zu) hohe Dosierung sein können. Bereis in den einleitenden Abschnitten habe ich darauf hingewiesen, dass sich solche Einschätzungen auch in der sehr renommierten Zeitschrift Nature finden, indem es dort heißt, die Karzinogenitätsversuche seien "simply bad science" (Abbott, 2005). Dies wurde im Bereich der Nanokommission der Bundesregierung aufgegriffen, indem unter Zitierung der Arbeit von Abbott (2005) behauptet wurde, es sei "allgemein akzeptiert, dass Tierversuche in Bezug auf die Wirkung beim Menschen nur begrenzt aussagefähig sind" (Krug et al. 2007). Andere Autoren formulieren dies nicht so generell. Aber das Schlagwort des Overload ist in Veröffentlichungen speziell zu Tierversuchen mit GBS relativ häufig (Oberdörster, 1995, 2002; Driscoll, 1996; Hesterberg et al., 2005). Die Grenze zur Überladungssituation der Rattenlunge wurde in der Begründung des Allgemeinen Staubgrenzwerts der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bei zirka 1 µL Staub je Gramm Rattenlunge angesetzt. Daraus wurde ein Staubgrenzwert in Höhe von 1,5 mg/m³ berechnet (Greim, 1997). Auch die Autoren der Berichte des NanoCare-Projekts beziehen sich auf die Overload-These (Kuhlbusch et al., 2009; Abschnitt 3.2.3.2).

Wenn wir uns hier mit der Prädiktivität von In-vitro-Untersuchungen an biobeständigen Partikeln befassen, dann ist es naheliegend, die Aussagekraft von entsprechenden In-vitro-Untersuchungen an organischen Chemikalien zu betrachten. Hierzu gibt es sehr umfangreiche Publikationen. So hat z. B. eine Arbeitsgruppe die Prädiktivität von In-vitro-Gentoxizitätstests im Hinblick auf den gesetzlich vorgeschriebenen Ersatz von Tierversuchen zur Testung von Kosmetika untersucht. In den Publikationen (rund 300 Seiten in der renommierten Zeitschrift Mutation Research) kommen Kirkland et al. (2005, 2007a,b) zu dem Ergebnis, dass insbesondere die Häufigkeit falsch positiver Ergebnisse in Relation zu Karzinogenitätstests zu beklagen ist, also mangelnde Spezifität. Kirkland et al. (2007a) schrieben: "When the standard battery of two or three in vitro genotoxicity tests was performed, at least 80% of the 177 noncarcinogenic compounds tested gave a false positive result in at least one test." Anders ausgedrückt: Die Spezifität dieser In-vitro-Tests liegt demnach bei weniger als 20 %! Die Arbeiten von Kirkland et al. (2007a,b) haben bereits Eingang in den "amtlichen" Leitfaden des AGS (2008) zur Quantifizierung von Krebsrisikozahlen gefunden, indem es dort heißt: "Bei der Bewertung von Gentoxizitätstests ist zu bedenken,

330

dass bis zu 80 Prozent der Stoffe, die negativ in Karzinogenitätstests an Nagern sind, in einem oder mehreren In-vitro-Tests positiv sind. Dies betrifft vor allem Chromosomenaberrationstests, Mikrokerntests und den Maus-Lymphom-Test. Hierfür gibt es in Abhängigkeit vom verwendeten Testsystem und von der Substanzklasse zahlreiche Gründe, die die Übertragbarkeit der In-vitro-Ergebnisse auf die In-vivo-Situation nicht gestatten und von denen einige beispielhaft aufgeführt werden: - Verwendung hoher Konzentrationen, die metabolische Detoxifizierungsmechanismen überlasten, - im Testsystem fehlende Phase-II-Enzyme und deren Kofaktoren, - Testsystem mit DNA-Reparatur-Defizienz (alle Salmonella-Stämme und E. coli), - Testsystem ohne oder mit anomaler Expression von p53-Protein (CHO-Zellen, L5178Y-Zellen, V79-Zellen), - Effekte mit Schwelle, die in vivo nicht erreicht wird: Aneuploidie, Hemmung der DNA-Polymerase, der Topoisomerasen oder Kinasen, Zytotoxizität, pH-Wert-Änderung".

Dies bedeutet, dass hier Gentoxizitätsbefunde aus einem großen Teil der üblichen In-vitro-Gentoxizitätstests einschließlich der Standard-Tests wie Ames-Test (DNA-Reparatur-Defizienz der S.typhimurium- und E.coli-Stämme) und Maus-Lymphom-Test (anormale p53-Expression bei L5178Y-Zellen) als nicht aussagefähig zu beurteilen wären, weil sie "die Übertragbarkeit der In-vitro-Ergebnisse auf die In-vivo-Situation nicht gestatten". Ames-Test, Chromosomenaberrationstests, Mikrokerntests und Maus-Lymphom-Test sind häufig verwendete Tests; wenn deren Ergebnisse eine Übertragbarkeit auf die In-vivo-Situation nicht gestatten, dann ist damit generell die Aussagekraft von In-vitro-Gentoxizitätstests stark in Frage gestellt. Insofern erscheint es folgerichtig, wenn Kirkland et al. (2007b) einen Wunsch nach radikal neuen In-vitro-Verfahren zum Ausdruck bringen und damit eine Einschätzung der bisherigen fast als wertlos nahelegen: "Finally, the future of in vitro testing may lie with radically new assays rather than supplementary investigations to interpret the relevance of results from existing assays. If new assays with improved prediction of human hazard were available, there would be fewer in vitro positive results to investiaate."

Angenommen man wäre überzeugt davon, dass Langzeit-Inhalationsversuche an Ratten zumindest bei Expositionshöhen oberhalb der postulierten Grenze zum Overload nicht relevant seien und dass außerdem die üblichen In-vitro-Gentoxizitätstests die Übertragung auf die In-vivo-Situation nicht gestatten, dann mag scheinbar die Möglichkeit von Inhalationsversuchen mit Expositionskonzentrationen kleiner gleich 1,5 mg/m³ (Greim, 1997; s.o.) und von epidemiologischen Studien verbleiben, um aussagefähige Informationen zu gewinnen. Zum Verständnis der Gesamtargumentation sind die realistischen Möglichkeiten zu beleuchten, mit solchen Ansätzen überhaupt statistisch belastbare Aussagen zu erzielen. Für den Bericht zu dem BAuA-Forschungsprojekt F2083 habe ich berechnet, dass für ultrafeine GBS (= Nano-GBS) bei Ratten ein Lungentumorrisiko in Höhe von 0,17 % nach einer zweijährigen inhalativen Exposition in Höhe von 100 μ g/m³ zu erwarten ist (Roller, 2008). Dies ist eine Extrapolation ausgehend von den experimentell verwendeten höheren Expositionskonzentrationen. Setzt man - der Bewertung der DFG folgend - die "Überladungsgrenze" entsprechend einer Langzeitkonzentration von 1.5 mg/m³ an, dann wäre ein Inhalationsversuch mit maximal dieser Exposition von **1,5 mg/m³** durchzuführen, um den so genannten Overload nicht zu überschreiten. Nach den bei Roller (2008) dokumentierten Erfahrungen mit den Langzeitversuchen an Ratten wäre dabei für Nano-GBS ein expositionsbedingtes Lungentumorrisiko in Höhe von 2,5 % zu erwarten. Es ist in den Abschnitten 4.6 und 5.4 ausführlich dargelegt, dass ein Lungentumorrisiko in dieser Höhe weder in realistischen epidemiologischen Studien noch in üblichen Langzeit-Inhalationsversuchen "empirisch zugänglich" ist. Das Risiko ist zu niedrig, um mit üblichen Tiergruppen (Stichprobenumfängen) ein signifikantes Ergebnis erwarten zu dürfen, das Risiko ist aber gleichzeitig viel zu hoch, um es als gesundheitlich unbedenklich ignorieren zu dürfen. Möglichkeiten und Grenzen eines außergewöhnlichen Versuchsdesigns sind in Abschnitt 5.5.1 beschrieben.

Daraus folgt: Wenn die Überzeugung postuliert wird, das Wirkprinzip der Entstehung der Lungentumoren bei Ratten nach GBS-Exposition sei hinreichend klar und es handele sich um einen Überladungseffekt, der für den Menschen nicht relevant sei, dann lässt sich diese Aussage durch Langzeit-Tierversuche empirisch letztlich überhaupt nicht widerlegen - unabhängig davon, ob die Aussage tatsächlich zutrifft oder nicht. Dies ist nicht im Vorhandensein oder Fehlen einer Karzinogenität der GBS begründet, sondern in den unüberwindbaren Grenzen naturwissenschaftlicher Methoden bzw. Erkenntnismöglichkeiten.

5.7.2 Position der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)

An dieser Stelle sei noch auf eine neuere Position der MAK-Kommission der DFG eingegangen, die in der Publikation von Greim und Ziegler-Skylakakis (2007) und der MAK-Begründung zur einatembaren Fraktion von Titandioxid (Hartwig, 2009) zum Ausdruck kommt. Diese Position ist irgendwo zwischen den "Extremen"

• "(Nano-)GBS-Stäube als krebserzeugend anzusehen"

und

• "alle empirischen Hinweise auf Karzinogenität von (Nano-)GBS irrelevant"

angesiedelt. Sie lässt sich vielleicht kurz so charakterisieren:

• GBS sind als krebserzeugend nach Inhalation beim Menschen anzusehen, aber nur oberhalb des MAK-Wertes.

Bei Greim und Ziegler-Skylakakis (2007) heißt es: "Since induction of inflammation is seen as the underlying mechanism, the commission is presently evaluating the parameters that indicate an inflammatory response of the airway system in order to identify a no-observed-adverse-exposure level (NOAEL), which can then be used to establish an MAK value. In this case biopersistent granular particles would be classified in Category 4, for carcinogenic substances for which genotoxic effects play no or at most a minor part. Provided the MAK value is observed, no significant contribution to human cancer is expected." Eine MAK-Begründung für GBS oder Nano-GBS auf dieser Grundlage liegt noch nicht vor, jedoch eine MAK-Begründung für die einatembare Fraktion von Titandioxid, dabei sind auch Daten zu ultrafeinem TiO₂ (d. h. Nanomaterial) aufgeführt, z. B. der Kanzerogenitätsversuch von Heinrich et al. (1995), ultrafeine Partikel sind aber von der Bewertung ausgenommen (DFG, 2009; Hartwig, 2009). Bei Hartwig (2009) heißt es, dass bisher keine NOAEC aus den vorliegenden Tierexperimenten ermittelt werden konnte, und bezüglich eines möglichen zukünftigen Grenzwertes wird auf die Begründung "Granuläre bio-beständige Stäube" ("in Vorbereitung") verwiesen. TiO₂ (einatembare Fraktion, ausgenommen ultrafeine Partikel) wurde dabei in die MAK-Kategorie 3A eingestuft. Die derzeitige MAK-

Position zu (feinem) TiO₂ ist daher insgesamt etwa folgendermaßen zu präzisieren: GBS sind als krebserzeugend nach Inhalation beim Menschen anzusehen, aber nur oberhalb des MAK-Wertes - da jedoch derzeit kein MAK-Wert beziffert werden kann, ist (feines) TiO₂ vorerst nur als Stoff anzusehen, der wegen erwiesener oder möglicher krebserzeugender Wirkung Anlass zur Besorgnis gibt, aber aufgrund unzureichender Informationen nicht endgültig beurteilt werden kann. Der Leser bleibt dabei allein mit der Frage: "Was heißt das?"

Um diese Bewertung von TiO₂ bzw. von GBS durch die MAK-Kommission - und auch deren Bewertung von In-vitro-Daten - besser zu verstehen, muss man die Bearündung von Hartwig (2009) näher betrachten. Eine große Rolle spielt dort der so genannte Wirkungsmechanismus. Ein Kapitel mit der Überschrift "Wirkungsmechanismus" erstreckt sich über 8 Seiten. Darin finden sich Sätze wie z. B. "Die "macrophage scavenger receptors" (Beispiel: der Makrophagen-Rezeptor mit kollagener Struktur, "MARCO", sowie dessen Splice-Variante CD204) (Arredouani et al. 2004; Hamilton et al. 2006; Palecanca et al. 1999) sind für polyanionische Komplexe zuständig, Opsonin-abhängige Rezeptoren (Fcy, CR3) nehmen Partikel erst nach deren Ummantelung mit Opsoninen (Fibronektin, Immunoglobuline) auf (Churg 2003; Conner und Schmid 2003; Kwiatkowska und Sobota 1999)" oder "TNF- α wird eine übergeordnete Rolle zugeschrieben, denn dieser Faktor induziert die Expression weiterer Effektoren. Dazu gehören das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1). Letzteres ordnet sich auf der Zytoplasma-Membran der in Reichweite liegenden Endothelzellen an, so dass Monozyten und Granulozyten des Blutstroms an den Kaplillarwänden verlangsamt ("eingefangen") werden und durch Poren des Endothels in das "anfordernde" Gewebe hinübertreten. Dort werden sie durch TNF- α aktiviert (Driscoll 2000; Driscoll et al. 1995b)". Durch solche Ausführungen (über 8 Seiten) kann der Eindruck entstehen, man wisse sehr viel über die Wirkungen und die Wirkungsweise von GBS in der Lunge. Es kann durch diesen Anschein von Wissen dann auch der Eindruck entstehen, der letzte Satz dieser Ausführungen sei die logische Folge aus diesem Wissen oder das bestehende Wissen begründe sachlich oder "wissenschaftlich" diese Schlussfolgerung, die lautet (S. 53): "Insgesamt zeigt der Wirkungsmechanismus von Titandioxid, dass es eine Partikelbelastung der Lunge gibt, unterhalb derer die exponierten Zellen der Alveolen und Bronchien weder geschädigt werden noch eine oxidative Reaktion zeigen, die geeignet ist, Makrophagen und Leukozyten in größerer Zahl herbeizuziehen und zu aktivieren."

Tatsächlich enthält das Kapitel zum Wirkungsmechanismus bei Hartwig (2009) keine unmittelbar logische oder zwingende Begründung, dass es eine Partikelbelastung geben muss, unterhalb derer die exponierten Zellen nicht geschädigt werden. Da es um ein Krebsrisiko geht, ist unter "Schädigung" nicht nur eine solche Schädigung zu verstehen, die messbar oder verbunden mit einer Funktionsstörung den Organismus unmittelbar beeinträchtigt, sondern jede auch kleine Veränderung, die zu einer potentiell "initiierenden" Mutation führen kann. Aus den 8 Seiten zum Wirkungsmechanismus bei Hartwig (2009) wird nicht klar, an welcher Stelle des Weges denn die "Grenze" oder "Schwelle" von einer "unschädlichen, physiologischen" zu einer "schädlichen, unphysiologischen" Belastung überschritten wird oder welches die Mechanismen sind, die eine solche Schwelle bewirken. Vielmehr scheint es so, dass auf den 8 Seiten einige Erkenntnisse aus der klinischen Forschung zu Entzündungsprozessen und der Therapie von Entzündungskrankheiten (z. B. Einfangen von Monozyten und Granulozyten des Blutstroms an den Kapillarwänden durch VCAM- 1*) mit speziellen Messergebnissen in einigen Experimenten mit GBS kombiniert werden. Evidenz für so etwas wie eine Schwelle oder Grenze hin zu potentiell initiierenden DNA-Veränderungen ergibt sich dadurch aber nicht. Alle Beobachtungen und Überlegungen sind ebenfalls mit der Annahme vereinbar, dass sehr kleine Partikelbelastungen sehr geringe ROS-Freisetzungen, ein sehr kleines Ausmaß an "herbeigelockten" Phagozyten und ein sehr kleines Ausmaß an DNA-Veränderungen hervorrufen. Mithin könnten sehr kleine Partikelbelastungen und ROS-Freisetzungen ein sehr kleines zusätzliches Tumorrisiko bedingen. Es ist nicht erkennbar, weshalb nicht dieses sehr kleine Risiko dosisabhängig bei zunehmender Partikelbelastung größer werden sollte - ohne Schwelle oder Risikogrenze. Abb. 1 bei Hartwig (2009) scheint sogar diese Annahme zu stützen: *Ein* Makrophage sendet dort nach Aufnahme sehr weniger Partikel mehrere ROS aus. *Ein* einziger Makrophage sendet die Radikale aus. Weshalb sollten für diese ausgesendeten ROS nicht genau dieselben Gesetze gelten wie für spontan entstandene oder durch ionisierende Strahlung induzierte ROS?

Adverse Wirkung



Abb. 5.2 Nicht-Wissen über den Verlauf von Dosis-Wirkungsbeziehungen bei niedrigen Dosen ionisierender Strahlung. Wegen der Unmöglichkeit der Messung lassen sich nach dem medizinischen Wörter- und Lehrbuch Pschyrembel (1994; wörtlich: "*Unmöglichkeit der Messung*") die gezeigten Thesen über lineare oder hyperlineare Kurven, über eine Schwelle oder über die so genannte Hormesis nicht mit wissenschaftlicher Sicherheit beweisen oder widerlegen.

^{*} Abfrage am 19.5.2010 nach "vcam1 OR vcam-1" ergab in PubMed 10.735 Fundstellen, in Google 778.000 Fundstellen.

Auch die Existenz von Schutzmechanismen bzw. von "induzierten" Schutzmechanismen belegt keine Unschädlichkeitsgrenze. Zwar ist grundsätzlich denkbar, dass das Ausmaß der Induktion von Schutzmechanismen das Ausmaß der Schädigung übersteigt und dass niedrige Dosen "protektive" Effekte ausüben könnten, doch dieses Konzept der so genannten Hormesis wird - umstritten - auch für chemische Karzinogene und für ionisierende Strahlung diskutiert und ist letztlich nichts anderes als eine Spekulation (Abb. 5.2). Es ist vielmehr nicht belegt, dass die ROS, welche durch Phagozyten nach Partikelaufnahme produziert werden, bis zu einer gewissen Grenze oder Schwelle gänzlich (d. h. zu 100 %) durch (induzierte) Antioxidantien bzw. durch (induzierte) DNA-Reparatur unschädlich zu machen sind. Ein 100%iger Schutz ist auch vor dem Hintergrund biologisch/chemischer Grundzusammenhänge nicht plausibel. So wird z. B. bereits die ohne Einwirkung schädlicher Fremdstoffe im Organismus produzierte ROS-Bildung - außerhalb der Partikeldiskussion - für Alterungsprozesse verantwortlich gemacht. Diese Alterung würde folglich gar nicht stattfinden, wenn endogene - und bis zu einer gewissen Grenze auch fremdstoff-induzierte -ROS zu 100 % durch Antioxidantien unschädlich gemacht würden. In wissenschaftlichen Diskussionen an anderer Stelle - d. h. wenn es nicht um GBS geht - wird neben dem Altern sehr deutlich auch ein unvermeidbares Krebsrisiko auf endogene ROS zurückgeführt.

Dazu hat z. B. Feinendegen (2006) im Zusammenhang mit der Bewertung ionisierender Strahlung wörtlich geschrieben: "So sind ROS einerseits generell, ob sie durch Strahlen induziert sind oder endogen entstehen, potentiell toxisch durch ihre Bildung sekundärer molekularer Strukturveränderungen mit womöglich Kaskaden von sekundären biochemischen Reaktionen, wo immer sich dazu die Gelegenheit bietet. ... Man rechnet bei Normalpersonen mit etwa einer Mutation pro Zelle pro Tag allein als Resultat der von endogenen ROS schließlich dauerhaft bleibenden DNS-Veränderungen in überlebenden Zellen. Diese Mutationen sind wesentlich verantwortlich für zelluläres Altern und damit auch für das Altern des Organismus. Die spontane Krebshäufigkeit in der Bevölkerung wird hauptsächlich auf Fehler der DNS-Reparatur nach endogener Schädigung und das Versagen anderer Abwehrmechanismen zurück geführt."

Vor diesem Hintergrund ist es nicht naheliegend, dass gerade die durch Phagozyten gebildeten ROS bis zu einem erheblichen Überladungszustand vollständig unschädlich gemacht werden. Es ist auch nicht so, dass die Zahl von neutrophilen Granulozyten in der Rattenlunge abhängig von der retinierten Staubmenge "explosionsartig" oder exponentiell zunimmt, die Auswertung mehrerer Studien bei UBA (1999, S. 136-143) zeigt vielmehr eine eher lineare Zunahme. Realistischerweise ist stets mit einer Grundbelastung an ROS-Bildung in der Lunge zu rechnen - ein relativ kleines, aber nicht auszuschließendes Risiko. Davon abgesehen: Selbst wenn es eine Schwelle gibt, ist es nicht möglich, diese Schwelle allgemeingültig für eine große Population mit vielen unterschiedlich empfindlichen Individuen zu bestimmen.

Daher ist der Satz auf S. 53 bei Hartwig (2009) nochmals genauer zu betrachten: "Insgesamt zeigt der Wirkungsmechanismus von Titandioxid, dass es eine Partikelbelastung der Lunge gibt, unterhalb derer die exponierten Zellen der Alveolen und Bronchien weder geschädigt werden noch eine oxidative Reaktion zeigen, die geeignet ist, Makrophagen und Leukozyten in größerer Zahl herbeizuziehen und zu aktivieren". Es heißt dort: "zeigt der Wirkungsmechanismus", es heißt <u>nicht</u> "zeigen die Befunde X Y Z mit den Messwerten 1 2 3". Entgegen dem Anschein begründet der Satz nicht zwingend die Existenz von so etwas wie einer Wirkungsschwelle (wobei das Wort "Schwelle" bei Hartwig, 2009, zwar vermieden wird, die Argumentation aber gar nicht anders verstanden werden kann). Der Satz müsste daher anders lauten, etwa folgendemaßen: "*Wir meinen, aufgrund unserer Einschätzung des Wirkungsmechanismus sei eine Partikelbelastung der Lunge anzunehmen, unterhalb derer die exponierten Zellen nicht geschädigt werden.*" Der Satz drückt eine Meinung aus, eine Einschätzung, eine Position, er ist eine Behauptung, ein Postulat, dessen spekulativer Charakter durch die Nennung einer Vielzahl von Fachtermini auf den vorausgehenden 8 Seiten in den Hintergrund tritt. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Satz auf S. 13 *"Und wann immer Sauerstoffradikale in unphysiologischer Menge von Phagozyten auf die (epithelialen) Nachbarzellen übergehen, könnten sie in diesen Zellen zu regulatorischen Fehlleistungen und DNA-Schäden führen".* Wieso *"in unphysiologischer Menge"*, wieso nicht *"in dosisabhängiger Weise"*? Was ist physiologisch, was ist unphysiologisch, wo ist denn die Grenze? Etwa dort, wo man *"etwas messen kann"*?

Bei Hartwig (2009) wird großes Gewicht auf die Unterscheidung "primärer" und "sekundärer" Effekte gelegt; auf S. 17 heißt es:

"Im Hinblick auf die Lungenkarzinogenität der GBS ist folglich abzuwägen, ob

- a) primäre, d. h. auf Lungenepithelien direkt wirkende Einflüsse, eine größere Rolle spielen als
- b) sekundäre, d. h. durch Entzündungszellen vermittelte Effekte."

Es ist zwar nicht klar, weshalb eine solche "Abwägung" von besonderer Bedeutung sein sollte: Falls ROS - spontan entstanden, durch ionisierende Strahlung erzeugt oder von Phagozyten nach Partikelaufnahme freigesetzt - ein Tumorrisiko hervorrufen, dann ist die Höhe dieses Risikos von gleicher Bedeutung als wenn dieses Risiko durch "primäre" Effekte von Partikel in Epithelzellen erzeugt würde. Außerdem: Weshalb soll sich eine besondere qualitative Schlussfolgerung ergeben, wenn zwar primäre Einflüsse eine Rolle spielen, aber sekundäre Einflüsse eine "größere Rolle" spielen? Gleichwohl: Unter den Gesichtspunkten des aktuellen Projektes ist besonders bedeutsam, wie bei Hartwig (2009) die vorliegenden In-vitro-Befunde beurteilt werden. Es wird dort auf die positiven Gentoxizitätsbefunde von Don Porto Carero et al. (2001) mit Industrieruß und von Gurr et al. (2005) mit TiO₂ hingewiesen, die Aussagekraft der Befunde wird aber folgendermaßen abgewertet: "Jedoch sind die aus Tumoren gewonnenen bzw. Virus-transformierten Zelllinien nur unvollkommene Indikatoren für das Verhalten von Typ-II-Alveolarepithelien und Bronchialepithelien in vivo. denn sie haben sowohl die Polarität der Ursprungszellen verloren als auch deren Membraneigenschaften". Dies scheint auf einer ähnlichen Linie zu liegen wie die oben zitierten Aussagen von Kirkland et al. (2007b) "the future of in vitro testing may lie with radically new assays", AGS (2008) "zahlreiche Gründe, die die Übertragbarkeit der In-vitro-Ergebnisse auf die In-vivo-Situation nicht gestatten" und Hesterberg et al. (2005) "extrapolation form directly exposed bacterial or cell line cultures to intact human beings ... is problematic at best". Demnach wären die In-vitro-Ergebnisse unbrauchbar, allerdings nur dann, wenn die Ergebnisse positiv sind; sind sie negativ, benutzt man sie als Unterstützung der These einer fehlenden primären Gentoxizität, d. h. fehlenden "Gefährlichkeit" (im Grunde eine Umkehrung des Vorsorgeprinzips). Allerdings ist auch diese Beurteilung bei Hartwig (2009) "schillernd": Man schließt nicht aus, verwirft die Daten aber letztlich, wörtlich (S. 19): "Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der Eigenbeitrag der Lungenepithelzellen zu ihrer - Oxidantienvermittelten - Mutagenese und autokrinen Proliferationsstimulation nicht auszuschließen ist, in quantitativer Hinsicht jedoch weitaus geringeren Einfluss ausübt als Phagozyten (Dalton et al. 1999; Schins 2002; Schins und Donaldson 2000; Schins und Knaapen 2007)".

Insgesamt ist die Bewertung der In-vitro- und In-vivo-Daten zu GBS durch die MAK-Kommission (Greim und Ziegler-Skylakakis, 2007; Hartwig, 2009) "vielschichtig" und insofern schwierig zu kommentieren, am Ende entspricht die Argumentation aber (de facto) so etwas wie einer Wirkungsschwelle und letztlich im Ergebnis der "Overload-These", auch wenn diese Worte nicht benutzt werden. Die Schlussfolgerung bei Hartwig (2009) lautet (S. 53):

• "Daraus kann gefolgert werden, dass eine Exposition, die nicht zu entzündlichen Reaktionen führt, nicht mit erhöhtem Krebsrisiko verbunden ist".

Die Wissenschaftler der MAK-Kommission haben dabei offenbar versucht, sich wissenschaftlich "abzusichern", indem mehrfach auf Aussageunsicherheiten hingewiesen wird, z. B. auf S. 13: "Mechanistische Einzelheiten, wie die Stress-Reaktion ausgelöst wird, sind bislang nicht hinreichend untersucht." und auf S. 18 "Gemäß dieser Auffassung verweilen die Partikel für eine bestimmte Zeit im Innern der Bronchialepithelzellen und könnten folglich DNA-Schäden hervorrufen" und S. 19 "Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der Eigenbeitrag der Lungenepithelzellen ... nicht auszuschließen ist, in guantitativer Hinsicht jedoch weitaus geringeren Einfluss ausübt als Phagozyten". Letztlich soll aber wohl so etwas wie der Beleg einer Wirkungsschwelle erbracht werden bzw. eine Begründung gegeben werden, sich so zu verhalten, als gabe es eine Wirkungsschwelle. Wesentliche Bausteine dabei sind die (nur scheinbar belegten) Thesen, primäre Gentoxizität spiele bei GBS keine wesentliche Rolle und für die Wirkung der von Phagozyten produzierten ROS gebe es eine Belastung ohne Schädigung der Epithelzellen. Auf die Bedeutung statistischer Tests in der Argumentationsweise der MAK-Kommission wird weiter unten eingegangen; dazu ist zunächst noch das Vorsorgeprinzip zu erläutern.

5.7.3 Definition des Vorsorgeprinzips aus dem Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU)

Weil die Grenzen naturwissenschaftlicher Methoden im Prinzip seit langem bekannt sind, wurde das so genannte Vorsorgeprinzip geschaffen. An dieser Stelle ist auch nochmals auf die Interpretation des Vorsorgeprinzips einzugehen, die von einem Jura-Professor und Mitglied des Sachverständigenrates für Umweltfragen (SRU) formuliert und auf der Website des SRU veröffentlicht wurde (Calliess, 2008). Dort lassen sich 3 Stufen der Anwendung des Vorsorgeprinzips erkennen:

- 1. Vorsorgeanlass
- 2. Widerlegbare Gefährlichkeitsvermutung (Beweislastumkehr)
- Erschüttern des Besorgnisanlasses durch den Risikoverursacher (S. 47): Er muss nicht etwa den Beweis der Schadensunmöglichkeit erbringen, sondern es genügt, wenn Tatsachen ermittelt und vorgebracht werden, aus denen sich - im Verhältnis zum potentiellen Schaden - eine begründete Wahrscheinlichkeit für die Unmöglichkeit eines Schadenseintritts ergibt.

Im Falle von Nano-GBS wären nach diesem Schema zumindest die Lungentumoren bei Ratten ein schwerwiegender Vorsorgeanlass. Nach dem Schema von Rice und

Wilbourn (2000) wären daraus Konseguenzen für einen Umgang mit Nano-GBS zu ziehen. Inwiefern ist dann eine darauf gegründete "Gefährlichkeitsvermutung" widerlegbar? Sicherlich ist "auf dem Papier" und "im Allgemeinen" stets eine Widerlegung möglich bzw. zuzulassen, insbesondere wenn man - wie bei Calliess (2008, S. 46) betont, dass auch die Belange der Risikobetroffenen zu berücksichtigen seien. Ein Problem besteht aber in den tatsächlichen Anforderungen, die man an eine solche Widerlegung knüpft. Vor dem Jahr 1998 ging die MAK-Kommission davon aus, dass sich für krebserzeugende Stoffe keine Wirkungsschwelle angeben lässt (Greim, 1998, 2000). Theoretisch mochte für (relativ wenige) einzelne krebserzeugende Stoffe zwar eine Schwelle bestehen, praktisch ließ sich diese aber nicht ermitteln. Ich hatte das Vorsorgeprinzip damals so verstanden, dass man sich deshalb - weil der menschlichen Gesundheit der höchste Wert eingeräumt wurde - so zu verhalten hatte, als ob es keine Schwelle gebe. Daraus musste nicht die Forderung nach einem Verzicht auf die Stoffe oder Technologie folgen, aber es folgte zumindest unter ethischen Gesichtspunkten die Notwendigkeit einer Form von Risikoabschätzung, bei der nicht die Grenzen naturwissenschaftlicher Methoden und Erkenntnis zu Lasten der "Risikobetroffenen" gingen. Die wissenschaftlich und ethisch geniale mathematische Umsetzung des Vorsorgeprinzips für Krebsrisiken war das so genannte linearisierte Multistage-Verfahren. Dabei wurde - weil der wahre Verlauf einer Expositions-Risikobeziehung im unteren Bereich nicht mit Aussagesicherheit bestimmt werden kann (Abb. 5.2) - im unteren Bereich derjenige "höchste" Verlauf des Multistage-Modells zugrunde gelegt, mit dem die Daten noch plausibel vereinbar waren (nicht signifikant abweichend, 95%-Vertrauensgrenze). Dieses Verfahren wurde inzwischen diskreditiert, es ist auch gemäß Leitfaden des AGS (2008) nicht vorgesehen.

Auch heute spricht man von "Risikoabschätzung", ein Prozess, an dessen Ende aber die Aussage stehen kann, dass unter realistischen Expositionsbedingungen "keine Bedenken" oder "kein nennenswerter Beitrag zum Risiko" bestünden. In diesem Sinne wurden von der MAK-Kommission spezielle Kategorien krebserzeugender Stoffe geschaffen, für die bei Einhaltung des MAK-Wertes kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten ist (Neumann et al., 1997a,b; Greim, 1998, 2000). Dieses Konzept wurde von Hartwig (2009) auf Titandioxid angewandt (s.o.). Für Titandioxid wurden dabei die Lungentumoren bei Ratten als Hinweise auf eine krebserzeugende Wirkung anerkannt, die positiven In-vitro-Befunde zu Gentoxizität von TiO₂ wurden aber - letztlich - als in vivo irrelevant bewertet. Es wurde postuliert, für die bei Ratten beobachtete karzinogene Wirkung von Titandioxid scheine demnach eine gentoxische Wirkung nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Schließlich heißt es in der MAK-Begründung von Hartwig (2009): kann gefolgert werden, dass eine Exposition, die nicht zu entzündlichen Reaktionen führt, nicht mit erhöhtem Krebsrisiko verbunden ist". Es wird dann nur deshalb keine Exposition ohne nennenswerten Risikobeitrag angegeben, weil bisher keine NOAEC aus den vorliegenden Tierexperimenten ermittelt werden konnte, und bezüglich eines möglichen zukünftigen Grenzwertes wird auf die Begründung "Granuläre bio-beständige Stäube" ("in Vorbereitung") verwiesen. Bei Greim und Ziegler-Skylakakis (2007) heißt es in Vorbereitung der Bewertungen von TiO2 und anderen GBS "... identify a noobserved-adverse-exposure level (NOAEL), which can then be used to establish an MAK value. ... Provided the MAK value is observed, no significant contribution to human cancer is expected": Wenn der aus einem NOAEL gebildete MAK-Wert eingehalten wird, dann ist kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten - die Position der MAK-Kommission.

Eine Rolle bei einem solchen Bewertungsschema spielen Ergebnisse statistischer Tests. Und eine besondere Rolle spielen "nicht signifikante" Ergebnisse, die zur Identifizierung des NOAEL verwendet werden. Es ist in Kapitel 4 eingehend beschrieben, dass ein nicht signifikantes Ergebnis keine Evidenz für das Zutreffen der "Nullhypothese" (hier: kein Effekt) darstellt. Ein nicht signifikantes Ergebnis lässt entweder keine eindeutige Interpretation zu oder es kann als Entscheidungskriterium dafür verwendet werden, sich so zu verhalten, als ob die Nullhypothese zuträfe. Den letzteren Ansatz kann man als inductive behaviour bezeichnen. Es ist die Regel in der regulatorischen Toxikologie, ein NOAEL so zu interpretieren, als ob bei diesem Dosisniveau kein Risiko bestünde (gegebenenfalls erweitert um Sicherheits- oder Extrapolationsfaktoren). Irgendwelche Angaben zur Sensitivität des Tests, etwa in Form der statistischen Power, erfolgen dabei in der Regel nicht. Dies mag sich bei nichtkanzerogenen Stoffen rechtfertigen lassen. Das Risiko eines relativ schwachen, kurzzeitigen Effekts mag implizit als "hinnehmbar" bewertet werden, wenn es in einem Tierversuch oder In-vitro-Test nicht mehr erkennbar ist, auch ohne eine Quantifizierung der möglicherweise verbleibenden Risikohöhe. Bei einem kanzerogenen Stoff ist dies meines Erachtens unter ethischen Gesichtspunkten anders. Spätestens hier wäre eine Rückbesinnung auf die Überlegungen der Erfinder des statistischen Testens in den 1930er bis 1950er Jahren notwendig (Kapitel 4). Es gibt kein Naturgesetz, dass bei einem p-Wert von 0,05 eine Signifikanzschranke besteht. Nichts spricht dagegen, ein Ergebnis mit einem p-Wert von 0,06 als signifikant zu betrachten, wenn es sich um einen schwerwiegenden potentiellen Schaden handelt, und gleichzeitig ein Ergebnis mit einem p-Wert von 0,04 nicht als signifikant zu erachten, wenn es sich um einen sehr geringen potentiellen Schaden handelt. Aber wenn man eine Grenze von p = 0.05 oder p = 0.01 als scharfes Entscheidungskriterium benutzt, dann ist besonders genau auf die "Randbedingungen" zu achten, zumal wenn es sich um Krebsrisiken handelt. Neyman (1957) hat es explizit formuliert (Abschnitt 4.3, 4.4, 4.6), übersetzt auf die Beurteilung von Karzinogenen: Es muss die kleinste "erhebliche" oder hinnehmbare Effekt- oder Risikoausprägung mathematisch formuliert werden und es muss die notwendige statistische Power eines Tests benannt werden, eine solche Effekt- oder Risikoausprägung auch zu entdecken. Ein Versuchsdesign muss in seinem Stichprobenumfang den so berechneten Bedingungen genügen. Dann - und nur dann - dürfte bei einem Karzinogen ein nicht-signifikantes Ergebnis als Begründung benutzt werden, sich so zu verhalten, als ob kein erhöhtes Krebsrisiko bestünde. Bei dem Vorgehen von Greim und Ziegler-Skylakakis (2007) wird nicht gesagt, beim NOAEL bestünde kein Risiko, aber man verhält sich so, als ob kein Risiko bestünde. Dies ist als Anwendung des Konzepts inductive behaviour anzusehen. Man interpretiert dabei ein signifikantes Ergebnis so, dass man sich so verhält als würde die "Nullhypothese" (hier: kein Effekt) nicht zutreffen, d. h. hier: Effekt. Entsprechend verhält man sich bei einem nicht-signifikanten Ergebnis so, als würde die "Nullhypothese" (hier: kein Effekt) zutreffen. Der Fehler, der in einigen aktuellen Beurteilungssituationen in der regulatorischen Toxikologie, z. B. bei der MAK-Kommission, gemacht wird, ist der, dass man die Bedingungen, die an das Prinzip des inductive behaviour notwendigerweise zu knüpfen sind, einfach weglässt.

In Abschnitt 5.4 und 5.5.1 habe ich die Bedeutung nicht-signifikanter Ergebnisse für epidemiologische Studien und für Langzeit-Karzinogenitätsversuche veranschaulicht. Im Hinblick auf nicht-tumoröse Effekte kann man dies am Beispiel von TiO₂ illustrieren. Hartwig (2009) schreibt, dass bisher keine NOAEC (*no observed adverse effect concentration*) aus den vorliegenden Tierexperimenten ermittelt werden konnte. Wir nehmen deshalb einfach einmal ein Beispiel eines gut dokumentierten Inhalationsversuches mit TiO₂, der zu einer NOAEC-Ableitung herangezogen werden könnte, um das grundsätzliche Problem zu verdeutlichen. Es mag sein, dass die MAK-Kommission ein anderes Verfahren wählt, das dann entsprechend zu analysieren wäre. Der Inhalationsversuch von Muhle et al. (1991) sowie Bellmann et al. (1991) ist bei Hartwig (2009) zitiert, dieser große Langzeit-Inhalationsversuch (hier: Tab. 3.16) wurde auch an anderer Stelle bereits mehrfach ausgewertet, z. B. bei UBA (1999)*. Bei Greim et al. (2001) wurde dem Anteil neutrophiler Granulozyten (PMN) in der Lunge besondere Aussagekraft hinsichtlich der Entzündung eingeräumt. Bei Muhle et al. (1991) sind Daten zu PMN nach unterschiedlichen Expositionszeiten aufgeführt. So wurden z. B. nach 24 Monaten inhalativer Exposition gegenüber feinem TiO₂ in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit (BAL) 2,3 % PMN ermittelt innerhalb einer Gesamtkonzentration von 211.000 Leukozyten je mL BAL. Diese Werte sind in Table 4 bei Muhle et al. (1991) nicht als signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle ausgewiesen (0,5 % PMN unter 221.000 Leukozyten/mL). Rechnet man auf die Absolutzahlen an PMN um, dann ergeben sich 4.853 PMN/mL unter der TiO2-Exposition im Vergleich zu 1.105 PMN/mL bei den Kontrollen, also eine Erhöhung auf gut das Vierfache. Bildet man den Mittelwert über alle Zeitpunkte der BAL-Entnahme bei Muhle et al. (1991), dann erhält man eine mittlere Erhöhung der PMN/mL auf das 4,7fache. Bei Hartwig (2009) werden diese Daten folgendermaßen eindeutig als "nicht-signifikant" bewertet "Die Analyse der BAL-Flüssigkeit zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und den Kontrolltieren". Die Daten sagen aber zunächst aus: Über einen langen Zeitraum hinweg war vielleicht die Konzentration an PMN in der Lunge der staubexponierten Tiere auf mehr als das Vierfache erhöht.

Woher sollte die Gewissheit stammen, dass mit einer langfristigen Erhöhung der PMN-Konzentration auf das Vierfache oder auch nur auf das Doppelte oder Eineinhalbfache kein Risiko oder "kein nennenswerter Beitrag zum Risiko" verbunden ist? Selbstverständlich gibt es diese Gewissheit nicht. Gemäß Analyse der Autoren waren die Werte nicht statistisch signifikant, aber das heißt: Versuchsdesign und Analyse waren nicht geeignet, eine Erhöhung der PMN-Konzentration auf das Vierfache zu entdecken. Dazu sind keine komplizierten Powerberechnungen notwendig, denn die Erhöhung auf das Vierfache war nicht signifikant. Wenn man dieses Ergebnis als nicht-signifikant bewertet und sich dann so verhält, als treffe die "Nullhypothese" (hier: kein Effekt, kein Risiko) zu, dann beinhaltet dies zwangsläufig die (ethische) Wertung, dass man eine Erhöhung der PMN-Konzentration auf das Vierfache als "nicht nennenswert" oder "nicht wesentlich" oder "unbedenklich" einstuft. Bei der Konzentration von 3,9 mg alveolengängigem TiO₂/m³ in diesem Versuch könnte nach den Berechnungen von Roller (2008) ein zusätzliches Lungentumorrisiko von etwa 1 % bestehen. Diese Risikohöhe ist mit Gruppengrößen von 50 oder 100 Tieren nicht zu erkennen (vgl. Abschnitt 4.6: 1 % und 2 % rote Kugeln in einer "Lostrommel" können durch Ziehen von 50 oder 100 Kugeln nicht unterschieden werden). In einer Population von 100.000 exponierten Beschäftigten entspricht ein Risiko von 1 % aber einer zusätzlichen Zahl von 1.000 Lungenkrebsfällen. Woher kann die Gewissheit stammen, dass nicht die vierfache Erhöhung der PMN mit genau diesem zusätzlichen Tumorrisiko von 1 % = 1.000 in 100.000 ursächlich verbunden ist? Auch nach den Ausführungen zum Wirkungsmechanismus bei Hartwig (2009, s. Abschnitt 5.7.2) besteht diese Gewissheit nicht.

^{*} Dort wurde gezeigt, dass der Anteil an neutrophilen Granulozyten (PMN) in Abhängigkeit von der retinierten Staubmasse nicht etwa exponentiell, sondern eher linear ansteigt (UBA, 1999, S. 139).

Möglicherweise wird sich die MAK-Kommission bei einer Grenzwertableitung für GBS im Einzelnen auf andere Daten stützen, aus den vorliegenden Veröffentlichungen ist aber erkennbar, dass die veröffentlichte Vorgehensweise folgende allgemeine Regel missachtet: Die Einstufung einer Expositionskonzentration als NOAEL oder NOAEC für ein Karzinogen anhand eines Messparameters wie PMN, Enzymaktivitäten oder benignen histologischen Läsionen wäre nur dann ethisch und erkenntnistheoretisch gerechtfertigt, wenn eine wohlbegründete Definition einer hinnehmbaren Veränderung der Ausprägung des Messparameters vorgenommen wird und eine Studie so angelegt wird, dass sie diese Veränderung auch mit hinreichender Power (hinreichend kleinem Fehler 2. Art) entdecken kann. Das heißt: Es müssten - zum Beispiel - Erkenntnisse vorliegen, dass eine Verdoppelung der PMN-Zahl in der Lunge nur ein zumutbar niedriges Lungentumorrisiko (z. B. kleiner als 1 : 10.000) verursacht. Falls dann eine Studie mit hinreichender Power zur Entdeckung einer Verdoppelung der PMN-Zahl (hinreichend kleinem Fehler 2. Art) ein nicht-signifikantes Ergebnis erbracht hätte, dann ware es gerechtfertigt, sich so zu verhalten, als ob kein Risiko bestünde. Es genügt aber nicht, ohne genaue Kenntnis der Zusammenhänge zwischen PMN-Zahl und Lungentumorrisiko einfach zu sagen "Die Verdoppelung der PMN-Zahl ist nicht signifikant, daher besteht kein (nennenswertes) Risiko". Bei der Vorgehensweise von Greim und Ziegler-Skylakakis (2007) sowie Hartwig (2009) bleibt der so genannte Fehler 2. Art unkontrolliert, somit kann ein zusätzliches Krebsrisiko verbleiben, das höher ist als die bei AGS (2008) genannten Akzeptanz- und Toleranzwerte (0,004 bis 0,4 % = 4 in 100.000 bis 400 in 100.000). Die Vorgehensweise bei Hartwig (2009) ist daher ethisch problematisch.

Die Interpretation des Vorsorgeprinzips von Calliess (2008) sieht als Bestandteil des Vorsorgeprinzips gewissermaßen die Aufhebung der Besorgnis vor ("Erschüttern des Besorgnisanlasses durch den Risikoverursacher"). Ich konnte nicht recherchieren, inwieweit dies eine lange Tradition hat oder dem Paradigmenwechsel von "keine Schwelle bei Karzinogenen" hin zum "*practical threshold*" (Bolt, 2008) geschuldet ist. Das bei Calliess (2008) formulierte Schema scheint jedenfalls sowohl auf die Aussage "keine Bedenken" von Krug (2009) als auch auf "kein nennenswerter Beitrag" der MAK-Kommission anwendbar. Beide Gruppen versuchen sozusagen, *den Besorgnisanlass* durch folgende Strategie zu *erschüttern*:

- 1. Aufstellen (nur) scheinbar plausibler Thesen "Tumoren sind Folgen von Entzündung; für Entzündung - und daher für die Tumoren - gibt es eine Schwelle oder Grenzbelastung".
- Anwendung einer Vorgehensweise, die dem Konzept des *inductive behaviour* entspricht (ohne dies zu benennen): Dort wo keine statistisch signifikante Entzündung (oder Zytotoxizität) gefunden wird, verhalten wir uns, als ob es keine Entzündung (Zytotoxizität) gäbe, d. h. als ob hier die Schwelle oder Grenzbelastung wäre; "hier bestehen keine Bedenken, hier besteht kein (nennenswerter) Beitrag zum Risiko".

Das Problem bei dieser Vorgehensweise besteht darin, dass nicht-signifikante Ergebnisse toxikologischer Untersuchungen letztlich so interpretiert werden, als ob sie für die Abwesenheit eines Effekts oder Risikos sprächen. Dies ist deshalb problematisch, weil im Falle krebserzeugender Stoffe ein verbleibendes Risiko bei den Exponierten nicht wirklich ausgeschlossen ist und weil über dessen mögliche Höhe keine Aussage gemacht wird. Bestandteil der Problematik ist der Umgang mit Postulaten. Man verhält sich so, als spielte für die Entstehung der Tumoren nur die Entzündung eine Rolle. Damit werden die vorliegenden In-vitro-Gentoxizitätstests einfach und pauschal letztlich als irrelevant bewertet. Es ist für mich kaum vorstellbar, wie ein In-vitro-Gentoxizitätstest angelegt sein müsste, um zusätzlich zu den vorliegenden Ergebnissen und entgegen dem offenbar feststehenden Urteil bei Hartwig (2009) und Krug (2009) die "wissenschaftliche Gemeinde" vom Bestehen primärer oder direkter Gentoxizität von Nano-GBS zu überzeugen. Die Aussage, nur Entzündungsprozesse seien wesentlich für die Lungentumorbildung durch Nano-GBS ist als unbewiesenes Postulat anzusehen. Auch die Annahme, für die maßgeblichen Entzündungsprozesse gebe es eine Schwelle und damit gebe es auch eine Schwelle für die Tumorbildung, ist ein derzeit unbewiesenes und unbeweisbares Postulat.

Das Vorgehen von Krug (2009) und Hartwig (2009) stellt sich daher folgendermaßen dar: 1. Die (Quasi-)Schwellen- oder Overload-These ist nicht wirklich plausibel, sondern eben nur ein Postulat, eine Behauptung. 2. Nicht signifikante Ergebnisse statistischer Tests werden als Beleg für die Abwesenheit eines Risikos missdeutet bzw. notwendige Bedingungen des Konzepts des so genannten inductive behaviour werden nicht erfüllt. Bei einer konsequenten Anwendung des Konzepts des inductive behaviour muss mathematisch guantifiziert werden, welche Effektausprägung (z. B. an Entzündung) eben noch als "appreciable", "nennenswert", "bedenklich" o.ä. hingenommen bzw. zugemutet werden darf, und es muss quantifiziert werden, ob die empirischen Untersuchungsmethoden aussagekräftig genug sind, um diesen "minimal appreciable" Effekt entdecken zu können. Weder Krug (2009) noch Hartwig (2009) erfüllen diese Bedingungen. Man könnte freilich sagen: bei z. B. Hartwig (2009) handele es sich gar nicht um das Konzept des inductive behaviour, es werde einfach "konventionsgemäß" bei einem Niveau des p-Werts von 5 % eine Grenze gezogen, darüber bestehe großer Konsens. Eine solche Argumentation enthält aber - in der Festsetzung des "Signifikanzniveaus" - so viel Willkür, das sie erst recht fragwürdig wäre. Auch ein großer Konsens unter Naturwissenschaftlern rechtfertigt es ethisch nicht, z. B. ein zusätzliches expositionsbedingtes Krebsrisiko von 3 von 100 als "nicht-nennenswert" zu bewerten, weil irgendein Messparameter statistisch "nichtsignifikant" war. Den philosophisch-logischen Bedingungen einer Verwendung statistischer Tests als Entscheidungskriterium - mithin des Konzepts des inductive behaviour - kann man sich nicht dadurch entziehen, dass man eine andere Terminologie benutzt.

Daher mag man die Argumentationsweisen von Krug (2009) und Hartwig (2009) ganz kurz so zusammenfassen: Das nicht-signifikante Ergebnis statistischer Tests wird - ohne Beachtung des Fehlers 2. Art oder der Teststärke, mithin ohne Beachtung des zwangsläufig akzeptierten Krebsrisikos - benutzt, um einer unbewiesenen und unbeweisbaren These (Schwelle) zu Anerkennung zu verhelfen. Oder umgekehrt formuliert: Eine nur scheinbar sachlogisch begründete These wird benutzt, um nicht-signifikanten Ergebnissen ungenügend definierter statistischer Tests scheinbar eine Berechtigung für das Postulieren des Fehlens eines (erheblichen) Risikos zu verleihen. Für einen Juristen mag damit der "Bersorgnisanlass erschüttert" sein. Diese Vorgehensweise sollte aber dringend von ausgebildeten Philosophen der Fachrichtungen Erkenntnistheorie (Epistemologie) und Ethik bewertet werden.

5.7.4 Schlussfolgerungen zu Nano-GBS

Insgesamt wurde im vorliegenden Bericht ausführlich dargelegt, dass Nano-GBS nicht nur in Lungen von Ratten zu Tumoren geführt haben, sondern dass auch mittels In-vitro-Tests eine Gentoxizität festgestellt wurde, die unabhängig von Entzündungsprozessen entstanden ist. Epidemiologische Studien haben z. B. für "Umweltstäube", für Dieselruß und für Quarzstäube Hinweise auf ein expositionsbedingt erhöhtes Lungenkrebsrisiko ergeben. Geltendes Recht in Deutschland schreibt vor, dass die Konzentration an Partikeln PM₁₀ (nicht nur alveolengängige, sondern auch thoraxgängige Partikel jeder Art) auch in Innenstädten im Jahresmittel nicht höher als 40 µg/m³ sein darf. Epidemiologische Studien sind aber aufgrund der methodischen Grenzen nicht geeignet, sichere Aussagen über das Vorhandensein oder Fehlen eines speziell durch synthetische Nano-GBS hervorgerufenen Lungenkrebsrisikos zu machen. Ein Nachweis eines erhöhten Lungenkrebsrisikos durch Nano-GBS am Menschen, der einen Schadenersatzanspruch begründen könnte, ist nicht zu erwarten. Bei bestehenden Hinweisen auf ein karzinogenes Potential ist es generell eine wissenschaftliche Fehlinterpretation, wenn nicht-signifikante Studienergebnisse bei bestimmten Dosen ohne weiteres als Anlass genommen werden, sich so zu verhalten, als bestehe bei diesen Dosen kein Effekt oder Risiko. In den vorliegenden Fällen (GBS betreffend) wurde die hierfür erforderliche Bedingung eines kontrollierten Fehlers 2. Art bzw. einer kontrollierten und ausreichenden statistischen Power (Teststärke) nicht erfüllt.

Es wurde erläutert, dass die Datenlage und mechanistische Überlegungen auch bei Nano-GBS mit der Annahme einer Dosis-Wirkungsbeziehung ohne Schwellenwert vereinbar sind. In mehreren Publikationen wird nahegelegt, ein so genannter sekundärer Mechanismus, vermittelt über Entzündungszellen bzw. reaktive Sauerstoffspezies, sei zwangsläufig mit so etwas wie einer Wirkungsschwelle verbunden. Überzeugende Daten oder Belege, die diese Annahme stützen, wurden aber nicht vorgelegt. In Anbetracht der Schwere einer Krebserkrankung ist es verantwortungsbewusst, die vorliegenden Effektbefunde bei Ratten (GBS, KMF) und bei historischen Expositionen in der Epidemiologie (Asbest, Chrom, Nickel, Quarz, Dieselruß) zum Maßstab des Handelns auch bei niedrigeren Expositionshöhen zu machen ("Extrapolation"). Und wegen der eingeschränkten Aussagekraft epidemiologischer Studien und des begrenzten Wissens um Wirkungsmechanismen eignet sich dabei das Fehlen eines statistisch signifikanten "Effektes" oder erhöhten Risikos (unter modernen Expositionsbedingungen) wissenschaftlich derzeit nicht als Anlass, sich so zu verhalten, als ob kein Risiko bestünde.

Den relativ klaren wissenschaftlichen Gesichtspunkten (und rechtlichen in Form der BImSchV) stehen erhebliche Wirtschaftsinteressen gegenüber. Die nähere Betrachtung der In-vitro-Gentoxizitätstests zu Nanomaterialien und Vergleichsstäuben hat gezeigt, dass die Ergebnisse stark mit der Art des Auftraggebers oder durchführenden Labors zusammenhängen. In dem Projekt NanoCare war die geballte Kompetenz von großen Chemieunternehmen, von Forschungsinstituten und Universitäten sowie einer Großforschungseinrichtung versammelt. Der Sprecher dieses Konsortiums hat veröffentlicht, die Ergebnisse zeigten, dass bei den untersuchten Stoffen keinerlei gesundheitliche Bedenken bestehen. Hersteller dieser Stoffe waren in dem Konsortium beteiligt. In dem Fachgremium des Ausschusses für Gefahrstoffe, das mit der toxikologischen Bewertung von Fasern und Stäuben befasst ist, sehe ich keinen einzigen externen Experten, der frei von Interessen seines Arbeitsgebers, welche mit der *wirtschaftlichen* Bewertung der zu beurteilenden Stäube zusammenhängen, seine Position bilden könnte. Keiner der Wissenschaftler dort gehört einer größeren Einrichtung (Forschungsinstitut, Universität) an, welche ihre Mittel unabhängig von unmittelbaren Wirtschaftsinteressen erhält. In den letzten Jahren war ein Schließen solcher Einrichtungen bzw. eine zunehmende Ökonomisierung, z. B. in Form des CHE-Hochschulrankings (www.che-concept.de) festzustellen. Es ist völlig unklar, wie unter diesen Bedingungen in Zukunft eine *ausgewogene* Beurteilung der Aussage(kraft) von epidemiologischen Studien, Tierversuchen und In-vitro-Gentoxizitätstests zustande kommen kann, d. h. eine Beurteilung, in der "auch die Belange der Risikobetroffenen berücksichtigt werden" (Calliess, 2008, S. 46). Wer wird in den Disputen in den Fachgremien zukünftig "die Belange der Risikobetroffenen" vertreten?

Literaturverzeichnis

Abbott , A.: Animal testing: more than a cosmetic change. Nature 438 (2005), 144-146

Adachi, S.: Effects of chromium compounds on the respiratory system. 5. Long term inhalation of chromic acid mist in electroplating by C57BL female mice and recapitulation on our experimental studies. Japanese J. Ind. Health 29 (1987), 17-33

Adachi, S.; Yoshimura, H.; Katayama, H.; Takemoto, K.: Effects of chromium compounds on the respiratory system. Part 4. Long term inhalation of chromic acid mist in electroplating to ICR female mice. Japanese J. Ind. Health 28 (1986), 283-287

AGS (Ausschuss für Gefahrstoffe): Risikowerte und Exposition-Risiko-Beziehungen für Tätigkeiten mit krebserzeugenden Gefahrstoffen - Bekanntmachung zu Gefahrstoffen - Bekanntmachung 910 - Ausgabe: Juni 2008 - bekannt gegeben vom Bundesministerium für Arbeit und Soziales (BMAS) im Gemeinsamen Ministerialblatt (GMBI). Anlagen (Anlage 2 zu Bekanntmachung zu Gefahrstoffen 910: Leitfaden zur Quantifizierung von Krebsrisikozahlen bei Exposition gegenüber krebserzeugenden Gefahrstoffen für die Grenzwertsetzung am Arbeitsplatz). Ausschuss für Gefahrstoffe - AGS-Geschäftsführung - BAuA - www.baua.de, 2008

Armbruster, L.; Emmerichs, M.; loos, E.: Kombination der Mikrosiebung und der Korngrößenanalyse mit dem Coulter Counter. In Der Minister für Wirtschaft, Mittelstand und Verkehr des Landes Nordrhein-Westfalen. Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau, Arbeitsgemeinschaft Staub- und Silikosebekämpfung. Band 12. Essen: Verlag Glückauf GmbH, 1979, S. 129-135

Baan, R.A.: Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: Recent evaluations by an IARC Monographs working group. Inhal. Toxicol. 19 Suppl. 1 (2007), 213-228

Barnes, C.A.; Elsaesser, A.; Arkusz, J.; Smok, A.; Palus, J; Leśniak, A.; Salvati, A.; Hanrahan, J.P.; de Jong, W.H.; Dziubaltowska, E.; Stepnik, M.; Rydzynski, K.; McKerr, G.; Lynch, I.; Dawson, K.A.; Howard, C.V.: Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity. Nano Lett. 8 (2008), 3069-3074

BAuA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin). Verzeichnis krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender Stoffe, Tätigkeiten und Verfahren nach Anhang VI Teil 3 der Verordnung (EG) Nr. 1272/20081, TRGS 905 und TRGS 906. Stand: Januar 2009. Ausschuss für Gefahrstoffe - AGS-Geschäftsführung - BAuA - www.baua.de. 2009

Bauer, J.F.; Law, B.D.; Hesterberg, T.W.: Dual pH durability studies of man-made vitreous fiber (MMVF). Environ. Health Perspect. 102 Suppl. 5 (1994), 61-65

Bellmann, B.; Muhle, H.; Creutzenberg, O.; Dasenbrock, C.; Kilpper, R.; McKenzie, J.C.; Morrow, P.; Mermelstein, R.: Lung clearance and retention of toner, utilizing a tracer technique, during chronic inhalation exposure in rats. Fundam. Appl. Toxicol. 17 (1991), 300-313 **Bellmann, B.; Ernst, H.; Kolling, A; Pott, F.:** Histologische und bildanalytische Untersuchungen über die entzündliche und fibrotische Wirkung von Ultrafeinstäuben aus der 19-Stäube-Karzinogenitätsstudie. Abschlussbericht für die Vereinigung der Metall-Berufsgenossenschaften, Düsseldorf. 15. März 2006.

Berger, J.O.: Could Fisher, Jeffreys and Neyman have agreed on testing? Statistical Science 18 (2003), 1-32

Bhatia, R., Lopipero, P., Smith, A.H.: Diesel exhaust exposure and lung cancer. Epidemiology 9 (1998), 84-91

Biau, D.J.; Kerneis, S.; Porcher, R.: Statistics in brief - The importance of sample size in the planning and interpretation of medical research. Clin. Orthop. Relat. Res. 466 (2008), 2282-2288

BlmschV 22 2002: Zweiundzwanzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes. BGBI I 2002, 3626

Bolt, H.M.: Grenzwerte für krebserzeugende Stoffe am Arbeitsplatz. Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed. 43 (2008), 485-493

Bolt, H.M.: Ergebnisse bei SCOEL (*Stand: 2009*). "Folie" aus einem Vortrag beim Workshop "Paradigmenwechsel in der Regulatorischen Toxikologie" am 12.5.2009 in Hannover; veröffentlicht 2009 auf http://www.item.fraunhofer.de

Breslow, N.E.; Day, N.E. (Hrsg.): Statistical Methods in Cancer Research, Volume II: The Design and Analysis of Cohort Studies. IARC Sci. Publ. No. 82. Intern. Agency for Research on Cancer, Lyon 1987

Brown, R.C.: The EU Carcinogen Classification of Refractory Ceramic Fibres: A mistake in hazard identification! Artikel verfügbar auf der Website www.ecfia.eu, Download am 6.3.2009

Brown, R.C., Bellmann, B., Muhle, H., Davis, J.M., Maxim, L.D.: Survey of the biological effects of refractory ceramic fibres: overload and its possible consequences. Ann. Occup. Hyg. 49 (2005), 295-307

Bruch, J.; Landsiedel, R.; Ma-Hock, L.; Pauluhn, J.; Ragot, J.; Wiemann, M.: 4.4. In vivo Test Systems. In: Kuhlbusch, T.A.J.; H.F. Krug; K. Nau (Hrsg.): NanoCare -Health related Aspects of Nanomaterials - Final Scientific Report. DECHEMA e.V., Frankfurt am Main, 2009, S. 48-67

Büchte, S.F.; Morfeld, P.; Wellmann, J.; Bolm-Audorff, U.; McCunney, R.J.; Piekarski, C.; and International Carbon Black Association: Lung cancer mortality and carbon black exposure: a nested case-control study at a German carbon black production plant. J. Occup. Environ. Med. 48 (2006), 1242-1252

Butz, M.: Dokumentation des Berufskrankheiten-Geschehens in Deutschland - Beruflich verursachte Krebserkrankungen. Eine Darstellung der im Zeitraum 1978 bis 2003 anerkannten Berufskrankheiten. HVBG - Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften. Sankt Augustin, 2005

Calliess, C.: Das Vorsorgeprinzip und seine Auswirkungen auf die Nanotechnologie. Vortrag auf dem 24. Trierer Kolloquium zum Umwelt- und Technikrecht, August 2008. Schriftfassung verfügbar von der Website des Sachverständigenrates für Umweltfragen (SRU) - 2008. http://www.umweltrat.de Cardinali, G.; Kovacs, D.; Maresca, V.; Flori, E.; Dell'Anna, M.L.; Campopiano, A.; Casciardi, S.; Spagnoli, G.; Torrisi, M.R.; Picardo, M.: Differential in vitro cellular response induced by exposure to synthetic vitreous fibers (SVFs) and asbestos crocidolite fibers. Exp. Mol. Pathol. 81 (2006), 31-41

Cavallo, D.; Campopiano, A.; Cardinali, G.; Casciardi, S.; De Simone, P.; Kovacs, D.; Perniconi, B.; Spagnoli, G.; Ursini, C.L.; Fanizza, C.: Cytotoxic and oxidative effects induced by man-made vitreous fibers (MMVFs) in a human mesothelial cell line. Toxicology 201 (2004), 219-229

Cheng, Y.S.; Yeh, H.C.; Mauderly, J.L.; Mokler, B.V.: Characterization of diesel exhaust in a chronic inhalation study. Am. Ind. Hyg. Ass. J. 45 (1984), 547-555

Christensen, R.: Testing Fisher, Neyman, Pearson, and Bayes. The American Statistician 59 (2005), 121-126

Chrysotile Institute. Website des Chrysotile Institute, Kanada. Internet-Zugriff am 8.5.2010. http://www.chrysotile.com

Cogliano, V.J.; Baan, R.A.; Straif, K.; Grosse, Y.; Secretan, M.B.; El Ghissassi, F.; Kleihues, P.: The science and practice of carcinogen identification and evaluation. Environ. Health Perspect. 112 (2004), 1269-1274

Costa, D.; Guignard, J.; Zalma, R.; Pezerat, H.: Production of free radicals arising from the surface activity of mineral and oxygen. I. iron mine ores. Toxicol. Ind. Health 5 (1989), 1061-1078

Cullen, R.T.; Searl, A.; Buchanan, D.; Davis, J.M.G.; Miller, B.G.; Jones, A.D.: Pathogenicity of a special-purpose glass microfiber (E glass) relative to another glass microfiber and amosite asbestos. Inhal. Toxicol. 12 (2000), 959-977

Danish EPA (Danish Environmental Protection Agency): Classification of nickel compounds: Danish proposal for an approach to a Group classification. Schreiben vom 20. April 2005 an Classification/Labelling and Export/Import - European Chemicals Bureau - JRC Ispra. Danish Environmental Protection Agency, Kopenhagen, 2005

Dasenbrock, C.; Peters, L.; Creutzenberg, O.; Heinrich, U.: The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. Toxicol. Lett. 110 (1996), 1-7

Davis, J.M.G.; Jones, A.D.: Comparisons of the pathogenicity of long and short fibres of chrysotile asbestos in rats. Br. J. Exp. Pathol. 69 (1988), 717-737

Davis, J.M.G.; Addison, J.; Bolton, R.E.; Donaldson, K.; Jones, A.D.; Smith, T.: The pathogenicity of long versus short fibre sample of amosite asbestos administered to rats by inhalation and intraperitoneal injection. Br. J. Exp. Pathol. 67 (1986), 415-430

Davis, J.M.G.; Brown, D.M.; Cullen, R.T.; Donaldson, K.; Jones, A.D.; Miller, B.G.; McIntosh, C.; Searl, A.: A comparison of methods of determining and predicting the pathogenicity of mineral fibers. Inhal. Toxicol. 8 (1996), 747-770

Dean, A.G.; Dean, J.A.; Coulombier, D.; Brendel, K.A.; Smith, D.C.; Burton, A.H.; Dicker, R.C.; Sullivan, K.; Fagan, R.F.; Arner, T.G.: Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, U.S.A., 1995 **Degussa:** Aluminiumsilikat P820 für Dispersionsfarben und Malerlacke. Schriftenreihe Pigmente Nr. 34. Pig. 34-2-2-882 K. Frankfurt 11, August 1982

Degussa: Über biologische Wirkungen von SiO₂, Al₂O₃ und TiO₂. Schriftenreihe Pigmente Nr. 64. Pig. 64-3-205-583. Frankfurt, Mai 1983a

Degussa: Fällungskieselsäuren und Silikate; Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen. PT 71-0-5-983 He. Frankfurt am Main, 1983b

Degussa: AEROSIL[®]. PT 6-24-2-1084 H. Frankfurt, 1984

Degussa: Hochdisperse Metalloxide nach dem AEROSIL[®]-Verfahren. Schriftenreihe Pigmente Nr. 56. Pig. 56-5-3-289 DD, 4. Aufl. Frankfurt 11, Februar 1989

Degussa: Was ist Ruß? PT 17-15-3-1191 Be, 1991

Degussa: Pigmentruße/Pigment Blacks. Technische Daten/Technical Data. PT 10-27-4-194 Ha Prosp.Nr. 1000/0/1. Frankfurt am Main, 1994

Degussa: Hochdisperses Titandioxid für Sonnenschutzmittel. Technische Information TI 1176. Hanau, Frankfurt/Main, 1996

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft): MAK- und BAT-Werte-Liste 2009. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Mitteilung 45. Weinheim: WILEY-VCH, 2009

Don Porto Carero, A.; Hoet, P.H.; Verschaeve, L.; Schoeters, G.; Nemery, B.: Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). Environ. Mol. Mutagen. 37 (2001), 155-163

Dopp, E.; Saedler, J.; Stopper, H.; Weiss, D.G.; Schiffmann, D.: Mitotic Disturbances and Micronucleus Induction in Syrian Hamster Embryo Fibroblast Cells Caused by Asbestos Fibers. Environ. Health Perspect. 103 (1995), 268-271

Dopp, E.; Yadav, S.; Ansari, F.A.; Bhattacharya, K.; von Recklinghausen, U.; Rauen, U.; Rödelsperger, K.; Shokouhi, B.; Geh, S.; Rahman, Q.: ROS-mediated genotoxicity of asbestos-cement in mammalian lung cells in vitro. Part. Fibre Toxicol. 2 (2005), 1-9

Driscoll, K.E.: Role of inflammation in the development of rat lung tumors in response to chronic particle exposure. Inhal. Toxicol. 8 suppl. (1996), 139-153

Duffus, J.H.: Carcinogenicity classification of vanadium pentoxide and inorganic vanadium compounds, the NTP study of carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide, and vanadium chemistry. Regul. Toxicol. Pharmacol. 47 (2007), 110-114

Eggertson, L.: Asbestos panelists accuse government of misusing science. CMAJ 179 (2008), 886-887

Eickhoff, K.-P.: Bestimmung von Dichte, spezifischer Partikeloberfläche und Partikelgröße. Prüfbericht Nr. B0104014 der Gesellschaft für Oberflächen- und Festkörperuntersuchungen mbH für die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Dortmund (Auftrags-Nr.Z2.2-14120 F1843). Hamburg, 2001

EU (Europäische Union). Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Amtsblatt der Europäischen Union L 353/1-1355. 2008 **Feinendegen, L.:** Biologische Grundlagen. In: Radioaktivität, Röntgenstrahlen und Gesundheit - Strahlenschutz. Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz. Oktober 2006

Fisher, R.A.: Statistical methods and scientific induction. Journal of the Royal Statistical Society / B 17 (1955), 69-78

Garza, K.M.; Soto, K.F.; Murr, L.E.: Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. International Journal of Nanomedicine 3 (2008), 83-94

Gigerenzer, G.: The superego, the ego, and the id in statistical reasoning. In: Keren G., Lewis, C. (Hrsg.) A Handbook for Data Analysis in the Behavioral Sciences, Hills-dale, NJ: Lawrence Erlbaum; 1993, S. 311-339. http://web.archive.org/web/20050308220441/http://www.mpib-berlin.mpg.de/dok/full/gg/ggstehfda/ggstehfda.html

Gigerenzer, G.: Mindless statistics. The Journal of Socio-Economics 33 (2004), 587-606

Gigerenzer, G.; Krauss, S.; Vitouch, O.: The null ritual - what you always wanted to know about significance testing but were afraid to ask. In: D. Kaplan (Hrsg.). The Sage handbook of quantitative methodology for the social sciences. Thousand Oaks, CA: Sage. 2004. S. 391-408

Gill, J.: How do we do hypothesis testing? University of California, Davis. jgill@ucdavis.edu. http://www.stats.org.uk/statistical-inference/Gill.pdf (ohne Datum)

Glaser, U.; Hochrainer, D.; Klöppel, H.; Oldiges, H.: Carcinogenicity of sodium dichromate and chromium (VI/III) oxide aerosols inhaled by male wistar rats. Toxicol-ogy 42 (1986), 219-232

Glaser, U.; Hochrainer, D.; Otto, F.J.; Oldiges, H.: Carcinogenicity and toxicity of four cadmium compounds inhaled by rats. Toxicol. Environ. Chem. 27 (1990), 153-162

Gold, L.S.; Manley, N.B.; Slone, T.H.; Rohrbach, L.; Garfinkel, G.B.: Supplement to the Carcinogenic Potency Database (CPDB): Results of Animal Bioassays Published in the General Literature through 1997 and by the National Toxicology Program in 1997-1998. Toxicol. Sci. 85 (2005), 747-808

Gold, L.S.; Ames, B.N.; Slone, T.H.: Animal Cancer Tests and Human Cancer Risk: A Broad Perspective. http://potency.berkeley.edu/MOE.html, September 2008

Greim, H. (Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologischarbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen) der Senatskommisssion zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Allgemeiner Staubgrenzwert. Loseblattsammlung, 25. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH, 1997

Greim, H. (Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologischarbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). Änderung der Einstufung krebserzeugender Arbeitsstoffe. abgeschlossen am 31.03.1998. Loseblattsammlung, 26. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH, 1998

Greim, H. (Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologischarbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). Industrieruße (Carbon black) in Form atembarer Stäube. abgeschlossen am 02.03.1999. Loseblattsammlung, 29. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH, 1999 **Greim, H. (Hrsg.):** Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologischarbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). Änderung der Einstufung krebserzeugender Arbeitsstoffe. Nachtrag 2000. Loseblattsammlung, 30. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH, 2000

Greim, H. (Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen) der Senatskommisssion zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Nickel und Nickelverbindungen (in Form atembarer Stäube/Aerosole). Loseblattsammlung, 32. Lieferung 2001. Wiley-VCH, Weinheim. 2001

Greim, H. (Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen) der Senatskommisssion zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Dieselmotor-Emissionen. Loseblattsammlung, 45. Lieferung 2008. Wiley-VCH, Weinheim. 2008

Greim, H.; Ziegler-Skylakakis, K.: Risk assessment for biopersistent granular particles. Inhal. Toxicol. 19 suppl. 1 (2007), 199-204

Greim, H.; Borm, P.; Schins, R.; Donaldson, K.; Driscoll, K.; Hartwig, A.; Kuempel, E.; Oberdörster, G.; Speit, G.: Toxicity of fibers and particles - Report of the workshop held in Munich, Germany, 26 - 27 October 2000. Inhal. Toxicol. 13 (2001), 737-754

Groch, K.M.; Khan, M.A.; Brooks, A.L.; Saffer, J.D.: Lung cancer response following inhaled radon in the A/J and C57BL/6J mouse. Int. J. Radiat. Biol. 71 (1997), 301-308

Guldberg, M.; Christensen, V.R.; Krois, W.; Sebastian, K.: Method for determining in-vitro dissolution rates of man-made vitreous fibers. Glastech. Ber. - Glass. 68 (1995), 181-187 (Glastechnische Berichte - Glass Science and Technology)

Gurr, J.R.; Wang, A.S.; Chen, C.H.; Jan, K.Y.: Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. Toxicology 213 (2005), 66-73

Hartwig, A. (Hrsg.): Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologischarbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen) der Senatskommisssion zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Titandioxid (einatembare Fraktion). Loseblattsammlung, 47. Lieferung 2009. Wiley-VCH, Weinheim. 2009

HEI-AR (Health Effects Institute - Asbestos Research, Hrsg.): Asbestos in public and commercial buildings: A literature review and synthesis of current knowledge. Health Effects Institute - Asbestos Research, Cambridge, MA. 1991

Heinrich, U.; Peters, L.; Ernst, H.; Rittinghausen, S.; Dasenbrock, C.; König, H.: Investigation on the carcinogenic effects of various cadmium compounds after inhalation exposure in hamsters and mice. Experimental Pathology 37 (1989), 253-258

Heinrich, U.; Dungworth, D.L.; Pott, F.; Peters, L.; Dasenbrock, C.; Levsen, K.; Koch, W.; Creutzenberg, O.; Schulte, A.: The carcinogenic effects of carbon black particles and tar-pitch condensation aerosol after inhalation exposure of rats. Ann. occup. Hyg. 38 suppl. 1 (1994), 351-356 (Inhaled Particles VII) Heinrich, U.; Fuhst, R.; Rittinghausen, S.; Creutzenberg, O.; Bellmann B.; Koch, W.; Levsen, K.: Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to Diesel engine exhaust, carbon black and titanium dioxide. Inhal. Toxicol. 7 (1995), 533-556

Hesterberg, T.W.: Evaluating the biopersistence of man-made fibers. Handout materials. Workshop "Approaches to evaluating the toxicity and carcinogenicity of man-made fibers. November 11-13, 1991 in Durham, NC, U.S.A.

Hesterberg, T.W.; Barrett, J.C.: Dependence of asbestos- and mineral dust-induced transformation of mammalian cells in culture on fiber dimension. Cancer Res. 44 (1984), 2170-2180

Hesterberg, T.W.; Hart, G.A.: Lung biopersistence and in vitro dissolution rate predict the pathogenic potential of synthetic vitreous fibers. Inhal. Toxicol. 12 Suppl. 3 (2000), 91-97

Hesterberg, **T.W.**; **Hart**, **G.A.**: Synthetic vitreous fibers: a review of toxicology research and its impact on hazard classification. Crit. Rev. Toxicol. 31 (2001), 1-53

Hesterberg, T.W.; Miiller, W.C.; McConnell, E.E.; Chevalier, J.; Hadley, J.G.; Bernstein, D.M.; Thevenaz, P.; Anderson, R.: Chronic inhalation toxicity of sizeseparated glass fibers in Fischer 344 rats. Fund. Appl.Toxicol. 20 (1993), 464-476

Hesterberg, T.W.; Bunn, W.B.; McClellan, R.O.; Hart, G.A.; Lapin, C.A.: Carcinogenicity studies of diesel engine exhausts in laboratory animals: a review of past studies and a discussion of future research needs. Crit. Rev. Toxicol. 35 (2005), 379-411

Hirakawa, K.; Mori, M.; Yoshida, M.; Oikawa, S.; Kawanishi, S.: Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. Free Radic. Res. 38 (2004), 439-447

Howden, P.J.; Faux, S.P.: Fibre-induced lipid peroxidation leads to DNA adduct formation in Salmonella typhimurium TA104 and rat lung fibroblasts. Carcinogenesis 17 (1996), 413-419

HVBG (Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, Hrsg.): Faserjahre. BK-Report 1/94. Sankt Augustin: HVBG. 1994

IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Vol. 42, Silica and Some Silicates.- Lyon: World Health Organization International Agency for Research on Cancer. 1987

IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 49. Chromium, Nickel and Welding. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1990

IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 58, Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1993

IARC (International Agency for Research on Cancer). Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 68. Lyon: IARC, 1997

IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 81. Man-Made Vitreous Fibres. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2002

IARC (International Agency for Research on Cancer). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 86. Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2006

IARC (International Agency for Research on Cancer). Agents Reviewed By The IARC Monographs Volumes 1-96 (Alphabetical Order). Last updated: 30 March 2007. Datei Listagentsalphorder.pdf verfügbar auf http://www.iarc.fr; 2007

Infante, P.F.; Schuman, L.; Dement, J.M.; Huff, J.E.: Fibrous glass and cancer. Commentary. Am. J. industr. Med. 26 (1994), 559-584

Iwai, K.; Adachi, S.; Takahashi, M.; Möller, L.; Udagawa, T.; Mizuno, S.; Sugawara, I.: Early oxidative DNA Damages and late development of lung cancer in Diesel exhaust-exposed rats. Envir. Research A 84 (2000), 255-264

Jacobsen, N.R.; Saber, A.T.; White, P.; Møller, P.; Pojana, G.; Vogel, U.; Loft, S.; Gingerich, J.; Soper, L.; Douglas, G.R.; Wallin, H.: Increased mutant frequency by carbon black, but not quartz, in the lacZ and cll transgenes of muta mouse lung epithelial cells. Environ. Mol. Mutagen. 48 (2007), 451-461

Janssen, Y.M.; Heintz, N.H.; Marsh, J.P.; Borm, P.J.; Mossman, B.T.: Induction of c-fos and c-jun proto-oncogenes in target cells of the lung and pleura by carcinogenic fibers. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 11 (1994), 522-530

Johnson, D.H.: The insignificance of statistical significance testing. Journal of Wildlife Mangement 63 (1999), 763-772

Karlsson, H.L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Möller, L.: Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. Chem. Res. Toxicol. 21 (2008), 1726-1732

Karlsson, H.L.; Gustafsson, J.; Cronholm, P.; Möller, L.: Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. Toxicol. Lett. 188 (2009), 112-118

Kawabata, Y.; Iwai, K.; Udagawa, T.; Tukagoshi, K.; Higuchi, K.: Effects of diesel soot on unscheduled DNA synthesis of tracheal epithelium and lung tumor formation. In: Ishinishi, N.; Koizumi, A.; McClellan, R.O.; Stöber W. (Hrsg.): Carcinogenic and mutagenic effects of Diesel engine exhaust. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Sci. Publ. (Biomedical Div.) 1986, 213-222. (= Developments in Toxicology and Environmental Science. Vol. 13)

Kirkland, D.; Speit, G.: Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo. Mutat. Res. 654 (2008), 114-132

Kirkland, D.; Aardema, M.; Henderson, L.; Müller, L.: Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. Mutat. Res. 584 (2005), 1-256

Kirkland, D.; Aardema, M.; Müller, L.; Makoto, H.: Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and noncarcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. Mutat. Res. 608 (2006), 29-42

Kirkland, D.; Pfuhler, S.; Tweats, D.; Aardema, M.; Corvi, R.; Darroudi, F.; Elhajouji, A.; Glatt, H.; Hastwell, P.; Hayashi, M.; Kasper, P.; Kirchner, S.; Lynch, A.; Marzin, D.; Maurici, D.; Meunier, J.R.; Müller, L.; Nohynek, G.; Parry, J.; Parry, E.; Thybaud, V.; Tice, R.; van Benthem, J.; Vanparys, P.; White, P.: How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. Mutat. Res. 628 (2007a), 31-55

Kirkland, D.J.; Aardema, M.; Banduhn, N.; Carmichael, P.; Fautz, R.; Meunier, J.R.; Pfuhler, S.: In vitro approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive in vitro genotoxicity results. Mutagenesis 22 (2007b), 161-175

Kolling, A.; Ernst, H.; Rittinghausen, S.; Heinrich, U.; Pott, F.: Comparison of primary lung tumor incidences in the rat evaluated by the standard microscopy method and by multiple step sections. Exp. Toxicol. Pathol. 60 (2008), 281-288

Kováciková, Z.; Petrovská, H.; Tátrai, E.; Dusinská, M.: The effect of fibrous dusts on lung cells. In vitro study. Cent. Eur. J. Public Health 12 Suppl (2004), S44-S48

Krug, H.F.: Zitierung unter: "Aktuell (23.10.2009) Risikodiskussion Nanomaterialien: Experten beziehen Stellung". Zitierung auf der Website www.nanopartikel.info und Link zu "7 Fragen zur Pressemitteilung des UBA (Auszug aus der offenen Mail von Prof. H. Krug an das UBA)", Datei Statement_Krug_.pdf. Internet-Zugriff am 27.10.2009

Krug, H.F.; Diabaté, S.; Wörle-Knirsch, J.M.; Mülhopt, S.; Paur, H.-R.: Synthetische Nanoapartikel am Arbeitsplatz und in der Umwelt. Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed. 42 (2007), 4-14

Krug, H.F.; T.A.J. Kuhlbusch and the NanoCare-Consortium: 6. Conclusions. In: Kuhlbusch, T.A.J.; H.F. Krug; K. Nau (Hrsg.): NanoCare - Health related Aspects of Nanomaterials - Final Scientific Report. DECHEMA e.V., Frankfurt am Main, 2009, S. 89-92

Kuhlbusch, T.A.J.; H.F. Krug; K. Nau (Hrsg.): NanoCare - Health related Aspects of Nanomaterials - Final Scientific Report. DECHEMA e.V., Frankfurt am Main, 2009

Landsiedel, R.; Kapp, M.D.; Schulz, M.; Wiench, K.; Oesch, F.: Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations - Many questions, some answers. Mutat. Res. 681 (2009), 241-258

Landsiedel, R.: In vivo Studien für die Sicherheitsbewertung von Nanomaterialien. NanoCare Abschlussveranstaltung am 16. Juni 2009 in Berlin. Pdf-Datei einer Präsentation, verfügbar unter www.nanopartikel.info, Download August 2009

Lee, K.P.; Reinhardt, C.F.: Biological studies on inorganic potassium titanate fibres. In: Biological Effects of Man-Made Mineral Fibres. Proceedings of a WHO/IARC Conference in Association with JEMRB and TIMA. Copenhagen, April 20-22, 1982. Vol. 2. Copenhagen: World Health Organization, Regional Office for Europe 1984. S. 323-333 Lee, M.L.; Barras, C.E.; Griffith, F.D.; Waritz, R.S.; Lapin, C.A.: Comparative pulmonary responses to inhaled inorganic fibers with asbestos and fiberglass. Environ. Res. 24 (1981), 167-191

Lee, K.P.; Trochimowicz, H.J.; Reinhardt, C.F.: Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO2) by inhalation for two years. Toxicol. Appl. Pharmacol. 79 (1985), 179-192

Lee, K.P.; Henry, N.W. III; Trochimowicz, H.J.; Reinhardt, C.F.: Pulmonary response to impaired lung clearance in rats following excessive TiO2 dust deposition. Environ. Res. 41 (1986), 144-167

Limbach, L.K.; Wick, P.; Manser, P.; Grass, R.N.; Bruinink, A.; Stark, W.J.: Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. Environ. Sci. Technol. 41 (2007), 4158-4163

Linnainmaa, K.; Kivipensas, P.; Vainio, H.: Toxicity and cytogenetic studies of ultrafine titanium dioxide in cultured rat liver epithelial cells. Toxicology in Vitro 11 (1997), 329-335

Lohani, M.; Dopp, E.; Becker, H.H.; Seth, K.; Schiffmann, D.; Rahman, Q.: Smoking enhances asbestos-induced genotoxicity, relative involvement of chromosome 1: a study using multicolor FISH with tandem labeling. Toxicol. Lett. 136 (2002), 55-63

Lu, J.; Keane, M.J.; Ong, T.; Wallace, W.E.: In vitro genotoxicity studies of chrysotile asbestos fibers dispersed in simulated pulmonary surfactant. Mutat. Res. 320 (1994), 253-259

Lu, P.J.; Ho, I.C.; Lee, T.C.: Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells. Mutat. Res. 414 (1998), 15-20

Marks, H.M.: Rigorous uncertainty: why RA Fisher is important. International Journal of Epidemiology 32 (2003), 932-937

Martin, J.C.; Daniel, H.; Le Bouffant, L.: Short- and long-term experimental study of the toxicity of coal-mine dust and of some of its constituents. In: Walton, W. (Hrsg.): Inhaled Particles IV, Vol. 1. Oxford: Pergamon Press 1977, 361-371

Mast, R.W.; McConnell, E.E.; Anderson, R.; Chevalier, J.; Kotin, P.; Bernstein, D.M.; Thevenaz, P.; Glas, L.R.; Miiller, W.C.; Hesterberg, T.W.: Studies on the chronic toxicity (inhalation) of four types of refractory ceramic fiber in male Fischer 344 rats. Inhal.Toxicol. 7 (1995a), 425-467

Mast, R.W.; McConnell, E.E.; Hesterberg, T.W.; Chevalier, J.; Kotin, P.; Thevenaz, P.; Bernstein, D.M.; Glas, L.R.; Miiller, W.; Anderson, R.: Multiple-dose chronic inhalation toxicity study of size-separated kaolin refractory ceramic fiber in male Fischer 344 rats. Inhal.Toxicol. 7 (1995b), 469-502

Mauderly, J.L.: Relevance of particle-induced rat lung tumors for assessing lung carcinogenic hazard and human lung cancer risk. Environ. Health Perspect. 105 suppl. 5 (1997), 1337-1346

Mauderly, J.L.; Jones, R.K.; Griffith, W.C.; Henderson, R.F.; McClellan, R.O.: Diesel exhaust is a pulmonary carcinogen in rats exposed chronically by inhalation. Fundam. Appl. Toxicol. 9 (1987), 208-221 McClellan, R.O.; Miller, F.J.; Hesterberg, T.W.; Warheit, D.B.; Bunn, W.B.; Kane, A.B.; Lippmann, M.; Mast, R.W.; McConnell, E.E.; Reinhardt, C.F.: Approaches to evaluating the toxicity and carcinogenicity of man-made fibers: summary of a work-shop held November 11-13, 1991, Durham, North Carolina. Regul. Toxicol. Pharmacol. 16 (1992), 321-364

McConnell, E.K.; Kamstrup, O.; Musselman, R.; Hesterberg, T.W.; Chevalier, J.; Miiller, W.C.; Thevenaz, P.: Chronic inhalation study of size-separated rock and slag wool insulation fibers in Fischer 344/N rats. Inhal. Toxicol. 6 (1994), 571-614

McConnell, E.E.; Mast, R.W.; Hesterberg, T.W.; Chevalier, J.; Kotin, P.; Bernstein, D.M.; Thevenaz, P.; Glass, L.R.; Anderson, R.: Chronic inhalation toxicity of a kaolin-based refractory ceramic fiber in Syrian golden hamsters. Inhal. Toxicol. 7 (1995), 503-532

Melnick, R.L.: A Daubert motion: a legal strategy to exclude essential scientific evidence in toxic tort litigation. Am. J. Public Health 95 (2005), S30-S34

Mohr, U.; Ernst, H.; Roller, M.; Pott, F.: Pulmonary tumor types induced in Wistar rats of the so-called "19-dust study". Exp. Toxicol. Pathol. 58 (2006), 13-20

Monforton, C.: Weight of the evidence or wait for the evidence? Protecting underground miners from diesel particulate matter. Am. J. Public Health 96 (2006), 271-276

Morfeld, P.; Büchte, S.F.; Wellmann, J.; McCunney, R.J.; Piekarski, C.: Lung cancer mortality and carbon black exposure: Cox regression analysis of a cohort from a German carbon black production plant. J. Occup. Environ. Med. 48 (2006), 1230-1241

Mroz, R.M.; Schins, R.P.; Li, H.; Jimenez, L.A.; Drost, E.M.; Holownia, A.; MacNee, W.; Donaldson, K.: Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiationrelated carcinogenesis pathways. Eur. Respir. J. 31 (2008), 241-251

MSHA (Mine Safety and Health Administration). Diesel Particulate Matter Exposure of Underground Metal and Nonmetal Miners. Final rule. Department of Labor. Mine Safety and Health Administration. 30 CFR Part 57. Federal Register 71, 28924-29012. 2006

Muhle, H.; Bellmann, B.; Creutzenberg, O.; Fuhst, R.; Koch, W.; Mohr, U.; Takenaka, S.; Morrow, P.; Kilpper, R.; MacKenzie, J.; Mermelstein, R.: Subchronic inhalation study of toner in rats. Inhal. Toxicol. 2 (1990), 341-360

Muhle, H.; Bellmann, B.; Creutzenberg, O; Dasenbrock, C.; Ernst, H.; Kilpper, R.; MacKenzie, J.C.; Morrow, P.; Mohr, U.; Takenaka, S.; Mermelstein, R.: Pulmonary response to toner upon chronic inhalation exposure in rats. Fundam. Appl. Toxicol. 17 (1991), 280-299

Murata-Kamiya, N.; Tsutsui, T.; Fujino, A.; Kasai, H.; Kaji, H.: Determination of carcinogenic potential of mineral fibers by 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage in mammalian cells. Int. Arch. Occup. Environ. Health 70 (1997), 321-326

Nakagawa, Y.; Wakuri, S.; Sakamoto, K.; Tanaka, N.: The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. Mutat. Res. 394 (1997), 125-132

Nanocare - Konsortium des Projekts NanoCare, gefördert von Bundesministerium für Bildung und Forschung (Hrsg.): Gesundheitsrelevante Aspekte synthetischer Nanomaterialien. Redaktion: Prof. Dr. H. Krug, St. Gallen, Schweiz; Dr. T. Kuhlbusch, Duisburg; Dr. K. Nau, Karlsruhe; Dr. C. Steinbach, Frankfurt am Main; Dr. A. Förster, Frankfurt am Main. Seltersdruck, Selters/Taunus, 2009

Nettesheim, P.; Hanna, M.G.; Doherty, D.G.; Newell, R.F.; Hellman, A.: Effect of calcium chromate dust, influenza virus, and 100 R whole-body X-radiation on lung tumor incidence in mice. J. Natl. Cancer Inst. 47 (1971), 1129-1144

Neumann, H.-G.; Thielmann, H.W.; Gelbke, H.-P.; Greim, H.; Kappus, H.; Norpoth, K.H.; Reuter, U.; Vamvakas, S.; Wardenbach, P.; Wichmann, H.-E.: Vorschläge zur Änderung der Einstufung krebserzeugender Arbeitsstoffe. Abschnitt III der MAK- und BAT-Werte-Liste. Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed. 32 (1997a), 298-304

Neumann, H.-G.; Thielmann, H.W.; Filser, J.G.; Gelbke, H.-P.; Greim, H.; Kappus, H.; Norpoth, K.H.; Reuter, U.; Vamvakas, S.; Wardenbach, P.; Wichmann, H.-E.: Proposed changes in the classification of carcinogenic chemicals in the work area. Regul. Toxicol. Pharmacol. 26 (1997b), 288-295

Neyman, J.: The use of the concept of Power in agricultural experimentation. J. Indian Soc. Agric. Statist. 9 (1957), 9-17

Nikula, K.J.: Rat lung tumors induced by exposure to selected poorly soluble nonfibrous particles. Inhal. Toxicol. 12 (2000), 97-119

Nikula, K.J.; Snipes, M.B.; Barr, E.B.; Griffith, W.C.; Henderson, R.F.; Mauderly, J.L.: Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. Fundam. Appl. Toxicol. 25 (1995), 80-94

Nolan, R.P.; Langer, A.M.; Weisman, I.; Herson, G.B.: Surface character and membranolytic activity of rutile and anatase: two titanium dioxide polymorphs. Br. J. Industr. Med. 44 (1987), 687-698

Nolan, R.P.; Langer, A.M.; Herson, G.B.: Physicochemical properties and membranolytic activities of the titanium dioxide polymorphs compared with those of quartz. In: Wehner, A.P.; Felton, D.L. (Hrsg.): Biological interaction of inhaled mineral fibers and cigarette smoke. Columbus, Ohio: Battelle Memorial Institute 1989, 391-419

NTP (National Toxicology Program). Toxicology and carcinogenesis studies of talc in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice. Technical Report Series No. 421, NIH Publ. No. 93-315, 1993a

NTP (National Toxicology Program): NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of manganese (II) sulfate monohydrate (CAS No. 10034-96-5) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (feed studies). NTP TR 428. NIH Publication No. 94-3159. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institutes of Health, 1993b

NTP (National Toxicology Program): Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Oxide in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice (Inhalation Studies). NTP TR 451. U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service 1996a

NTP (National Toxicology Program): Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Subsulfide in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice. NTP TR 453. U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service 1996b

NTP (National Toxicology Program): Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Sulfate Hexahydrate in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice (Inhalation Studies). NTP TR 454. U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service 1996c

NTP (National Toxicology Program): NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of cobalt sulfate heptahydrate (CAS No. 10026-24-1) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (inhalation studies). NTP TR 471. NIH Publication No. 98-3961. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institutes of Health, 1998

NTP (National Toxicology Program): NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of gallium arsenide (CAS No. 1303-00-0) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (inhalation studies). NTP TR 492. NIH Publication No. 00-3951. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institutes of Health, 2000

NTP (National Toxicology Program): NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F₁ mice (inhalation studies). NTP TR 507. NIH Publication No. 03-4441. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institutes of Health, 2002

Oberdörster, G.: Lung particle overload: Implications for occupational exposures to particles. Reg. Toxicol. Pharmacol. 27 (1995), 123-135

Oberdörster, G.: Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. Inhal. Toxicol. 14 (2002), 29-56

Orthen, B.; Rappolder, M.; Zimmer, R.; Arndt, R.; Kleine-Balderhaar, J.; Lotz, G.; Plitzko, S.; Wardenbach, P.; Wolf, T.; Gundert-Remy, U.; Gürtler, R.; Heinemeyer, G.; Hertel, R.; Krätke, R.; Pfaff, K.; Richter-Reichhelm, H.; Ahlers, J.; Becker, H.; Dubbert, W.; Kolossa-Gehring, M.; Leuschner, C.; Märkel, K.; Marschner, A.: Nanotechnologie: Gesundheits- und Umweltrisiken von Nanomaterialien -Forschungsstrategie. Bundesanstalt für Arbeitsschutz (BAuA), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Umweltbundesamt (UBA). Dezember 2007. www.baua.de/de/Themen-von-A-

Z/Gefahrstoffe/Nanotechnologie/Forschungsstrategie.html

Papageorgiou, I.; Brown, C.; Schins, R.; Singh, S.; Newson, R.; Davis, S.; Fisher, J.; Ingham, E.; Case, C.P.: The effects of nano- and micro-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. Biomaterials 28 (2007), 2946-2958

Pelin, K.; Kivipensas, P.; Linnainmaa, K.: Effects of asbestos and man-made vitreous fibers on cell division in cultured human mesothelial cells in comparison to rodent cells. Environ. Mol. Mutagen 25 (1995), 118-125

Perneger, T.V.: What's wrong with Bonferroni adjustments. British Medical Journal 316 (1998), 1236-1236

Pezerat, H.; Zalma, R.; Guignard, J.; Jaurand, M.C.: Production of oxygen radicals by the reduction of oxygen arising from the surface activity of mineral fibres. In: Bignon, J.; Peto, J.; Saracci, R. (Hrsg.) Non-occupational exposure to mineral fibres (IARC Scientific Publications No. 90), IARC, Lyon (1989) S. 100-110

Poma, A.; Limongi, T.; Pisani, C.; Granato, V.; Picozzi, P.: Genotoxicity induced by fine urban air particulate matter in the macrophages cell line RAW 264.7. Toxicol. in Vitro 20 (2006), 1023-1029

Pope, C.A.; Burnett, R.T.; Thun, M.J.; Calle, E.E.; Krewski, D.; Ito, K.; Thurston, G.D.: Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA 287 (2002), 1132-1141

Pott, F.; Roller, M.: Die krebserzeugende Wirkung von Fasern unter besonderer Berücksichtigung der Inhalationsversuche (Projekt 1217). Hrsg. v. d. Bundesanstalt für Arbeitsschutz, Dortmund.- Dortmund 1993. 87 S.

Pott, F.; Roller, M.: Relevance of non-physiologic exposure routes for carcinogenicity studies of solid particles. In: Toxic and carcinogenic effects of solid particles in the respiratory tract. Hrsg. Mohr, U. et al.- Washington, D.C.: ILSI-Press 1994. S. 109-125. (ILSI-Monographs)

Pott, F.; Roller, M.: Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. Eur. J. Oncol. 10 (2005), 249-281

Pott, F.; Friedrichs, K.H.; Huth, F.: Ergebnisse aus Tierversuchen zur karzinogenen Wirkung faserförmiger Stäube und ihre Deutung im Hinblick auf die Tumorentstehung beim Menschen. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 162 (1976), 467-505

Pott, F.; Schlipköter, H.-W.; Ziem, U.; Spurny, K.; Huth, F.: New results from implantation experiments with mineral fibres. In: Biological effects of man-made mineral fibres. Proceedings of a WHO/IARC Conference 1984, Vol. 2.- Copenhagen: WHO Regional Office for Europe (1984), S. 286-302

Pott, F.; Ziem, U.; Reiffer, F.-J.; Huth, F.; Ernst, H.; Mohr, U.: Carcinogenicity studies on fibres, metal compounds, and some other dusts in rats. Experimental Pathology 32 (1987), 129-152

Pott, F.; Roller, M.; Ziem, U.; Reiffer, F.-J.; Bellmann, B.; Rosenbruch, R.; Huth, F.: Carcinogenicity studies on natural and man-made fibres with the intraperitoneal test in rats. In: J. Bignon, J. Peto und R. Saracci (Hrsg.) Non-occupational Exposure to Mineral Fibres. Lyon: International Agency for Research on Cancer 1989. S. 173-179 (=IARC Scientific Publ. No. 90)

Pott, F.; Bellmann, B.; Muhle, H.; Rödelsperger, K.; Rippe, R.M.; Roller, M.; Rosenbruch, M.: Intraperitoneal injection studies for the evaluation of the carcinogenicity of fibrous phyllosilicates. In: Bignon, J. (Hrsg.) Health Related Effects of Phyllosilicates.-Berlin, Heidelberg: Springer 1990. S. 319-329 (= NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences. Vol. 21)

Pott, F.; Roller, M.; Rippe, R.M.; Germann, P.-G.; Bellmann, B.: Tumours by the intraperitoneal and intrapleural routes and their significance for the classification of mineral fibres. In: Brown, R.C.; Hoskins, J.A.; Johnson, N.F. (Hrsg.). Mechanisms in fibre carcinogenesis. New York, London: Plenum Press, 1991a, S. 547-565. (= NATO ASI series. Series A: Life Sciences. Vol. 223)

Pott, F.; Rippe, R.M.; Roller, M.; Rosenbruch, M.; Huth, F.: Vergleichende Untersuchungen über die Karzinogenität verschiedener Nickelverbindungen und Nickellegierungen. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz - Forschung - Fb 638. Bremerhaven: Wirtschaftsverlag NW, 1991b

Pott, F.; Dungworth, D.L.; Heinrich, U.; Muhle, H.; Kamino, K.; Germann, P.G.; Roller, M.; Rippe, R.-M.; Mohr, U.: Lung tumours in rats after intratracheal instillation of dusts. Ann. Occup. Hyg. 38 Suppl. 1 (1994), 357-363 (Inhaled Particles VII)

Pott, F.; Roller, M.; Althoff, G.-H.: Krebsrisiko durch Fasern - ein zusammenfassender Vergleich von epidemiologischen und tierexperimentellen Daten. In: Umwelthygiene. Bd 27. Medizinisches Institut f.Umwelthygiene, Jahresbericht 1994/95. Hrsg. v. d. Ges. z. Förderung d. Lufthygiene u. Silikoseforschung e.V., Düsseldorf. -Düsseldorf: Stefan W. Albers 1995. S. 133-200

Pott, F.; Roller, M.; Althoff, G.-H.; Höhr, D.; Friemann, J.: Acute lung toxicity of hydrophobic titanium dioxide in an intratracheal carcinogenicity study with nineteen dusts in rats. In: Vostal, J.J. (Hrsg.) Health effects of particulate matter in ambient air. Proc. Intern. Conf. sponsored by the Air & Waste Management Assoc. and the Czech Medical Assoc. J.E. Purkyne, Prague, Czech Republic, April 23-25, 1997. VIP-80. Prague: Czech Medical Assoc. J.E. Purkyne. Pittsburgh, PA: Air and Waste Management Assoc., S. 301-307, 1998a

Pott, F., Althoff, G.-H., Roller, M., Höhr, D., Friemann, J.: High acute toxicity of hydrophobic ultrafine titanium dioxide in an intratracheal study with several dusts in rats. In: Mohr, U. et al. (Hrsg.): Relationships between respiratory disease and exposure to air pollution. ILSI-Monographs. Washington, D.C.: ILSI-Press. S. 270-272, 1998b

Potter, R.M.; Mattson, S.M.: Glass fiber dissolution in a physiological saline solution. Glastech. Ber. 64 (1991), 16-28

Potter, R.M.: Method for determination of in-vitro fiber dissolution rate by direct optical measurement of diameter decrease. Glastech. Ber. - Glass. 73 (2000), 46-55 (Glastechnische Berichte-Glass Science and Technology)

Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin, New York 1994. S. 1474, Stichwort Strahlenwirkung

Rahman, Q.; Lohani, M.; Dopp, E.; Pemsel, H.; Jonas, L.; Weiss, D.G.; Schiffmann, D.: Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. Environ. Health Perspect. 110 (2002), 797-800

Ramdohr, P.; Strunz, H.: Klockmann's Lehrbuch der Mineralogie. Stuttgart: Ferd. Enke Verlag, 1967

Renier, A.; Yegles, M.; Buard, A.; Dong, H.; Kheuang, L.; Saint-Etienne, L.; Laurent, P.; Jaurand, M.C.: Use of mesothelial cell cultures to assess the carcinogenic potency of mineral or man made fibers. Cell Biol. Toxicol. 8 (1992), 133-139

Rice, J.M.; Wilbourn, J.D.: Tumors of the nervous system in carcinogenic hazard identification. Toxicol. Pathol. 28 (2000), 202-214

Riebe-Imre, M.; Aufderheide, M.; Emura, M.; Straub, M.; Roller, M.; Mohr, U.; Pott, F.: Comparative studies with natural and man-made mineral fibres in vitro and in vivo. In: Davis, J.M.G.; Jaurand, M.-C. (Hrsg.) Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibres. Berlin, Heidelberg: Springer; 1994. S. 273-85 (NATO ASI Series. Vol H 85) **Roller, M.:** Risikoabschätzung für die Exposition gegenüber Blaualgen (Cyanobakterien) und ihren Toxinen in Badegewässern. Gutachten erstellt im Auftrag des Niedersächsischen Ministeriums für Frauen, Arbeit und Soziales, Hannover. (2000)

Roller, M.: Risikobetrachtungen bei der Übertragung tierexperimenteller Daten zur Kanzerogenität und Fibrogenität durch Quarz auf den Menschen. In: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA, Ed.) Quarz - Einstufung, Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Workshop vom 07./08. März 2002 in Berlin. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. Tb131. Bremerhaven: Wirtschaftsverlag NW. 2003. S. 174-195

Roller, M.: Quantitative Risikoabschätzung für die Exposition gegenüber Toneremissionen aus Kopiergeräten. Gefahrstoffe - Reinhalt. Luft 66 (2006), 211-216

Roller, M.: Differences between the data bases, statistical analyses, and interpretations of lung tumors of the 19-dust study – two controversial views. Exp. Toxicol. Pathol. 58 (2007), 393-405

Roller, M.: Untersuchungen zur krebserzeugenden Wirkung von Nanopartikeln und anderen Stäuben (Research on the carcinogenicity of nanoparticles and other dusts). Projektnummer F 2083. Dortmund: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, 309 S., 2008.

http://www.baua.de/de/Publikationen/Fachbeitraege/F2083.html

Roller, M.: Carcinogenicity of inhaled nanoparticles. Inhal. Toxicol. 21(S1) (2009), 144-157

Roller, M.: Krebserzeugende Stoffe - zur Frage eines Paradigmenwechsels in der toxikologischen Bewertung experimenteller Daten. In: Eikmann, T., Heinrich, U., Heinzow, B., Konietzka, R. (Hrsg.) Gefährdungsabschätzung von Umweltschadstoffen. Ergänzbares Handbuch toxikologischer Basisdaten und ihre Bewertung. 15. Ergänzungslieferung. B 203 (40 S.). Berlin: Erich Schmidt Verlag. 2010

Roller, M.; Pott, F.: Carcinogenicity of man-made fibres in experimental animals and its relevance for classification of insulation wools. Eur. J. Oncol. 3 (1998), 231-239

Roller, M.; Wardenbach, P.: Risikoabschätzungen für Keramikfasern. VDI-Berichte Nr. 1776 (2003), 75-88

Roller, M.; Pott, F.: Lung tumour risk estimates from rat studies with not specifically toxic granular dusts. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1076 (2006), 266-280

Roller, M.; Csicsaky, M.; Pott, F.: Methoden der Risikoabschätzung aus Daten experimenteller Karzinogenitätsuntersuchungen. Zbl. Hyg. 192 (1992), 479-493

Roller, M.; Pott, F.; Kamino, K.; Althoff, G.-H.; Bellmann, B.: Results of current intraperitoneal carcinogenicity studies with mineral and vitreous fibres. Exp. Toxic. Pathol. 48 (1996), 3-12

Roller, M.; Pott, F.; Kamino, K.; Althoff, G.-H.; Bellmann, B.: Dose-response relationships of fibrous dusts in intraperitoneal studies. Environm. Health Perspect. 105 Suppl. 5 (1997), 1253-1256

Roller, M.; Akkan, Z.; Hassauer, M.; Kalberlah, F.: Risikoextrapolation vom Versuchstier auf den Menschen bei Karzinogenen (Extrapolating the risks of workplace carcinogens from laboratory animals to humans). Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin - Forschung - Fb 1078. Bremerhaven: Wirtschaftsverlag NW. 432 S., 2006. Ausführliche Zusammenfassung (deutsch und englisch, jeweils ca. 20 S.) unter
http://www.baua.de/de/Publikationen/Forschungsberichte/2006/Fb1078.html (deutsch) bzw. http://www.baua.de/en/Publications/Research-reports/2006/Fb1078.html (englisch)

Rossiter, C.E.: WHO consensus questionnaire on validity of methods for assessment of carcinogenicity of man-made fibers. Regul. Toxicol. Pharmacol. 20:3Pt2 (1994), S47-S57

Rossiter, C.E.; Chase, J.R.: Statistical analysis of results of carcinogenicity studies of synthetic vitreous fibers at Research and Consulting Company, Geneva. Ann. Occup. Hyg. 39 (1995), 759-769

Rothman, K. J.: Writing for epidemiology. Epidemiology 9 (1998), 333-337

Sainani, K.L.: Putting p values in perspective. PM&R 1 (2009), 873-877

Sasaki, Y.F.; Sekihashi, K.; Izumiyama, F.; Nishidate, E.; Saga, A.; Ishida, K.; Tsuda, S.: The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. Crit. Rev. Toxicol. 30 (2000), 629-799

Schervish, M.J.: P values: what they are and what they are not. The American Statistician 50 (1996), 203-206

Schnekenburger, J.; Landsiedel, R.; Wiemann, M.; Brill, S.; Bruch, J.; Geiger, D.; Hahn, D.; Kroll, A.; Krug, H.F.; Lehr, C.-M.; Ma-Hock, L.; Mülhopt, S.; Nau, K.; Pauluhn, J.; Paur, H.-R.; Pillukat, M.H.; Ragot, J.; Schäfer, U.F.; Schulze, C.; Tönsing, K.; Wesner, D.; Wiench, K.; Wohlleben, W.; Zünkeler, S.: 4. Toxicological Studies. In: Kuhlbusch, T.A.J.; H.F. Krug; K. Nau (Hrsg.): NanoCare - Health related Aspects of Nanomaterials - Final Scientific Report. DECHEMA e.V., Frankfurt am Main, 2009, S. 22-47

Searl, A.; Buchanan, D.; Cullen, R.T,; Jones, A.D.; Miller, B.G.; Soutar, C.A.: Biopersistence and durability of nine mineral fiber types in rat lungs over 12 months. Ann. Occup. Hyg. 43 (1999), 143-153

SedImeier, P.: Jenseits des Signifikanztest-Rituals: Ergänzungen und Alternativen. Methods of Psychological Research Online Vol.1, No.4 (1996), 41-63

Sichletidis, L.; Chloros, D.; Spyratos, D.; Haidich, A.-B.; Fourkiotou, I.; Kakoura, M.; Patakas, D.: Mortality from occupational exposure to relatively pure chrysotile: a 39-year study. Respiration 78 (2009), 63-68

Silverstein, M.A.; Welch, L.S.; Lemen, R.: Developments in asbestos cancer risk assessment. Am. J. Ind. Med. 52 (2009), 850-858

Stanton, M.F.; Layard, M.; Tegeris, A.; Miller, E.; May, M.; Morgan, E.; Smith, A.: Relation of particle dimension to carcinogenicitys in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. J. Natl. Cancer Inst. 67 (1981), 965-975

Steindorf, K.; Becher, H.: Estimation of unit risk and unit loss of life expectancy in quantitative risk assessment. Informatik, Biometrie und Epidemiologie in Medizin und Biologie 25 (1994), 225-232

Stern, J.A.C.; Smith, G.D.: Sifting the evidence - what's wrong with significance tests? British Medical Journal 322 (2001), 226-231

Struwe, M.; Greulich, K.O.; Suter, W., Plappert-Helbig, U.: The photo comet assay--a fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. Mutat. Res. 632 (2007), 44-57

Sunderman Jr., F.W.: Carcinogenicity of nickel compounds in animals. In: Sunderman, F.W. Jr. (Hrsg.) Nickel in the human environment. IARC Scientific Publications. No. 53. (= Collection Recherche Environnement. No. 23.) - Lyon: International Agency for Research on Cancer 1984. S. 127-142

Takagi, A.; Hirose, A.; Nishimura, T.; Fukumori, N.; Ogata, A.; Ohashi, N.; Kitajima, S.; Kanno, J.: Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J. Toxicol. Sci. 33 (2008), 105-116

Takenaka, S.; Oldiges, H.; König, H.; Hochrainer, D.; Oberdörster, G.: Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in wistar rats. J. Natl. Cancer Inst. 70 (1983), 367-373

Tauber, G.; Hasenzahl, S.; Johnson, R.E.: NIPex® Pigment Blacks for Toner - Technical Information TI 1025. EVONIK INDUSTRIES. http://carbon-black-pigments.evonik.de. Download am 05.05.2010

Thelohan, S.; De Meringo, A.: In vitro dynamic solubility test: influence of various parameters. Environ. Health Perspect. 102 Suppl 5 (1994), 91-96

Thybaud, V.; Aardema, M.; Clements, J.; Dearfield, K.; Galloway, S.; Hayashi, M.; Jacobson-Kram, D.; Kirkland, D.; MacGregor, J.T.; Marzin, D.; Ohyama, W.; Schuler, M.; Suzuki, H.; Zeiger, E.: Expert Working Group on Hazard Identification and Risk Assessment in Relation to In Vitro Testing. Strategy for genotoxicity testing: hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. Mutat. Res. 627 (2007a), 41-58

Thybaud, V.; Aardema, M.; Casciano, D.; Dellarco, V.; Embry, M.R.; Gollapudi, B.B.; Hayashi, M.; Holsapple, M.P.; Jacobson-Kram, D.; Kasper, P.; MacGregor, J.T.; Rees, R.: Relevance and follow-up of positive results in in vitro genetic toxicity assays: an ILSI-HESI initiative. Mutat. Res. 633 (2007b), 67-79

Totsuka, Y.; Higuchi, T.; Imai, T.; Nishikawa, A.; Nohmi, T.; Kato, T.; Masuda, S.; Kinae, N.; Hiyoshi, K.; Ogo, S.; Kawanishi, M.; Yagi, T.; Ichinose, T.; Fukumori, N.; Watanabe, M.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.: Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. Part. Fibre Toxicol. 6:23 (2009), 1-11

TRGS 905. Technische Regeln für Gefahrstoffe. Verzeichnis krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender Stoffe. Ausgabe Juli 2005 (BArbBl. Heft 7/2005, S. 68-78), zuletzt geändert und ergänzt: Mai 2008. http://www.baua.de

Trosić, I.; Brumen, V.; Horvat, D.: In vitro assessment of asbestos fibers genotoxicity. Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 199 (1997), 558-567

Türkez, H.; Geyikoglu, F.: An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the responses of antioxidant enzymes. Toxicol. Ind. Health 23 (2007), 19-23

UBA. Umweltbundesamt (Hrsg.): Durchführung eines Risikovergleichs zwischen Dieselmotoremissionen und Ottomotoremissionen hinsichtlich ihrer karzinogenen und nicht-karzinogenen Wirkungen. Berichte 2/99 - Forschungsbericht 297 61 001/01. Durchführende Inst.: Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolfor-

schung. Bearb.: Mangelsdorf, Inge (Koordination); Aufderheide, Michaela; Boehncke, Andrea; Melber, Christine; Rosner, G.; Höpfner, U.; Borken, J.; Patyk, A.; Pott, F.; Roller, M.; Schneider, K.; Voß, J.-U. Report Nr. UBA FB 99-033. Berlin: Erich Schmidt, 1999

US EPA (U.S. Environmental Protection Agency). Health assessment document for diesel engine exhaust. Prepared by the National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, for the Office of Transportation and Air Quality; EPA/600/8-90/057F. 2002. Available from: National Technical Information Service, Springfield, VA; PB2002-107661, and http://www.epa.gov/ncea

Vu, V.; Barrett, J.C.; Roycroft, J.; Schuman, L.; Dankovic, D.; Baron, P.; Martonen, T.; Pepelko, W.; Lai, D.: Chronic inhalation toxicity and carcinogenicity testing of respirable fibrous particles. Regul. Toxicol. Pharmacol. 24 (1996), 202-212

Wagner, J.C.; Skidmore, J.W.; Hill, R.J.; Griffiths, D.M.: Erionite exposure and mesotheliomas in rats. Br. J. Cancer 51 (1985), 727-730

Wang, Q.E.; Han, C.H.; Yang, Y.P.; Wang, H.B.; Wu, W.D.; Liu, S.J.; Kohyama, N.: Biological effects of man-made mineral fibers (II)--their genetic damages examined by in vitro assay. Ind. Health 37 (1999), 342-347

Wang, J.J.; Sanderson, B.J.; Wang, H.: Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO2 particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutat. Res. 628 (2007a), 99-106

Wang, J.J.; Sanderson, B.J.; Wang, H.: Cytotoxicity and genotoxicity of ultrafine crystalline SiO2 particulate in cultured human lymphoblastoid cells. Environ. Mol. Mutagen. 48 (2007b), 151-157

Wang, J.J.; Wang, H.; Sanderson, B.J.S.: Ultrafine quartz-induced damage in human lymphoblastoid cells in vitro using three genetic damage end-points. Toxicology Mechanisms and Methods 17 (2007c), 223-232

Wardenbach, P.; Rödelsperger, K.; Roller, M.; Muhle, H.: Classification of manmade vitreous fibers: Comments on the revaluation by an IARC working group. Regul. Toxicol. Pharmacol. 43 (2005), 181-193

Warheit, D.B.; Hoke, R.A.; Finlay, C.; Donner, E.M.; Reed, K.L.; Sayes, C.M.: Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO2 particles as a component of nanoparticle risk management. Toxicol. Lett. 171 (2007), 99-110

Watanabe, M.; Okada, M.; Kudo, Y.; Tonori, Y.; Niitsuya, M.; Sato, T.; Aizawa, Y.; Kotani, M.: Differences in the effects of fibrous and particulate titanium dioxide on alveolar macrophages of Fischer 344 rats. J. Toxicol. Environ. Health A 65 (2002), 1047-1060

Weast, R.C.; Lide D.R.; Astle, M.; Beyer, W.H. (Hrsg.): CRC Handbook of Chemistry and Physics. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1989

Wellmann, J.; Weiland, S.K.; Neiteler, G.; Klein, G.; Straif, K.: Cancer mortality in German carbon black workers 1976-98. Occup. Environ. Med. 63 (2006), 513-521

WHO (World Health Organization): WHO Statistical Information System (WHOSIS). WHO Mortality Data Base. Genf: World Health Organization. Last updated February 2010. http://www.who.int/whosis. 2010

Wiemann, M.; Bruch, J.: 4.5. Comparison of in vitro and in vivo Findings. In: Kuhlbusch, T.A.J.; H.F. Krug; K. Nau (Hrsg.): NanoCare - Health related Aspects of Nanomaterials - Final Scientific Report. DECHEMA e.V., Frankfurt am Main, 2009, S. 68-73

Woitowitz, H.-J.; Lange, H.-J.; Dudeck, J.; Rösler J.; Rödelsperger, K.: Zehn Merksätze zur Interpretation von "negativen" Studien in der arbeitsmedizinischen Epidemiologie. Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin 31 (1996), 18-19

Wolff, R.K.; Henderson, R.F.; Snipes, M.B.; Griffith, W.C.; Mauderly, J.L.; Cuddihy, R.G.; McClellan, R.O.: Alterations in particle accumulation and clearance in lungs of rats chronically exposed to diesel exhaust. Fundam. Appl. Toxicol. 9 (1987), 154-166

Xu, A.; Smilenov, L.B.; He, P.; Masumura, K.; Nohmi, T.; Yu, Z.; Hei, T.K.: New insight into intrachromosomal deletions induced by chrysotile in the gpt delta transgenic mutation assay. Environ. Health Perspect. 115 (2007), 87-92

Yang, H.; Liu, Ch.; Yang, D.; Zhang, H.; Xi, Z.: Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. J. Appl. Toxicol. 29 (2009), 69-78

Zhang, Q.; Kusaka, Y.; Sato, K.; Nakakuki, K.; Kohyama, N.; Donaldson, K.: Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals. J. Toxicol. Environ. Health A 53 (1998), 423-438

Zhong, B.Z.; Whong, W.Z.; Ong, T.M.: Detection of mineral-dust-induced DNA damage in two mammalian cell lines using the alkaline single cell gel/comet assay. Mutat. Res. 393 (1997), 181-187

Zoitos, B.K.; De Meringo, A.; Rouyer, E.; Thelohan, S.; Bauer, J.; Law, B.; Boymel, P.M.; Olson, J.R.; Christensen, V.R.; Guldberg, M.; Koenig, A.R.; Perander, M.: In vitro measurement of fiber dissolution rate relevant to biopersistence at neutral ph: an interlaboratory round robin. Inhal. Toxicol. 9 (1997), 525-540

Abkürzungsverzeichnis (Verzeichnis der in Tabellen verwendeten Abkürzungen)

BN	Doppelkernige Zellen (<i>binucleated cells</i>)
D	Mittlerer oder medianer Faserdurchmesser, in um
DWB	Dosis-Wirkungsbeziehung
E-zahl	Faserzahl
	Langzeit-Inhalationsversuch an Ratten
	Langzeit Karzinggonitätsvorsuch mit intranoritongaler Injektion
I.p.	
I.tr.	Intratracheal
L	Mittlere oder mediane Faserlange, in µm
M.	Mutanten
MNBNC	micronucleated binucleate cells
MTT	(Relative) Viabilität gemäß MTT-Assay
MWCNT	Multiwall Carbon Nanotubes
N.	Non-viable cells gemäß Trypan-Blue Assay
n.a.	nicht angegeben
n.g.	nicht gemessen, nicht geprüft
n.n.	Effekt nicht nachweisbar
n.s.	nicht signifikant
nv	non-viable cells
S.	Survival
Т.	Transformation
ТВ	Viabilität oder Population Growth gemäß Trypan Blue Dye-Exclusion
TD25	Dosis, die rechnerisch mit einem Tumorrisiko von 25 % verbunden ist
V.	Viabilität
WI	Wachstumsinhibition
./.	keine Information gefunden