

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

Nitrobenzol

MAK-Begründung, Nachtrag

A. Hartwig^{1,*}, MAK Commission^{2,*}

¹ Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

² Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* E-Mail: A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Keywords: Nitrobenzol; MAK-Wert; maximale Arbeitsplatzkonzentration; Spitzenbegrenzung; Kanzerogenität; Entwicklungstoxizität; Hautresorption; Toxizität

Citation Note: Hartwig A, MAK Commission. Nitrobenzol. MAK Begründung, Nachtrag. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2017 Mai;2(2):729-776]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2026. https://doi.org/10.34865/mb9895d0063_w

Neuveröffentlichung (Online): 07 Aug 2026

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb9895d0063>

Addendum abgeschlossen: 08 Okt 2015

Erstveröffentlichung (Online): 31 Mai 2017

Zur Vermeidung von Interessenkonflikten hat die Kommission *Regelungen und Maßnahmen* etabliert.



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Nitrobenzene¹⁾

[Nitrobenzol]

MAK Value Documentation in German language

A. Hartwig^{1,*}, MAK Commission^{2,*}

DOI: 10.1002/3527600418.mb9895d0063

Abstract

The German Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area has re-evaluated carcinogenicity of nitrobenzene [98-95-3], considering all endpoints. Available publications and unpublished study reports are described in detail.

The genotoxic potential of nitrobenzene is low and might be a result of reactive oxygen species. Long-term studies with exposure by inhalation resulted in a significant increase in liver and kidney adenomas in rats, and lung and mammary adenomas in mice. In severely toxic concentrations a nonsignificant increase in carcinomas was observed, probably resulting from a chronic toxic mechanism, supported by secondary genotoxic or DNA-damaging effects at high doses. In view of other aromatic amines and the known mechanisms of action via phenylhydroxylamine, nitrobenzene is considered to be carcinogenic. Because of the non-linear dose-response relationship of the tumour incidences and as genotoxic effects play a minor part, nitrobenzene is classified in Carcinogen Category 4.

Eye and skin irritation from nitrobenzene is low. The critical effect is the bronchialisation in the lungs of mice in a long-term inhalation study. However, the incidence of bronchialisation at the lowest tested concentration of 5 ml/m³ is too high to calculate a NAEC. One long-term inhalation study in Sprague-Dawley rats resulted in a NOAEC of 1 ml/m³, another one in F344 rats showed minimal extramedullary haematopoiesis in the spleen of males at the lowest tested concentration of 1 ml/m³. Using this concentration as point of departure, a MAK value of 0.1 ml/m³ is calculated, which is far below the LOAEC of the critical effect in the mouse lung.

As the MAK value is derived from a systemic effect, nitrobenzene is assigned to Peak Limitation Category II. Because of the initial half-life of 5 hours, the excursion factor of 4 is set.

Skin contact may contribute significantly to systemic toxicity; therefore, the "H" notation is retained.

Damage to the embryo or foetus is unlikely when the MAK value is observed and thus, the substance is classified in Pregnancy Risk Group C.

Sensitization is not expected from the limited data.

Keywords

Nitrobenzol; Nitrobenzene; Mononitrobenzol; Wirkungsmechanismus; Toxikokinetik; Metabolismus; (sub)akute Toxizität; (sub)chronische Toxizität; Reizwirkung; allergene Wirkung; Reproduktionstoxizität; Fertilität; Entwicklungstoxizität; Genotoxizität; Kanzerogenität; Spitzenbegrenzung; fruchtschädigende Wirkung; krebserzeugende Wirkung; keimzellmutagene Wirkung; Hautresorption; sensibilisierende Wirkung; Arbeitsstoff; maximale Arbeitsplatzkonzentration; MAK-Wert; Toxizität; Gefahrstoff

Author Information

¹ Vorsitzende der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe

² Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

* Email: A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

1) The substance can occur simultaneously as vapour and aerosol.

Nitrobenzol¹⁾

[98-95-3]

Nachtrag 2016

MAK-Wert (2016)	0,1 ml/m³ (ppm) $\triangleq$ 0,510 mg/m³
Spitzenbegrenzung (2016)	Kategorie II, Überschreitungsfaktor 4

Hautresorption (1958)	H
Sensibilisierende Wirkung	–
Krebserzeugende Wirkung (2016)	Kategorie 4
Fruchtschädigende Wirkung (2016)	Gruppe C
Keimzellmutagene Wirkung	–

BLW (2016)	100 µg Anilin (aus Hämoglobinkonjugat freigesetzt)/l Blut
-------------------	--

1 ml/m³ (ppm) $\triangleq$ 5,108 mg/m³	1 mg/m³ $\triangleq$ 0,195 ml/m³ (ppm)
--	--

Es liegt eine Begründung aus dem Jahr 1998 vor. Für eine Einstufung in die Kanzerogenitäts-Kategorie 4 fehlten 1998 Daten zur Ableitung eines MAK-Wertes. Aufgrund neuer Daten, z. B. zum Wirkungsmechanismus und zur Genotoxizität, wird eine Überprüfung der Einstufungen für notwendig erachtet und die Möglichkeit der Ableitung eines MAK-Wertes geprüft.

Allgemeiner Wirkungscharakter

Nitrobenzol hat ein geringes genotoxisches Potenzial, das vermutlich durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, ähnlich wie beim Anilin (Nachtrag „Anilin“ 2007) entsteht. Dies bestätigen die neuen Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung. Nitrobenzol zeigt in vitro in Säugerzellen bei hohen Konzentrationen (≥ 7 µg/ml) ein klastogenes Potenzial und bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ($\geq 0,012$ µg/ml) eine aneugene Wirkung. Im Mutagenitätstest mit Salmonella wirkt Nitrobenzol nicht mutagen. In vivo tritt bei Ratten vor allem in hohen, toxischen Dosierungen nach oraler Gabe eine klastogene Wirkung auf, während nach intraperitonealer Gabe bzw. Inhalation in niedrigen Dosierungen bei Ratten und Mäusen keine derartige Wirkung im Knochenmark induziert wird.

1) Der Stoff kann gleichzeitig als Dampf und Aerosol vorliegen

Nach inhalativer Exposition verursacht Nitrobenzol ab 25 mg/m^3 Adenome und teils Karzinome, die bei Ratten in Leber, Nieren sowie Schilddrüse und bei Mäusen in Lunge und Brustdrüse auftreten. Wie schon in der Begründung aus dem Jahr 1998 dargestellt, werden die Tumoren nicht primär durch genotoxische Mechanismen verursacht, sondern durch eine zytotoxische oder systemisch-toxische Wirkung. So zeigen sich in den betroffenen Organen auch chronisch-toxische Veränderungen (siehe Begründung 1998) bei geringeren Konzentrationen als denen, die zu Tumoren führen. Auch hier lässt sich im Wirkungsmechanismus der Tumorentstehung die Parallele zu Anilin erkennen, wobei die Tumoren bei beiden Stoffen in jeweils verschiedenen Organen entstehen, wie das häufig in dieser Substanzklasse ist.

Nach chronischer inhalativer Exposition treten bei Mäusen ab 5 ml/m^3 Bronchiolarisierung, zentrilobuläre Leberzellvergrößerung, vielkernige Leberzellen, Pigmentierung des olfaktorischen Epithels und bei weiblichen Tieren eine Degeneration des olfaktorischen Epithels auf. F344-Ratten zeigen bei 1 ml/m^3 eine Pigmentierung im Riechepithel und bei den männlichen Tieren Pigmentierung und extramedulläre Hämatopoese der Milz. Sprague-Dawley-Ratten weisen bei dieser Konzentration noch keinen Befund auf, bei 5 ml/m^3 zentrilobuläre Leberzellvergrößerung und Pigmentierung des Riechepithels.

Eine Vielzahl von Studien zeigt eine toxische Wirkung auf die Testes. Beginnend mit reduzierter Spermienzahl und -motilität führt die Exposition gegen Nitrobenzol zum vollständigen Verlust des Keimepithels und zu verminderter Fertilität nach einer Expositionszeit von mehr als zwei Wochen. In einer Zwei-Generationenstudie sind bei den männlichen F1-Nachkommen nach Inhalation von 40 ml/m^3 der Fertilitätsindex, die Testes- und Nebenhodengewichte und die Zahl der Spermien reduziert. In Entwicklungstoxizitätsstudien zeigen sich bei Ratten nach Exposition gegen bis zu 40 ml/m^3 , die höchste getestete Konzentration, keine entwicklungstoxischen Effekte. Bei Kaninchen tritt bei der höchsten Konzentration von 100 ml/m^3 eine erhöhte Anzahl an Resorptionen auf, die nahe der historischen Kontrolle liegt.

Zur haut- und atemwegssensibilisierenden Wirkung beim Menschen liegen keine Daten vor. Ein valider Local Lymph Node Assay an der Maus liefert ein negatives Ergebnis.

Wirkungsmechanismus

Methämoglobinbildung

Bei Ratten tritt nach 90-tägiger inhalativer Exposition bereits ab 5 ml/m^3 eine konzentrationsabhängige Methämoglobinbildung mit einer NOAEC von 1 ml/m^3 auf (CIIT 1984). Die Bildung von Methämoglobin (MetHb) wird hauptsächlich durch den bei der Reduktion von Nitrobenzol entstehenden Metaboliten Phenylhydroxylamin verursacht (Begründung 1998). In den Erythrozyten erfolgt die Rückreaktion von Phenylhydroxylamin zu Nitrosobenzol in einer gekoppelten Reaktion, wobei Methämoglobin gebildet wird (Lehnert und Henschler 1989).

Die Bildung von MetHb durch den Metaboliten Phenylhydroxylamin findet analog zu Anilin statt. Bei Anilin wird über Oxidation, bei Nitrobenzol über Reduktion Phe-

nylhydroxylamin gebildet (Begründung „Monozyklische aromatische Amino- und Nitroverbindungen“ 2003; Neumann 2007). Mit einem Hämoglobin-Bindungsindex (Bindung [mmol/mol Hb] pro Dosis [mmol/kg KG]) von 79 scheint Nitrobenzol bezüglich der Wirkstärke stärker zu sein als Anilin mit einem Hämoglobin-Bindungsindex von 22 (Begründung „Monozyklische aromatische Amino- und Nitroverbindungen“ 2003).

Reaktive Sauerstoffspezies

Bei der reduktiven Metabolisierung des Nitrobenzols zum Phenylhydroxylamin entstehen freie Radikale (siehe Abbildung 1). Diese reaktiven Sauerstoffspezies können bei hohen Dosierungen nicht mehr ausreichend von der Zelle abgefangen werden.

Für die Zwei-Elektronen-Reduktion ist die Nitroreduktase Typ I (Sauerstoff-unempfindlich) verantwortlich. Hingegen ist die Nitroreduktase Typ II für die Ein-Elektronen-Reduktion verantwortlich, die zum Nitro-Radikal-Anion führt, das zurück zur Ausgangssubstanz oxidiert werden kann (Ask et al. 2004). Die quantitative Beteiligung der Nitroreduktasen vom Typ I oder Typ II an der Metabolisierung des Nitrobenzols ist nicht untersucht. Ebenso wie beim Anilin (Nachtrag „Anilin“ 2007) und anderen aromatischen Nitroverbindungen beschrieben (Begründung „Monozyklische aromatische Amino- und Nitroverbindungen“ 2003), wird in stark mit Methämoglobin (MetHb) belasteten Erythrozyten redoxaktives Eisen freigesetzt, das über die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen als Katalysator für Autoxidationsreaktionen zu einer weiteren Bildung von Sauerstoffradikalen beiträgt. Das Redoxgleichgewicht der Erythrozyten wird gestört. Mögliche Folgen sind Membranveränderungen durch Lipidperoxidation, Störung der reversiblen Wechselwirkungen zwischen den Thiolgruppen des Hämoglobins und des Gluthions sowie die Bindung des Hämoglobins an die Membran des Erythrozyten.

Proteinbindung

Der intermediär gebildete Metabolit Nitrosobenzol ist chemisch reaktiv und kann mit Glutathion und den Thiolgruppen cysteinhaltiger Proteine Glutathion- bzw. Protein-Konjugate bilden (Begründung 1998). Für die relativ stabilen Glutathion-Nitrosobenzol-Konjugate wird angenommen, dass sie durch den ganzen Körper transportiert werden, homolytisch in das reaktive Glutathiyl-Radikal gespalten und zum Phenylhydroxylamin reduziert werden können oder dass nach der Umformung zu Glutathion-Sulfinamid das Anilin abgespalten werden kann (Eyer 1979; Eyer und Lierheimer 1980; Eyer und Ascherl 1987; Maples et al. 1990).

Hämoglobin-Addukte sind z. B. in Erythrozyten von Nitrobenzol-behandelten Mäusen nachweisbar (Li et al. 2003).

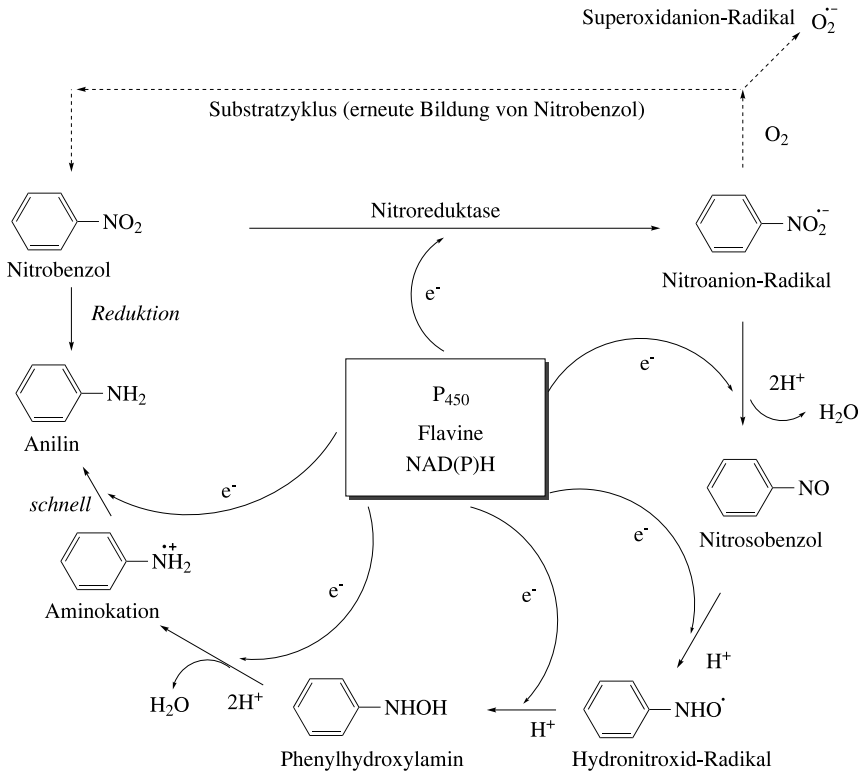


Abb. 1 Mechanismen der mikrosomalen Nitrobenzolreduktion (US EPA 2009)

Genotoxizität

Die aneugene Wirkung des Nitrobenzols wird wahrscheinlich durch Schädigungen des Spindelapparats hervorgerufen. In einem zellfreien System stört Nitrobenzol das Tubulin-Kinesin-Motorsystem mit einer NOAEC von $7,5 \mu\text{M}$ und induziert eine komplette Hemmung bei einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$. Nitrobenzol blockiert die Zusammenlagerung des Tubulins bei 1 mM und führt zu einer Proteindenaturierung bei 3 mM . In V79-Zellen ist das Zytoskelett bis zur Löslichkeitsgrenze von 15 mM nicht geschädigt (Bonacker et al. 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse zur genotoxischen Wirkung von Nitrobenzol ähneln denen von Anilin (Nachtrag Anilin 2007).

Inwieweit die klastogenen Effekte durch direkte Reaktion von Nitrobenzol bzw. seinen Metaboliten mit der DNA durch eine sekundäre Erythrozytentoxizität oder gesteigerte medulläre Erythropoese induziert werden, ist für Nitrobenzol nicht näher untersucht. Für Anilin weisen folgende Untersuchungen auf einen Zusam-

menhang zwischen DNA-Schädigung und Erythrozytentoxizität, Freisetzung von Redox-aktivem Eisen sowie gesteigerter Erythropoese hin (Nachtrag „Anilin“ 2007):

Die klastogenen Effekte treten erst bei Anilin-Dosierungen auf, bei denen bei Ratten deutliche toxische Effekte auf die Erythrozyten und das hämatopoetische System sichtbar sind. Als mögliche Ursachen für die erhöhte Mikronukleusbildung werden zum einen die verkürzte Generationszeit und die schnellere Reifung (mehr mitotische Teilungen) der Erythroblasten vermutet, die zu einer Abnahme der DNA-Reparatur-Effizienz führt (Suzuki et al. 1989), zum anderen ein vermehrtes Auftreten von spontanen DNA-Schäden durch eine gesteigerte Zellproliferation (Kirkland et al. 1992). Zudem können die gekoppelten Kooxidationsreaktionen des Eisens zu oxidativen Schäden im Knochenmark führen. Obwohl es demnach gewichtige Argumente dafür gibt, dass die durch Anilin induzierten klastogenen Effekte sekundären Ursprungs sind, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sehr hohe Dosierungen tatsächlich Chromosomenaberrationen induzieren (Nachtrag „Anilin“ 2007). Durch neue mechanistisch orientierte Arbeiten ist inzwischen bestätigt worden, dass der durch Anilin verursachte oxidative Stress zu einer sekundären genotoxischen Wirkung führt, die die bei hohen Dosen ausgelöste Tumorbildung erklärt (Ma et al. 2008, 2011, 2013; Wang et al. 2010).

Kanzerogenität

Da die genotoxische Wirkung erst in hohen Dosisbereichen auftritt, bei denen in den Tumoren entwickelnden Geweben aber meistens auch chronisch entzündliche, degenerative oder proliferative Veränderungen auftreten, wird die Tumorentstehung auch als Folge einer chronischen Schädigung angesehen (Begründung 1998; SCOEL 2002).

Dies gilt generell für alle aromatischen Amine, bei denen die akut und chronisch toxischen Effekte vor allem im Sinne einer Tumorpromotion eine wesentliche Rolle spielen. Unter anderem ergibt sich eine proliferationssteigernde Wirkung als Folge der toxischen Wirkung in den typischen Zielorganen Milz, Leber und Niere. So zeigt sich auch in den Langzeitversuchen mit Nitrobenzol in allen Geweben, in denen Tumoren entstanden sind, eine chronisch-toxische Veränderung, die mit Entzündungen und erhöhten Proliferationsraten einhergeht. Ungeklärt ist dabei, inwieweit dies Folge einer unspezifischen Zytotoxizität ist, z.B. durch den vermehrten Abbau von Erythrozyten, oder ob dabei spezifische, biochemische Mechanismen, beispielsweise Hemmung oder Steigerung der Apoptose, eine Rolle spielen (Begründung „Monozyklische aromatische Amino- und Nitroverbindungen“ 2003).

Bei Anilin wird angenommen, dass die toxischen Wirkungen durch die N-Oxidationsprodukte Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol ausgelöst werden und oxidativer Stress wesentlicher Bestandteil der Milzschädigung ist. Die Entstehung von freien Radikalen ist mehrfach beschrieben und für weitere aromatische Amino- und Nitroverbindungen bestätigt worden. Bei längerer Exposition gegen Anilin wird fortwährend Eisen freigesetzt, das in der Milz und in Kupferzellen der Leber zu einer Erhöhung des freien Eisens führt. Als Ursache für die Hämolyse oder für das vorzeitige Altern von Erythrozyten wird die Entstehung von Hämoglobinthiyl-Radikalen als Fol-

ge der Umsetzung von Phenylhydroxylamin und Oxyhämoglobin diskutiert. Danach wäre die Freisetzung von Eisen in den Erythrozyten Ursache für die Schädigung und nicht Folge des Abbaus der geschädigten Erythrozyten, was zu dem Auftreten von Häm siderosen an unterschiedlichen Stellen im Organismus passen würde. Gegen die Vorstellung von der „Überforderung der Milz“ durch den Erythrozyten-Abbau spricht die Tatsache, dass die Tumorbildung nicht mit dem Ausmaß der Methämoglobin (MetHb)-Bildung korreliert. So erzeugt Nitrobenzol deutlich mehr MetHb als Anilin und es werden auch die entsprechenden Effekte an der Milz beobachtet, die Tumoren entstehen bei Nitrobenzol im Gegensatz zu Anilin aber nicht in der Milz, sondern in verschiedenen anderen Geweben (Begründung „Monozyklische aromatische Amino- und Nitroverbindungen“ 2003).

Es ist nach wie vor schwierig, die Ursachenkette von MetHb-Bildung, Milztoxizität und Tumorinduktion zu verstehen. Die Tumoren entstehen vermutlich an den Orten mit der größten Zytotoxizität, die sich bei Anilin und Nitrobenzol trotz der teils gleichen Metaboliten deutlich unterscheiden.

Die bei der reduktiven Metabolisierung zum Phenylhydroxylamin entstehenden freien Radikale können bei hohen Dosierungen nicht mehr ausreichend von der Zelle abgefangen werden. Das weist auf das Auftreten von oxidativem Stress (siehe Abbildung 1, Abschnitt „Reaktive Sauerstoffspezies“) in den Zielorganen hin.

Die Speziesunterschiede in der Tumorlokalisation sind vermutlich auf die unterschiedlichen Enzymausstattungen (Ask et al. 2004), Induzierbarkeiten (Wang et al. 1992) und Metabolismuswege (siehe Abschnitt „Toxikokinetik und Metabolismus“) zurückzuführen.

Für Nitrobenzol ist für alle Tumorlokalisationen (d. h. die Zielorgane) bei Ratten eine Aktivität der Nitroreduktase nachgewiesen (Ask et al. 2004). Auch bei Mäusen kann eine Aktivität von Nitroreduktasen in der Leber, jedoch mit anderer Substanzsensitivität (für die Testsubstanz 4-Nitrochinolin-1-oxid), als bei Ratten nachgewiesen werden (Benson 1993). Eine andere Untersuchung zeigt, dass die Nitroreduktasen in der Lunge, nicht aber in der Leber von Mäusen, die gegen polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) exponiert sind, induziert werden (Wang et al. 1992). Eine ältere Studie belegt auch eine Aktivität der Nitroreduktasen in der menschlichen Brustdrüse. Sie beträgt 1/8 der Aktivität der humanen Leber (Green et al. 1956).

Es gibt Nachweise einer Nitroreduktase-Aktivität beim Menschen in den Erythrozyten (Belisario et al. 1996) und in der Leber (Wen et al. 2008), sowie in einer älteren Studie v. a. in Darm und Leber, sowie auch in Ovar, Gallenblase, Muskel, Schilddrüse, Nieren, Blut, Brustdrüse, Gehirn und in geringem Umfang in Milz, Pankreas und Magen (Green et al. 1956). Daher ist davon auszugehen, dass der oben beschriebene Wirkungsmechanismus Humanrelevanz hat.

Zusammengefasst liegen der kanzerogenen Wirkung von Nitrobenzol zwei Mechanismen zugrunde: zum einen die Zytotoxizität in verschiedenen Organen bei unterschiedlichen Spezies, wobei hinsichtlich der kanzerogenen Wirkung die Zielorgane beim Menschen nicht bekannt sind, zum anderen die Erythrozytenschädigungen und die Bildung von Superoxidradikalen. Eingruppiert in die Reihe der aromatischen Amine, der Bildung gleicher Metaboliten wie bei Anilin und einem höheren Hämoglobin-Bindungsindex als bei Anilin, stellt sich Nitrobenzol bei einer Gesamtbetrachtung der Tumoren als Kanzerogen dar. Da zudem auch eine Wirk-

schwelle erkennbar ist, kann Nitrobenzol wie das Anilin bewertet werden, welches in Kanzerogenitäts-Kategorie 4 eingestuft ist (Nachtrag Anilin 2007).

Im Folgenden werden die oben genannten Annahmen bezüglich der einzelnen Tumorklokalisationen diskutiert:

Leber

Die Lebertumoren bei männlichen Ratten (Karzinome nicht signifikant erhöht) treten nur bei der höchsten Konzentration von 25 ml/m³ signifikant erhöht auf (Cattley et al. 1994; CIIT 1993). Die bei Ratten in einer 90-Tage-Inhalationsstudie ab 50 ml/m³ aufgetretenen blassbraunen ca. 1 mm² großen Foci auf der Leberoberfläche werden als Nekrosen gedeutet (CIIT 1984). In der Zwei-Jahre-Inhalationsstudie an F344- und Sprague-Dawley-Ratten werden keine hepatozellulären Nekrosen oder Degenerationen beschrieben, jedoch steigt die Inzidenz der präneoplastischen Foci von eosinophilen Zellen in der Leber wie die der Lebertumoren dosisabhängig an (CIIT 1993; Cattley et al. 1994). Eine Lebervergrößerung und Veränderungen der Leberfunktionen, wie verzögerte Bromosulphophthalein-Exkretion, leicht erhöhte Anzahl der Tiere mit Gelbfärbung (Ikterus) und ein Anstieg des indirekten Bilirubins ist auch bei einer Frau beobachtet worden, die inhalativ gegen Nitrobenzol exponiert war (WHO 2003), so dass die Leber auch beim Menschen als Zielorgan anzunehmen ist.

Es stellt sich die Frage, ob die von Tumoren betroffenen Organe auch Zielorgane der Genotoxizität sind und ob letztere an der Tumorentstehung beteiligt ist. Für die Leber liegen hierzu folgende Daten vor:

Ein Hinweis auf DNA-Reparatur-Synthese (UDS) kann zwar weder in vitro in Hepatozyten von Ratten oder Menschen (Butterworth et al. 1989) noch in vivo nach oraler Aufnahme von bis zu 500 mg/kg KG in der Leber von Ratten nachgewiesen werden (Mirsalis et al. 1982), jedoch werden bei Ratten nach einmaliger oraler Gabe von 310 mg/kg KG DNA-Schäden im Comet-Assay beobachtet (Mattioli et al. 2006).

Ein Mechanismus, der den Anstieg der Inzidenzen von präneoplastischen Foci und Lebertumoren bei Ratten erklären würde, könnte über eine Reduktion der Nitrogruppe und Bildung des Phenylhydroxylamins verlaufen. Als nicht-genotoxische Ursache der Tumorentstehung werden die Reduktion der Nitrogruppe, aber auch oxidative Metaboliten sowie die Kombination von freiem Eisen und reaktiven Sauerstoffspezies (eine weitere Störung des Redoxgleichgewichts) und eine Bindung an Makromoleküle angenommen (Hsu et al. 2007). Eine Bindung an Makromoleküle (DNA) der Leber ist an Mäusen nach intraperitonealer Gabe gezeigt worden (Li et al. 2003), jedoch ist nicht geklärt, ob es sich hierbei um Addukte handelt.

Mäuse weisen allerdings in der Langzeit-Inhalationsstudie im Gegensatz zur Ratte weder Tumoren noch präneoplastische Befunde wie eosinophile Foci auf (CIIT 1993; Cattley et al. 1994). Diese unterschiedlich ausgeprägte Sensitivität zwischen den Spezies und auch den Stämmen ließe sich mit den verschiedenen Metabolismenwegen von F344-Ratten, Sprague-Dawley-Ratten und Mäusen erklären (siehe Abbildung 2, Abschnitt „Toxikokinetik und Metabolismus“) oder auch einer unterschiedlichen Induzierbarkeit der Enzyme bei den Spezies oder auch den Geschlechtern. So lässt sich beispielsweise die Nitroreduktase bei Mäusen nicht in der Leber, aber in der Lunge durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe induzieren (Wang et al.

1992). Unterschiede ergeben sich auch zwischen den Geschlechtern bei der Ratte. So zeigen weibliche im Gegensatz zu männlichen Ratten keine zentrilobuläre Hypertrophie (mit den korrelierenden Schilddrüsenbefunden). Anscheinend findet bei weiblichen Ratten keine Enzyminduktion statt, welche eine Ursache für die zentrilobuläre Hypertrophie sein kann. Ursache dafür, dass bei weiblichen Ratten keine Tumoren entstehen, könnte auch sein, dass die Nitroreduktase bei weiblichen Ratten wohl generell geringer ausgeprägt ist (Aguilar et al. 1987).

Bei der Nitroverbindung Nilutamide (5,5-Dimethyl-3-[4-nitro 3-(trifluoromethyl)phenyl]2,4-imidazolidindion) ist die Bildung von freien Nitro-Anion-Radikalen in der Rattenleber sowie die Bildung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid in Rattenlebermikrosomen, jeweils nur bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten gezeigt worden (Hsu et al. 2007).

Fazit: Die Lebertumoren bei der männlichen Ratte (Karzinome nicht signifikant erhöht) sind vermutlich ein Resultat aus zwei Effekten. Einer davon ist die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, die in hohen Konzentrationen von der Zelle nicht mehr abgefangen werden und dann genotoxisch wirken können. Zudem treten aufgrund der enzyminduzierenden Wirkung des Nitrobenzols zentrilobuläre Hypertrophien auf. Beide Effekte haben sowohl eine Geschlechts- als auch eine Speziespezifität, die vermutlich aus dem unterschiedlichen Metabolismus resultiert. Auch zeigen F344-Ratte und Sprague-Dawley-Ratte sowohl Unterschiede im Metabolismus als auch in der Tumorzinzidenz, die nur bei den F344-Ratten deutlich ausgeprägt ist.

Da beim Menschen ähnlich wie bei der Maus p-Aminophenol sowie seine Konjugate im Urin identifiziert worden sind (US EPA 2009), könnte der humane Metabolismus dem der Maus ähneln, bei der keine Lebertumoren auftreten. Bei der Ratte konnte p-Aminophenol nicht im Urin nachgewiesen werden (siehe auch Abbildung 2, Abschnitt „Toxikokinetik und Metabolismus“). Die Humanrelevanz der Lebertumoren ist unklar, die Leber aber auch beim Menschen Zielorgan der toxischen Wirkung des Nitrobenzols.

Nieren

Nur in der höchsten Konzentrationsgruppe von 25 ml/m³ treten bei männlichen F344-Ratten, nicht aber bei Sprague-Dawley-Ratten, Nierenadenome auf (Karzinome nicht signifikant erhöht). Zudem zeigt sich in dieser Zwei-Jahres-Inhalationsstudie von Cattley et al. (1994) chronische Nephropathie bei fast allen Tieren der Kontroll- und der Behandlungsgruppen und damit bei fast allen männlichen F344- und Sprague-Dawley-Ratten und auch bei den meisten weiblichen F344-Ratten.

Die chronisch progressive Nephropathie (CPN) ist eine spontane, altersbedingte Erkrankung bei Ratten mit einer Prädisposition bei den männlichen Tieren, deren genaue Ätiologie und Pathogenese nicht bekannt ist. Neben dem Alter scheint die Ernährung ein beeinflussender Faktor zu sein, da sich mit einer kalorienreduzierten Diät eine reduzierte Inzidenz zeigt. Die glomeruläre Dysfunktion ist von einer hohen Zellproliferationsrate in den betroffenen Tubuli begleitet, was als erhöhtes Risiko für tubuläre Neoplasien angesehen wird. Aufgrund der Tatsache, dass es keine humane Entsprechung der bei Ratten beobachteten CPN gibt, ist ein Anstieg von tubulären Tumoren zusammen mit einer verstärkten CPN als nicht relevant

für den Menschen anzusehen (Weber et al. 2011). Eine dosisabhängige, mit positiv korreliertem Trend auftretende Hyperplasie des Tubulusepithels ist bei männlichen F344-Ratten nachweisbar, bei denen auch die Anzahl an Nierentumoren signifikant erhöht ist (Cattley et al. 1994).

Da Nierentumoren nur bei männlichen Ratten auftreten, könnten diese aufgrund des α_{2u} -Globulin-Mechanismus entstanden sein (US EPA 1991). Dieser ist jedoch nicht humanrelevant (Swenberg 1993) und wurde für Nitrobenzol außerdem nicht untersucht. Für diese Hypothese spricht, dass eine α_{2u} -Globulin-induzierte Tumorentstehung für 1,3,5-Trinitrobenzol gut untersucht und bestätigt ist. Dagegen spricht, dass nicht alle Kriterien für eine α_{2u} -Globulin-induzierte Tumorentstehung erfüllt sind (Hsu et al. 2007).

Die Nieren zeigen sich auch als Zielorgan für eine mögliche genotoxische Wirkung bei hohen Dosierungen: In primären Nierenzellen von Mensch und Ratte verursacht Nitrobenzol die Bildung von Mikronuklei und ist im Comet-Assay positiv (Robbiano et al. 2004). In vivo führt die orale Gabe von Nitrobenzol ebenfalls zu DNA-Schäden im Comet-Assay (Mattioli et al. 2006; Robbiano et al. 2004) sowie zu Mikronuklei (Robbiano et al. 2004) bei Sprague-Dawley-Ratten. In der Untersuchung von Mattioli et al. (2006) sind männliche Ratten eingesetzt worden, bei Robbiano et al. (2004) ist dies unklar.

Die exponierten männlichen, aber auch die weiblichen F344-Ratten zeigen konzentrationsabhängig ein erhöhtes Auftreten von eosinophilen Tröpfchen in den Tubuli (Cattley et al. 1994). Dieser Befund tritt auch bei einer α_{2u} -Globulin-Nephropathie auf, dann allerdings nicht bei den weiblichen Tieren. Das heißt, dass bei den weiblichen F344-Tieren zwar eine Nierentoxizität verursacht wird, die jedoch nicht zur Tumorbildung führt. Dass auch die männlichen Sprague-Dawley-Ratten keine Tumoren zeigen, könnte sich durch die oben genannten Unterschiede im Metabolismus erklären, wobei die Untersuchung zur Genotoxizität an Sprague-Dawley-Ratten in den Nierenzellen ein positives Ergebnis liefert.

Ein weiterer Mechanismus könnte über die sich in der Nierenrinde befindlichen Prostaglandin-H-Synthetasen verlaufen, die hohe Aktivitäten aufweisen. Durch deren Hydroperoxidase-Aktivität kann es generell zu Kooxidationen von aromatischen Aminen kommen, die dann in die entsprechenden Nitroso- und Nitroderivate überführt werden, was durch eine gekoppelte Redoxreaktion zum Superoxidation und möglicherweise auch zum 8-Oxo-7,8-dihydroguanin führt (Hsu et al. 2007). Jedoch fehlt hier wieder jegliche Begründung, warum nur männliche F344-Ratten Tumoren entwickeln.

Fazit: Die Tumorentwicklung in der Niere von männlichen F344-Ratten ist vermutlich auf oxidativen Stress, kombiniert mit der chronischen progressiven Nephropathie (CPN), zurückzuführen. Nitrobenzol wirkt auch bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten nierentoxisch, induziert aber keine Tumoren, obgleich in Nierenzellen der männlichen Sprague-Dawley-Ratte eine genotoxische Wirkung beobachtet wird. Die Stamm-, Geschlechts- und Speziessensitivität könnte, wie bei der Leber, durch die Unterschiede im Metabolismus verstärkt werden.

Ratten sind aufgrund der altersabhängig auftretenden CPN anfälliger für Effekte an den Nieren als andere Spezies. Aufgrund der Tatsache, dass es keine eindeutige hu-

mane Entsprechung der CPN gibt, ist ein Anstieg an tubulären Tumoren, zusammen mit einer verstärkten CPN, als für den Menschen nicht relevant anzusehen (Weber et al. 2011).

Schilddrüse

Nur die männlichen F344-Ratten weisen Tumoren in der Schilddrüse auf. Dabei ist die Gesamtinzidenz von Adenomen und Karzinomen im Trendtest statistisch signifikant erhöht, nicht aber die von Karzinomen alleine. Bei männlichen B6C3F1-Mäusen tritt nur bei der höchsten Konzentration ein signifikanter Anstieg von Schilddrüsenadenomen auf (CIIT 1993; Cattley et al. 1994).

DNA-Schäden zeigen sich im Comet-Assay in vitro in Schilddrüsenzellen von männlichen Ratten (weibliche sind nicht getestet), aber eine DNA-Reparatur-Synthese (UDS) in Schilddrüsenzellen von männlichen und weiblichen humanen Spendern wird durch Nitrobenzol nicht beobachtet. In vivo führt eine einmalige orale Gabe von $\frac{1}{2}$ der LD_{50} bei männlichen Ratten (weibliche sind nicht getestet) ebenfalls zu DNA-Schäden im Comet-Assay in der Schilddrüse (Mattioli et al. 2006). Die Untersuchungen von Mattioli et al. (2006) bestätigen also, dass die Schilddrüse das Zielorgan für eine mögliche Überladung von reaktiven Sauerstoffspezies ist, die zu den Befunden im Comet-Assay und zu dem Anstieg der Anzahl von Adenomen bei Mäusen und der Adenome und Karzinome bei Ratten geführt haben könnten.

Auch könnte eine mögliche Erklärung für den Entstehungsmechanismus der Schilddrüsenadenome die Induktion von Phase-II-Enzymen in der Leber sein. Durch diese Induktion kommt es zu einem vermehrten Abbau der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) durch Glucuronidierung und Triiodothyronin (T3) durch Sulfatierung. Dem folgt ein kompensatorischer Anstieg des Thyroid stimulierenden Hormons (TSH) mit anschließender Hyperplasie der Follikelzellen (Hsu et al. 2007). Es ist anzunehmen, dass Nitrobenzol bei weiblichen F344-Ratten nicht zu einer entsprechenden Enzyminduktion führt, da die weiblichen Tiere im Gegensatz zu den männlichen keine zentrilobuläre Leberzellvergrößerung zeigen. Auch die Tatsache, dass nur F344-Ratten Tumoren in der Schilddrüse aufweisen, nicht jedoch die Sprague-Dawley-Ratten, entspricht den Befunden an der Leber, bei denen die männlichen F344-Ratten stärker betroffen sind. Auch Mäuse zeigen eine zentrilobuläre Leberzellvergrößerung und reagieren entsprechend mit der Induktion von Schilddrüsenadenomen.

Eine hormonell induzierte Tumorentstehung scheint daher für Nitrobenzol der vorwiegende Mechanismus in der Schilddrüse zu sein, wobei eine erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies bei hohen Konzentrationen zusätzlichen Einfluss auf die Tumorentstehung haben kann.

Fazit: Die Tumoren der Schilddrüse werden auf die Leberhypertrophie und die zentrilobuläre Leberzellvergrößerung als Hinweis für eine Induktion metabolisierender Enzyme und die sich daraus ergebenden Störungen im Metabolismus der Schilddrüsenhormone zurückgeführt. Bezüglich Störungen dieses hormonellen Mechanismus ist der Mensch deutlich weniger empfindlich als die Ratte (Meek et al. 2003), so dass die Tumoren kaum Humanrelevanz haben.

Lunge

Bei männlichen B6C3F1-Mäusen tritt eine statistisch signifikant erhöhte Gesamtinzidenz von Adenomen und Karzinomen, nicht aber von Karzinomen alleine, in der Lunge auf (CIIT 1993; Cattley et al. 1994). Die Inzidenzen liegen im Bereich von historischen Kontrollen, dennoch ist der Dosiseffekt klar erkennbar. Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung von Nitrobenzol an der Lunge liegen nicht vor.

Bei F344-Ratten und Sprague-Dawley-Ratten treten keine Tumorbefunde an der Lunge auf (CIIT 1993; Cattley et al. 1994). Die Ursache für das geschlechtsspezifische und auch speziesspezifische Auftreten der Lungentumoren durch Nitrobenzol bei männlichen Mäusen ist unklar (siehe auch Abschnitt „Kanzerogenität“). Als einzige Substanz induziert Ethylbenzol in einer NTP-Inhalationsstudie ausschließlich bei männlichen Mäusen Lungentumoren („some evidence“), wofür keine Erklärung gegeben wird. In dieser Zusammenstellung der NTP-Daten bleibt auch die unterschiedliche Speziesspezifität bei Ratten und Mäusen unklar (Moore et al. 2013).

Eine Aktivität der Nitroreduktase kann in der Lunge von Ratten nachgewiesen werden (Ask et al. 2004). Auch bei Mäusen ist eine Nitroreduktase-Aktivität in der Lunge nachweisbar, die durch PAKs induzierbar ist (Wang et al. 1992).

Für 4-Nitrophenol, einem Metaboliten von Nitrobenzol, hat sich in Rattenlebermikrosomen eine enzymatische Umsetzung zum 4-Nitrocatechol gezeigt. Die Anwesenheit einer hochaktiven 4-Nitrophenolhydroxylase, die für diesen Schritt verantwortlich ist, kann auch in Mikrosomen der Schaflunge nachgewiesen werden. Die Bildung von Catecholen aus Benzol oder Nitrobenzol könnte eine Ursache für deren mögliche kanzerogene Wirkung sein, da Catechole chemisch reaktiv sind und an zelluläre Makromoleküle binden können (WHO 2003).

Mäuse reagieren vermutlich bezüglich der Entwicklung von Lungentumoren empfindlicher als andere Spezies, da eine minimale Bronchiolarisierung häufig schon bei unbehandelten Mäusen vorliegt (Hedrich 2012). Bei der Bronchiolarisierung befinden sich an der Alveolarwand kubische bis hohe säulenartige Zellen mit einer bronchiolären epithelialen Zelldifferenzierung, wie Zilien-tragende Zellen, Clara-Zellen und Schleimzellen. Dieser Befund tritt bei Mäusen oft nach Exposition gegen Reizstoffe auf (Hedrich 2012).

Die Bronchiolarisierung von Alveolarräumen gibt es auch beim Menschen beim Krankheitsbild der idiopathischen Lungenfibrose – im Sinne einer Epithelialisierung honigwabiger Zysten in Bereichen fibrotischen Umbaus (DePianto et al. 2014). Sie ist als prämaligener Befund anzusehen (Wang et al. 2009).

Da auch beim Menschen aus Fibrosen Lungenkarzinome entstehen, ist dieser Befund bei der Maus per se als humanrelevant zu sehen. In einer Untersuchung an Ratten wird eine Bronchiolarisierung nach inhalativer Exposition gegen Ozon festgestellt (Stockstill et al. 1995), was die These unterstützten würde, dass dieser Befund durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst werden kann.

Nach Inhalation von Nitrobenzol zeigt sich eine deutliche Wirkung auf die Zahl der Tiere mit Bronchiolarisierung, während der Befund bei den Kontrolltieren nicht auftritt. Dieser Befund ist bei weiblichen Tieren genauso hoch ausgeprägt wie bei männlichen, wobei ausschließlich letztere die Tumoren entwickeln. Es fehlt jedoch

eine Graduierung der Effektschwere, so dass keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung abgeleitet werden kann.

Eine bessere Übereinstimmung mit der Geschlechtsspezifität der Lungentumoren hat die bronchio-alveoläre Hyperplasie. Letztere liegt häufig schon bei unbehandelten Mäusen vor, die Inzidenz steigt mit dem Alter und korreliert gewöhnlich mit den bronchio-alveolären Tumoren (Hedrich 2012).

Bei den bei Mäusen auftretenden Lungentumoren handelt es sich meist um die mit hoher Spontaninzidenz auftretenden alveolären Typ-2-Zell-Adenome (Hedrich 2012). Dieser Tumortyp ist beim Menschen früher nur sehr selten aufgetreten, jedoch nehmen in den letzten Jahren die Fallzahlen zu, z. B. auch bei Rauchern von Filterzigaretten. Deshalb wird die Humanrelevanz der in der Mauslunge auftretenden Adenome derzeit kontrovers diskutiert. Hingegen sind es bei der Bronchiolarisierung nicht die alveolären Typ-2-Zellen, welche proliferieren, sondern epitheliale Zellen der terminalen Bronchiolen, die in das angrenzende Lungenparenchym hinein proliferieren (s. o.). Daher wäre es bei den erhöhten Tumorinzidenzen der bronchio-alveolären Tumoren wichtig zu wissen, ob es sich um alveoläre Typ-2-Zell-Adenome/Adenokarzinome (beim Menschen seltener) oder um bronchioläre Adenome/Adenokarzinome der terminalen Atemwegszellen handelt (häufige Tumorausgangszellen beim Menschen). Diese Informationen sind jedoch nicht vorhanden.

Fazit: Die Lungentumoren bei männlichen Mäusen liegen im Bereich der historischen Kontrolle, wenn auch ein dosisabhängiger Anstieg zu beobachten ist. Auch zeigen die Mäuse eine Bronchiolarisierung, die als Reaktion auf die Reizwirkung eines Stoffes und auch als präkanzero gener Effekt angesehen werden kann, wobei dieser Befund bei den weiblichen, keine Tumoren entwickelnden Tieren genauso stark ausgeprägt ist wie bei den männlichen Tieren.

Eine bessere Übereinstimmung mit den Tumorbefunden, die nur bei den männlichen Tieren auftreten, hat die bronchio-alveoläre Hyperplasie. Bei den bei der Maus auftretenden Lungentumoren handelt es sich meist um die mit hoher Spontaninzidenz auftretenden alveolären Typ-2-Zell-Adenome deren Humanrelevanz derzeit kontrovers diskutiert wird.

Die erhöhte Tumorinduktion ist vermutlich auf oxidativen Stress (reaktive Sauerstoffspezies), kombiniert mit einer möglicherweise spezies- und geschlechtsspezifischen toxischen Wirkung, zurückzuführen. Oxidativer Stress kann auch zu einer Reizwirkung führen. Die Humanrelevanz dieser Vorgänge ist unklar.

Brustdrüse

Adenokarzinome der Brustdrüse bei der Maus haben eine hohe Spontaninzidenz (Haseman et al. 1998), die möglicherweise durch die Toxizität von Nitrobenzol bei hohen Konzentrationen verstärkt wird. Andere Informationen zum Entstehungsmechanismus liegen nicht vor.

Reproduktionstoxizität

Die durch Nitrobenzol hervorgerufene Störung der männlichen Reproduktionsorgane scheint von einer Wirkung auf die Sertolizellen auszugehen. Andere Unter-

suchungen zeigen, dass Apoptose die Ursache des durch Nitrobenzol verursachten Verlustes der Keimzellen ist. Es wird spekuliert, dass von den Sertolizellen freigesetzte Faktoren dies stimulieren. Auch der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies kann nicht ausgeschlossen werden (US EPA 2009).

Toxikokinetik und Metabolismus

Nitrobenzol wird bei Mensch und Tier rasch inhalativ, oral und dermal aufgenommen, jedoch nur langsam vor allem mit dem Urin ausgeschieden (Begründung 1998).

An der Reduktion von Nitrobenzol zu Nitrosobenzol sind vor allem nach oraler Aufnahme auch Darmbakterien beteiligt. Die in Lunge, Leber und Niere nachgewiesenen Nitroreduktasen spielen vorwiegend nach inhalativer Exposition eine Rolle bei der Reduktion von Nitrosobenzol zu Phenylhydroxylamin.

Wie schon in der Begründung von 1998 dargestellt, gibt es deutliche Unterschiede im Metabolismus zwischen den Spezies und auch den einzelnen Ratten-Stämmen (siehe Abbildung 2).

So konnten beispielsweise p-Aminophenol und seine Konjugate nach oraler Exposition als Hauptmetaboliten im Urin von Kaninchen, Mäusen und auch beim Menschen nachgewiesen werden, jedoch nicht bei F344- oder CD-Ratten (US EPA 1985).

Bei sechsständiger inhalativer Exposition von Freiwilligen gegen 1 bis 6 ml Nitrobenzol/m³ fand sich 6 bis 37% als 4-Nitrophenol im Urin. 4-Aminophenol wurde nicht gefunden. Die initiale Halbwertszeit der Ausscheidung von 4-Nitrophenol mit dem Urin betrug fünf Stunden, die terminale 60 Stunden, was auf eine Akkumulation während der Arbeitswoche hindeutet. Bei intravenöser Gabe von ¹⁴C-Nitrobenzol an Freiwillige wurden 60% der Dosis mit einer Halbwertszeit von 20 Stunden mit dem Urin ausgeschieden (IARC 1996). Die Halbwertszeit der Ausscheidung von p-Nitrophenol und p-Aminophenol im Urin von Ratten, die acht Stunden lang inhalativ gegen 25 ml/m³ exponiert wurden, liegt auch im Bereich von 20 Stunden (aus Grafik abgelesen) (Ikeda und Kita 1964).

Erfahrungen beim Menschen

Zur Wirkung von Nitrobenzol auf Haut und Schleimhäute, zur allergenen Wirkung und zu Reproduktionstoxizität liegen keine Daten beim Menschen vor.

Einmalige Exposition

Symptome der Nitrobenzolvergiftung sind Brennen in Mund und Rachen, Übelkeit, Erbrechen, Schwindelgefühl, Koordinationsstörungen, Zyanose, Bittermandelgeruch der Ausatemluft, Unruhe, Tachykardie, Blutdruckabfall, Kollaps, Lähmungserscheinungen, Bewusstlosigkeit und Koma. Die durch Nitrobenzol hervorgerufene Methämoglobinbildung setzt innerhalb einer Stunde ein und kann tagelang anhalten. In der Folge kommt es zu hämolytischer Anämie, Ikterus und hypoxischen Schädigungen

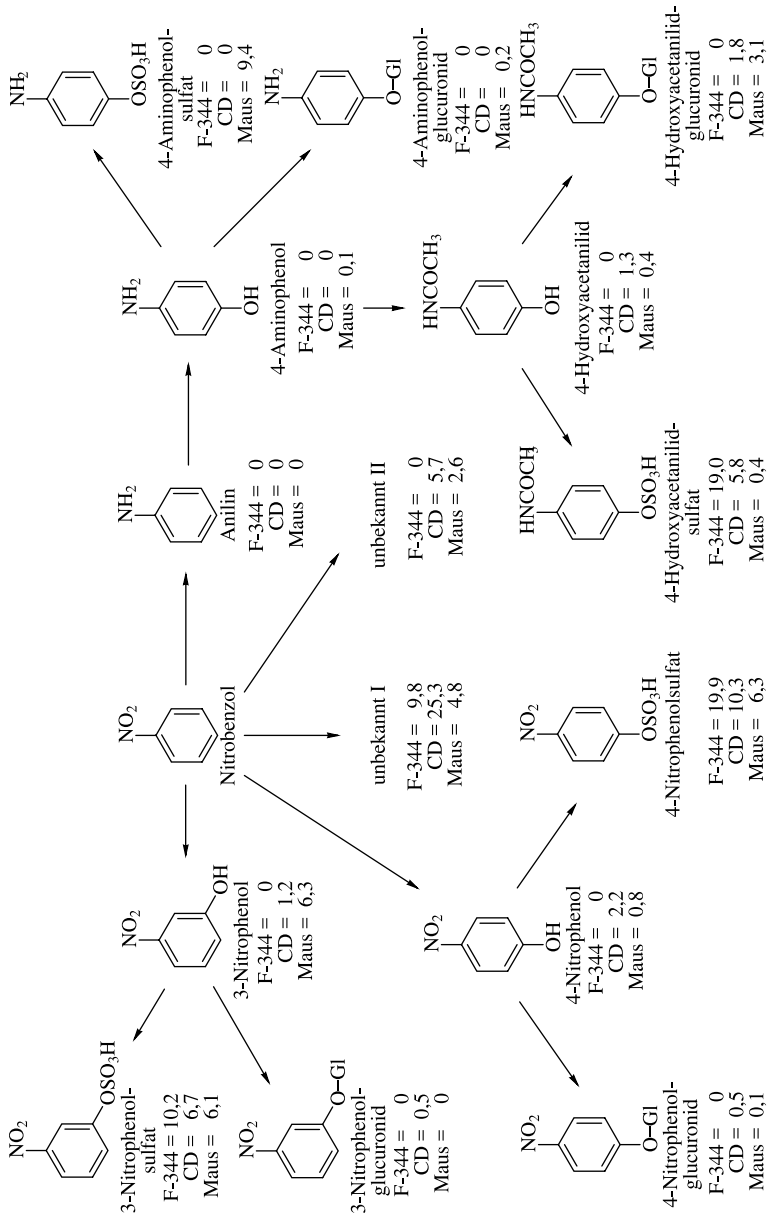


Abb. 2 Metabolisierung von Nitrobenzol bei F344-, CD-Ratten und Mäusen. Angegeben ist der prozentuale Anteil einer Dosis von 225 mg/kg KG im 72-Stunden-Urin. Gl = Glucuronsäure (Begründung 1998).

der inneren Organe. Todesfälle sind nach Einnahme von 5 bis 16 ml Nitrobenzol und nach dermalen Einwirkung beschrieben worden (Begründung 1998).

Neuere, nicht in der Begründung von 1998 aufgeführte Fallbeschreibungen mit den typischen Symptomen einer Nitrobenzolvergiftung gibt es aus Indien von einem fünfjährigen Jungen, der Nitrobenzol-haltige Siebdruckmaterialien (k.w.A.) verschluckt hatte (keine Angabe zum Methämoglobinspiegel) (Gupta et al. 2000), von einem 32-jährigen Mann der nach unfallbedingter Aufnahme eines Färbemittels ein kardiales Lungenödem, Leberschädigungen und einen Methämoglobinspiegel von 65% entwickelte (Agrawal et al. 2011) und von einer 24-jährigen Frau, die nach Aufnahme einer unbekannten Menge Nitrobenzol einen Methämoglobinspiegel von 56,5% aufwies (Chongtham et al. 1999). Bei einem 82-jährigen Mann aus Spanien ergaben sich nach Aufnahme einer Nitrobenzol-haltigen Flüssigkeit ein Methämoglobinspiegel von 70% und eine Nitrobenzolkonzentration im Blut von 3,2 µg/ml. Als Symptome traten Koma, Nierenversagen und ischämische Enzephalopathie auf. Er starb drei Tage nach der Nitrobenzolaufnahme (Martínez et al. 2003).

Wiederholte Exposition

Die Symptome bei chronischer Exposition entsprechen denen nach akuter Vergiftung. Bei Exponierten wurden als LOAEC für die Vergiftungssymptome 40 ml/m³ und als NOAEC 6 ml Nitrobenzol/m³ beschrieben (Begründung 1998).

In einer Nachfolgestudie an gegen o-Toluidin, Anilin und Nitrobenzol exponierten Arbeitern einer Kautschuk herstellenden Fabrik ergaben sich auch später signifikant erhöhte Inzidenzen an Harnblasenkrebs. Die Häufigkeit von Harnblasenkrebs war signifikant mit der kalkulierten kumulativen Exposition korreliert. Die Autoren führten die Tumorentstehung auf die Exposition gegen o-Toluidin zurück (Carreón et al. 2014). Da Angaben zur Höhe der Expositionskonzentrationen fehlen und eine Mischexposition vorlag, können diese und auch die Vorläuferstudien nicht zur Bewertung der kanzerogenen Wirkung von Nitrobenzol beim Menschen herangezogen werden.

Für die Bewertung der Kanzerogenität beim Menschen geeignete Studien gibt es nicht.

Tierexperimentelle Befunde und In-vitro-Untersuchungen

Subakute, subchronische und chronische Toxizität

Inhalative Aufnahme

Zielorgane der Nitrobenzolwirkung waren nach wiederholter Inhalation bei Ratten und Mäusen vor allem Milz, Leber, Nieren, Testes, Nase, Gehirn und Lunge. Diese Wirkungen sind in Tabelle 1 dargestellt. Neue Untersuchungen seit der Begründung von 1998 liegen nicht vor.

Während die Zwei-Jahrestudie an Sprague-Dawley-Ratten eine NOAEC von 1 ml/m³ erbringt, tritt bei F344-Ratten bei 1 ml/m³ im Riechepithel eine Pigmentierung auf. Bei den männlichen F344-Tieren finden sich bei dieser Konzentration

Tab. 1 Bewertungsrelevante Studien mit wiederholter inhalativer Verabreichung von Nitrobenzol

Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe	Exposition	Befunde	Literatur
Ratten, F344, je 10 ♂, ♀	90 Tage, 0, 5, 16, 50 ml/m ³ , 6 h/d, 5 d/w, Ganzkörper- exposition	keine NOAEC; ab 5 ml/m³: ♂, ♀: <u>Milz</u>: akute sinusoidale Kongestion (alle behandelten Tiere); erhöhte Hämosiderin-Pigmentierung, ♂: <u>Blut</u>: MetHb u. Ca²⁺ ↑, <u>Niere</u>: minimale toxische Nephrose; ab 16 ml/m³: ♂: Gesamtbilirubin ↑, <u>Milz</u>: extramedulläre Hämatopoese; fokale Akkumulation von Lymphozyten u. Makrophagen u. Hyperplasie im Stroma, sich erstreckend bis ins Milzparenchym bei 1 ♂, <u>Knochenmark</u>: Hyperplasie, ♀: MetHb ↑, Leber- und Milzgewicht ↑; 50 ml/m³: ♂, ♀: <u>Milz</u>: Größe u. Gew. ↑, Milzkapsel: Fibroblasten-Hyperplasie (10 ♀, 10 ♂), an Serosa-Oberfläche Mesenchymzell-Proliferation umschlossen von einzelliger Schicht differenzierter Mesothelzellen, fokale Akkumulation von Lymphozyten u. Makrophagen u. Hyperplasie im Stroma u. bis ins Milzparenchym (6 ♀, 10 ♂), <u>Leber</u>: Gew. ↑, blassbraune (Nekrosen) u. rote ca. 1 mm² große Foci auf Oberfläche, veränderte Läppchenstruktur, <u>Nieren</u>: mäßige bis schwere toxische Nephrose bei allen Tieren; <u>Nebenniere</u>: Basophilie in Markzellen, <u>Testes</u>: Größe u. Gew. ↓, mäßige bis schwere Degenerationen der Epithelzellen der Hodenkanälchen, Reifungsstopp bei primären u. sekundären Spermatozyten, <u>Nebenhoden</u>: Leydigzell-Hyperplasie, keine reifen Spermien, proteinhaltiges Material im Lumen der Samenleiter; <u>Lymphknoten</u>: Proliferationen von Plasma- u. Mastzellen, Akkumulation von Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen, ♀: <u>Milz</u>: extramedulläre Hämatopoese;	CIIT 1984

Tab. 1 (Fortsetzung)

Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe	Exposition	Befunde	Literatur
Ratten, Sprague Dawley, je 10 ♂, ♀	90 Tage, 0, 5, 16, 50 ml/m ³ , 6 h/d, 5 d/w, Ganzkörper- exposition	keine NOAEC; ab 5 ml/m³: ♂, ♀: <u>Nieren</u>: toxische Nephrose (♂: 0/4/7/10, ♀: 0/0/2/5 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³), <u>Lunge</u>: interstitielle Pneumonitis mit Emphysem ohne klare Dosisabhängigkeit (♂: 1/6/5/5, ♀: 1/5/2/4 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³), Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten in perivaskuläre Bereiche (♂: 2/5/4/7, ♀: 2/3/5/6 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³), <u>Nase</u>: Rhinitis (♂: 0/0/3/5, ♀: 0/0/0/1 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³), Hyperplasie oder Metaplasie von Epithelzellen der vorderen Turbinarien (♂: 0/0/3/6, ♀: 0/0/1/1 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³), Becherzellhyperplasie des vorderen Septums (♂: 0/2/3/6, ♀: 0/0/0/5 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³), ♀: <u>Lunge</u>: reaktive lymphoide Hyperplasie der mes. Lymphknoten: (♀: 2/6/9/9 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³); ab 16 ml/m³: ♂, ♀: Gew. von Milz u. Leber ↑, <u>Milz</u>: Stauung in den kleinen Blutgefäßen, extra-medulläre Hämatopoese, <u>Leber</u>: zentrilobuläre Hypertrophie, vergrößerte Zellkerne, <u>Knochenmark</u>: Hyperplasie der Erythrozyten-bildenden Zellen, ♂: MetHb ↑, <u>Milz</u>: Hämosiderin-Pigmentierung ↑, <u>Nebenniere</u>: Basophilie der medullären Zellen; 50 ml/m³: ♂, ♀: <u>Milz</u>: Anzahl von Lymphozyten u. Makrophagen ↓, Dicke der Milzkapsel ↑, <u>Leber</u>: verstärkte Läppchenzeichnung, Pigmentierung der Kupffer-Zellen ↑, <u>Schilddrüse</u>: Hypertrophie der Kolloid-gefüllten Follikel, ♂: <u>Testes</u>: Größe ↓, Atrophie, Hyperplasie der interstitiellen Zellen, Ödeme, Verlust des Samenepithels (beginnend bei 5 ml/m³: 0/1/2/10 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³), <u>Nebenhoden</u>: völliges Fehlen reifer Spermien (beginnend bei 5 ml/m³: 0/1/0/10 bei 0, 5, 16, 50 ml/m³), ♀: MetHb ↑, Gesamtbilirubin ↑, Alanin-Aminotransferase ↑, Howell-Jolly-Körperchen (Zellkernfragmente in Erythrozyten), <u>Nase</u>: hyperplastische Veränderungen (s. o.)	CIIT 1984

Tab. 1 (Fortsetzung)

Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe	Exposition	Befunde	Literatur
Ratten, F344, je 70 ♂, ♀	2 Jahre, 0, 1, 5, 25 ml/ m ³ , 6 h/d, 5 d/w, je 10 ♂ u. ♀ bereits nach 15 Monaten untersucht, Ganzkörper- exposition	keine NOAEC; ab 1 ml/m³: ♂, ♀: <u>Nase</u> : Riechepithel mit Pigmen- tierung, ♂: <u>Milz</u> : Pigmentierung u. extramedulläre Hämatopoese ↑; ab 5 ml/m³: ♂: <u>Leber</u> : eosinophile Foci u. zentri- lobuläre Leberzellvergrößerung; 25 ml/m³: MetHb ↑, Erythrozytenzahl ↓, Hämatokritwert u. Hämoglobingehalt ↓, ♀: <u>Milz</u> : Pigmentierung, ♂: <u>Leber</u> : Spongiose, <u>Nieren</u> : Hyperplasie im Tubulusepithel; die Inzidenzen der Organveränderungen finden sich in Tabelle 2; chronische Nephropathie (mit Akkumulation von hyalinen/eosinophilen Tröpfchen im Cytoplasma der prox. Tubuluszellen) bei allen Tieren (auch in der Kontrolle), Schweregrad dosisabhängig zunehmend	Cattley et al. 1994
Ratten, Sprague Dawley, 70 ♂	2 Jahre, 0, 1, 5, 25 ml/ m ³ , 6 h/d, 5 d/w, 10 ♂ bereits nach 15 Mona- ten untersucht, Ganzkörper- exposition	1 ml/m³: ♂: NOAEC; ab 5 ml/m³: ♂: <u>Leber</u> : zentrilobuläre Leberzellver- größerung, positiver Trend für eosinophile Foci, <u>Nase</u> : Riechepithel mit Pigmentierung; 25 ml/m³: ♂: MetHb ↑, <u>Leber</u> : Spongiose, <u>Testes</u> : bilaterale Atrophie u. Hypospermie; die Inzidenzen der Organveränderungen finden sich in Tabelle 2; chronische Nephropathie bei allen Tieren (auch in der Kontrolle)	Cattley et al. 1994
Mäuse, B6C3F1, je 10 ♂, ♀	90 Tage, 0, 5, 16, 50 ml/ m ³ , 6 h/d, 5 d/w, Ganzkörper- exposition	keine NOAEC; ab 5 ml/m³: ♂, ♀: <u>Milz</u> : Hämosiderin Pigmentie- rung, extramedulläre Hämatopoese ↑, ♂: <u>Milz</u> : lymphoide Atrophie oder Degeneration, ♀: <u>Milz</u> : akute sinusoidale Stauung, <u>Nebenniere</u> : Vakuolenzahl in Zellen der Zona reticularis deutlich ↑; ab 16 ml/m³: ♂: <u>Milz</u> : akute sinusoidale Stauung; 50 ml/m³: ♂, ♀: MetHb ↑, <u>Milz</u> : Hypertrophie, <u>Knochenmark</u> : Hyperplasie, <u>Lunge</u> : Hyperplasie der bronchialen Mucosa (♂: 0/0/1/7; ♀: 0/2/2/6 bei 0, 5, 16, 50 ml/m ³), ♂: <u>Leber</u> : basophile Hepatozyten mit vergrößerten hypochromatischen, teils vielkernigen Zellkernen, ♀: <u>Leber</u> : zentrilobuläre Hypertrophie, <u>Milz</u> : lymphoide Atrophie oder Degeneration	CIIT 1984

Tab. 1 (Fortsetzung)

Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe	Exposition	Befunde	Literatur
Mäuse , B6C3F1, je 70 ♂, ♀	2 Jahre , 0, 5, 25, 50 ml/ m ³ , 6 h/d, 5 d/w, je 10 ♂ u. ♀ bereits nach 15 Monaten untersucht, Ganzkörper- exposition	keine NOAEC ; ab 5 ml/m³ : ♂, ♀: <u>Lunge</u> : Bronchiolarisierung, <u>Nase</u> : Riechepithel: Pigmentierung, ♂: <u>Leber</u> : zentrilobuläre Leberzellvergrößerung, vielkernige Leberzellen, ♀: <u>Nase</u> : Degeneration des olfaktorischen Epi- thels; 25 ml/m³ : ♂, ♀: <u>Lunge</u> : bronchio-alveoläre Hyperplasie, ♂: MetHb↑, Hämatokritwert ↓, <u>Nase</u> : Degene- ration des olfaktorischen Epithels, <u>Schilddrüse</u> : Follikelzellhyperplasie. <u>Testes</u> : bilaterale Atrophie u. Hypospermie, ♀: <u>Nase</u> : erhöhte Ausscheidung aus respir. Epithel; 50 ml/m³ : ♂, ♀: <u>Nase</u> : Glandularisierung des respir. Epithels, ♂: <u>Nase</u> : erhöhte Ausscheidung aus respir. Epi- thel, <u>Testes</u> : Hypospermie, <u>Niere</u> : Zysten, ♀: <u>Thymus</u> : Involution, <u>Pankreas</u> : mononukleäre Zellinfiltration; die Inzidenzen der Organveränderungen finden sich in Tabelle 3	Cattley et al. 1994

MetHb: Methämoglobin

eine Pigmentierung sowie eine extramedulläre Hämatopoese auch in der Milz. Beide Effekte weisen schon eine hohe Spontaninzidenz auf, werden aber durch die Nitrobenzol-Exposition zumindest bei den männlichen Tieren konzentrationsabhängig verstärkt. Tabelle 2 führt die Inzidenzen der Organbefunde auf und zeigt zudem einen signifikant positiven Trend für die Befunde. Es ergeben sich in der Leber von F344- und Sprague-Dawley-Ratten eosinophile Foci, zentrilobuläre Leberzellvergrößerung (nur männliche Tiere) und Spongiose sowie in der Schilddrüse bei den männlichen F344-Ratten Follikelzell-Hyperplasie und in den Testes bei Sprague-Dawley-Ratten eine bilaterale Atrophie und Hypospermie (Cattley et al. 1994; siehe auch Begründung 1998).

Nitrobenzol verursacht konzentrationsabhängig eine erhöhte Methämoglobinbildung (siehe Tabelle 4).

In der chronischen Studie an Mäusen treten ab der niedrigsten Konzentration von 5 ml/m³ Bronchiolarisierung in der Lunge, zentrilobuläre Leberzellvergrößerung und vielkernige Leberzellen, Pigmentierung des olfaktorischen Epithels und bei den weiblichen Tieren Degeneration des olfaktorischen Epithels auf. Tabelle 3 führt die Inzidenzen der Organbefunde auf und zeigt zudem einen signifikant positiven Trend für die Follikelzellhyperplasie in der Schilddrüse und die Degeneration des olfaktorischen Epithels bei den männlichen Tieren (Cattley et al. 1994, siehe auch Begründung 1998).

Der für die Ableitung eines Grenzwertes kritische Effekt aus den chronischen Studien an Nagern ist die Bronchiolarisierung bei Mäusen. Da die Bronchiolarisierung bei der niedrigsten Konzentration schon eine sehr hohe Inzidenz (87–92% im Gegensatz zu 0% in der Kontrolle) aufweist, ist keine Benchmark-Berechnung möglich.

Zusammengefasst kann keine Konzentration ohne Effekt abgeleitet werden. Die niedrigste LOAEC von 1 ml/m³ resultiert aus der chronischen Studie an F344-Ratten mit einer verstärkten Pigmentierung des Riechepithels sowie bei den männlichen Tieren einer vermehrten Pigmentierung und extramedullären Hämatopoese der Milz.

Orale Aufnahme

Eine toxikologische Bewertung der US EPA (2009) gibt eine Übersicht über die Studien mit wiederholter oraler Aufnahme, die für die Ableitung eines Grenzwertes in Frage kommen. Neue bewertungsrelevante Untersuchungen sind seitdem nicht hinzugekommen. Die Studien zur Toxizität nach oraler Verabreichung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Aus den 90-Tag-Studien an Ratten und Mäusen, die im Rahmen des NTP (National Toxicology Program) durchgeführt wurden, konnte kein NOAEL abgeleitet werden. Der LOAEL beträgt für die Ratte 9,38 mg/kg KG und Tag und für die Maus 18,8 mg/kg KG und Tag. Die systemischen Zielorgane Leber, Niere und hämatologisches System entsprechen denen nach inhalativer Exposition.

Tab. 2 Häufigkeit chronisch-toxischer Effekte bei Ratten (Cattley et al. 1994, siehe auch Begründung 1998)

Befund	Stamm/ Geschlecht	Expositionskonzentration (ml/m ³)			
		0	1	5	25
Leber eosinophile Herde (Foci)	CD ♂	11/63 (17) ^{*T)}	3/67 (4)	8/70 (11)	19/65 (29)*
	F344 ♂	26/69 (42) ^{*T)}	25/69 (36)	44/70 (63)*	57/70 (81)*
	♀	6/70 (9) ^{*T)}	9/66 (14)	13/66 (20)	16/70 (23)*
zentrilobuläre Leber- zellvergrößerung	CD ♂	3/63 (5) ^{*T)}	1/67 (1)	14/70 (20)*	39/65 (60)*
	F344 ♂	0/69 (0) ^{*T)}	0/69 (0)	8/70 (11)*	57/70 (81)*
	♀	0/70 (0)	0/66 (0)	0/66 (0)	0/70 (0)*
Spongiose	CD ♂	25/63 (40) ^{*T)}	25/67 (37)	25/70 (36)	37/65 (57)*
	F344 ♂	25/69 (36) ^{*T)}	24/69 (35)	33/70 (47)	58/70 (83)*
	♀	0/70 (0) ^{*T)}	0/66 (0)	0/66 (0)	6/70 (9)*
Niere chronische Nephro- pathie	CD ♂	54/63 (86)	60/67 (90)	63/70 (90)	59/65 (91)
	F344 ♂	69/69 (100)	64/68 (94)	70/70 (100)	70/70 (100)
	♀	58/70 (83)	51/66 (77)	60/66 (91)	67/70 (96)
Tubulusepithel- Hyperplasie	CD ♂	3/63 (5)	1/67 (1)	5/70 (7)	6/65 (9)
	F344 ♂	2/69 (3) ^{*T)}	2/68 (3)	2/70 (3)	13/70 (19)*
	♀	0/70 (0)	0/66 (0)	2/66 (3)	2/70 (3)
Schilddrüse Follikelzell-Hyper- plasie	CD ♂	2/63 (3)	2/64 (3)	1/68 (1)	4/64 (6)
	F344 ♂	0/69 (0) ^{*T)}	1/69 (1)	2/70 (3)	4/70 (6)
	♀	1/69 (1)	-	-	0/68 (0)
Nase Pigmentierung Riechepithel	CD ♂	42/63 (67) ^{*T)}	49/64 (77)	60/66 (91)*	58/61 (95)*
	F344 ♂	40/67 (60) ^{*T)}	53/67 (79)*	67/70 (96)*	68/69 (99)*
	♀	37/67 (55) ^{*T)}	54/65 (83)*	60/65 (92)*	66/66 (100)*
Testes bilaterale Atrophie	CD ♂	11/62 (18) ^{*T)}	17/66 (26)	22/70 (31)	35/61 (57)*
	F344 ♂	61/69 (88)	50/56 (89)	51/61 (97)	61/70 (87)
	♀	8/60 (13) ^{*T)}	12/65 (20)	15/67 (22)	32/59 (54)*
bilaterale Hypo- spermie	CD ♂	8/60 (13) ^{*T)}	12/65 (20)	15/67 (22)	32/59 (54)*
	F344 ♂	15/69 (22)	21/54 (39)	12/59 (20)	12/70 (17)
	♀	15/69 (22)	21/54 (39)	12/59 (20)	12/70 (17)
Milz extramedulläre Hämatopoese	CD ♂	58/63 (92)	56/67 (84)	61/69 (88)	60/65 (95)
	F344 ♂	53/69 (77)	62/69 (90)*	65/70 (93)*	61/70 (87)
	♀	60/69 (87)	62/66 (94)	60/66 (91)	65/69 (94)
Pigmenteinlagerung	CD ♂	59/63 (94) ^{*T)}	58/67 (87)	67/69 (97)	65/65 (100)
	F344 ♂	55/69 (80) ^{*T)}	63/69 (91)*	64/70 (91)*	70/70 (100)*
	♀	62/69 (90) ^{*T)}	61/66 (92)	60/66 (91)	68/69 (99)*

*signifikant, p <0,05; ^{*T)} signifikanter positiv korrelierter Trend, p <0,05^{a)} Zahlen in Klammern sind Prozentangaben der Inzidenzen

Tab. 3 Häufigkeit chronisch-toxischer Effekte bei B6C3F1-Mäusen (Cattley et al. 1994, siehe auch Begründung 1998)

		Expositionskonzentration (ml/m ³)			
Befund	Geschlecht	0	5	25	50
Lunge	♂	1/68 (1) ^{*T)}	2/67 (3)	8/65 (12) [*]	13/66 (20) ^{*a)}
bronchio-alveoläre Hyperplasie	♀	9/53 (0)	2/60 (3)	5/64 (8) [*]	1/62 (2)
Bronchiolarisierung	♂	0/68 (0) ^{*T)}	58/67 (87) [*]	58/65 (89) [*]	62/66 (94) [*]
	♀	0/53 (0) ^{*T)}	55/60 (92) [*]	63/64 (98) [*]	62/62 (100) [*]
Schilddrüse	♂	1/65 (2) ^{*T)}	4/65 (6)	7/65 (11) [*]	12/64 (19) [*]
Follikelzell-Hyperplasie	♀	2/49 (4) ^{*T)}	1/59 (2)	1/61 (2)	8/61 (13)
Leber	♂	1/68 (1) ^{*T)}	15/65 (23) [*]	44/65 (68) [*]	57/64 (89) [*]
zentrilobuläre Leberzellvergrößerung	♀	0/51 (0) ^{*T)}	0/61 (0)	0/64 (0)	7/62 (11) [*]
vielkernige Leberzellen	♂	2/68 (3) ^{*T)}	14/65 (22) [*]	45/65 (69) [*]	56/64 (88) [*]
	♀	0/51 (0)	0/61 (0)	0/64 (0)	2/62 (3)
Nase	♂	10/67 (15) ^{*T)}	0/66 (0)	0/65 (0)	27/66 (41) [*]
Glandularisierung des respiratorischen Epithels	♀	0/52 (0) ^{*T)}	0/61 (0)	0/63 (0)	7/61 (11) [*]
Erhöhung der Ausscheidung aus dem respiratorischen Epithel	♂	0/67 (0) ^{*T)}	0/66 (0)	3/65 (5)	6/66 (9) [*]
	♀	2/52 (4) ^{*T)}	7/60 (12)	19/63 (30) [*]	32/61 (52) [*]
Degeneration des olfaktorischen Epithels	♂	1/67 (1) ^{*T)}	1/66 (2)	31/65 (49) [*]	41/66 (62) [*]
	♀	0/52 (0) ^{*T)}	19/60 (32) [*]	47/63 (75) [*]	42/61 (69) [*]
Pigmentierung des olfaktorischen Epithels	♂	0/67 (0) ^{*T)}	7/66 (11) [*]	46/65 (71) [*]	49/66 (74) [*]
	♀	0/52 (0) ^{*T)}	6/60 (10) [*]	37/63 (59) [*]	29/61 (48) [*]
Testes					
diffuse Atrophie, Hypospermie	♂	1/68 (1)	–	–	6/66 (9)
Knochen	♂	3/68 (4) ^{*T)}	10/67 (15) [*]	4/64 (6)	13/66 (20) [*]
Hyperzellularität	♀	4/52 (8)	–	–	9/62 (15)
Thymus	♂	10/48 (21)	–	–	10/44 (23)
Involution	♀	7/41 (17)	–	–	22/57 (39) [*]
Niere	♂	2/68 (3)	–	–	12/65 (18) [*]
Zysten	♀	0/51 (0)	–	–	0/62 (0)
Pankreas	♂	3/65 (5)	–	–	3/64 (5)
mononukleäre Zellinfiltration	♀	1/46 (2)	–	–	8/62 (13) [*]

*signifikant, $p < 0,05$; ^{*T)} signifikanter positiv korrelierter Trend, $p < 0,05$ ^{a)} Zahlen in Klammern sind Prozentangaben der Inzidenzen

752 MAK Value Documentations

Tab. 4 Methämoglobinbildung nach verschieden langer inhalativer Aufnahme von Nitrobenzol

Dosis [ml/m ³]	Methämoglobin [%]					
	F344-Ratten		Sprague-Dawley-Ratten		B6C3F1-Mäuse	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
14 Tage	Medinsky und Irons (1985)					
0	0	3,6±2,2	6,9±1,3	4,8±0,7	n. u.	n. u.
10	1,9±0,7	4,8±0,8	6,1±0,5	6,3±0,6	n. u.	n. u.
35	6,6±0,2	6,6±0,8	8,7±1,0	7,3±1,4	n. u.	n. u.
125	11,7±1,2	13,4±2,1	14,0±1,0	31,3±2,5	n. u.	n. u.
90 Tage	CIIT (1984)					
0	1,2±0,8	1,6±0,8	0,6±0,2	2,1±1,2	0,7±0,6	1,3±0,9
5	3,0±1,0*	3,2±0,9	0,9±0,6	2,3±0,6	1,6±0,4	0,8±0,5
16	4,4±1,3*	3,9±1,3*	3,2±0,7*	3,7±0,2	2,1±1,3	2,0±0,6
50	10,1±1,2*	10,5±1,5*	10,1±2,0*	9,6±2,5*	5,8±1,7*	5,1±0,8*
15 Monate	Cattley et al. (1994)					
0	2,9±0,3	2,4±0,4	1,2±3,4	n. u.	n. u.	n. u.
1	3,2±0,2	3,3±0,4	4,1±0,8**	n. u.	n. u.	n. u.
5	3,2±0,4	3,2±0,4	6,2±1,6**	n. u.	n. u.	n. u.
25	4,7±0,5**	5,9±1,0**	5,9±0,8**	n. u.	n. u.	n. u.
24 Monate	Cattley et al. (1994)					
0	3,9±0,3	2,7±0,4	2,8±0,5	n. u.	2,0±0,2	1,4±0,2
1	3,3±0,3	2,1±0,2	2,9±0,3	n. u.	n. u.	n. u.
5	4,2±0,5	2,5±0,3	2,4±0,3	n. u.	1,9±0,3	1,4±0,2
25	5,3±0,3**	5,0±0,5**	4,6±0,5*	n. u.	3,0±0,4	2,2±0,3
50	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	4,0±0,5**	2,8±0,2**

*p < 0,05; **p < 0,01; n. u. = nicht untersucht

Tab. 5 Bewertungsrelevante Untersuchungen mit wiederholter oraler Verabreichung von Nitrobenzol (US EPA 2009)*

Spezies, Stamm, Anzahl pro Gruppe	Exposition	Befunde
Ratte, F344, je 6 ♂, ♀	28 Tage, 0, 5, 25, 125 mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde, 2 Wo Nachbeobachtung	5 mg/kg KG: NOAEL; ab 25 mg/kg KG: Hämoglobin, Hämatokrit u. Erythrozyten ↓, MCV (Hämatokrit/Erythrozytenzahl) u. Leukozyten ↑
Ratte, F344, je 10 ♂, ♀	90 Tage, 0; 9,38; 18,75; 37,5; 75; 150 mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde	9,38 mg/kg KG: LOAEL; ab 9,38 mg/kg KG: ♂, ♀: Lebergewicht ↑, ♂: Hämoglobin ↓, MetHb ↑, Nierengewicht ↑, ♀: Hämoglobin u. Hämatokrit ↓, MetHb u. Retikulozyten ↑; ab 18,75 mg/kg KG: ♂: Hämatokrit und Erythrozyten ↓, Retikulozyten ↑; ab 37,5 mg/kg KG: ♀: Erythrozyten ↓, Nierengewicht ↑; ab 75 mg/kg KG: ♂: Testesgewicht ↓; 150 mg/kg KG: letal für 9 ♂/3 ♀
Maus, B6C3F1, je 10 ♂, ♀	90 Tage, 0; 18,75; 37,5; 75; 150; 300 mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde	18,8 mg/kg KG: LOAEL; ab 18,8 mg/kg KG: ♂, ♀: MetHb ↑, ♀: Lebergewicht ↑, Retikulozyten ↑; ab 37,5 mg/kg KG: ♂: Retikulozyten ↑, ab 75 mg/kg KG: ♂, ♀: Hämoglobin ↓, ab 150 mg/kg KG: ♂: Lebergewicht ↑, 300 mg/kg KG: ♂: Zytemegalie der Leber, ♂: letal für 3 Tiere, Testesgewicht ↓

* nur Endpunkte mit klarer Dosis-Wirkungsbeziehung aufgeführt;

MetHb: Methämoglobin; MCV: mean corpuscular volume (durchschnittliches Volumen eines Erythrozyten)

Allergene Wirkung

In einem validen modifizierten Local Lymph Node Assay (LLNA/IMDS (Integrated Model for the Differentiation of Skin reactions)) an weiblichen NMRI-Mäusen wurde Nitrobenzol in 2%-, 10%- und 50%iger Konzentration in Aceton/Olivenöl (4:1; Applikationsmenge 25 µl/Ohr) getestet. Die untersuchten Parameter waren Lymphknotengewicht, Lymphozytenzahl im Lymphknoten, Ohrschwellung und Ohrgewicht. Keiner der Parameter zeigte gegenüber den Kontrollen einen erhöhten Wert. Der Indexwert für die Lymphozytenzahl betrug für die drei Konzentrationen 0,96; 0,82 bzw. 0,86; ab einem Wert von 1,4 gilt der Test als positiv (ECHA 2014).

Eine ältere Untersuchung zur hautsensibilisierenden Wirkung ist nicht eindeutig zu bewerten. In dieser erhielten sechs Meerschweinchen drei Tage lang, täglich einmal 0,1 ml 10%iges Nitrobenzol in Dimethylformamid auf die Außenseite der Ohren aufgetragen. Am siebten Tag nach Testbeginn wurden 0,2 ml der Zubereitungen in verschiedenen Konzentrationen (keine weiteren Angaben) auf die geschorenen Flanken der Tiere appliziert, ohne dass 24 Stunden später eine Hautreaktion auftrat (Stevens 1967).

Ein weiterer negativer Test mit offener epikutaner Applikation einer 3%igen Zubereitung der Testsubstanz in Aceton zur Induktion und einer 0,3%igen Zubereitung zur Auslösung (Sziza und Magos 1959) ist wegen der unvollständigen Dokumentation nicht zu bewerten.

Reproduktionstoxizität

Fertilität

Inhalative Aufnahme

Nach inhalativer Exposition führte Nitrobenzol in einer Zwei-Generationenstudie an Sprague-Dawley-Ratten bei Konzentrationen ab 40 ml/m³ zu einem verminderten Testes- und Nebenhodengewicht, einer Tubulusatrophie in den Testes sowie Spermatozyten-Degeneration und Vorkommen von Riesenspermatozyten, was eine Verringerung der Fertilität zur Folge hatte. Die NOAEL beträgt 10 ml/m³ (Sammelkapitel „MAK-Werte und Schwangerschaft“ 1991; Begründung 1998).

Orale Aufnahme

Auch nach oraler Gabe erweist sich Nitrobenzol als toxisch für die Reproduktionsorgane. So zeigte sich in einer 90-Tage-Schlundsondenstudie an F344-Ratten und B6C3F1-Mäusen eine Atrophie der Testes (siehe Tabelle 5). Aber auch bei Einzelgabe von 300 mg/kg KG und Tag an F344-Ratten verursachte Nitrobenzol zahlreiche histopathologische Befunde, wie Nekrose des Keimepithels, vielkernige Riesenzellen, Abnahme der Spermien und vorübergehend eingestellte Spermatogenese (US EPA 2009).

Es liegen zwei Untersuchungen zur Fertilität nach oraler Applikation vor.

In der neueren Untersuchung wurden Gruppen von jeweils zehn männlichen Sprague-Dawley-Ratten 60 mg Nitrobenzol/kg KG und Tag mit der Schlundsonde

verabreicht und nach 7, 14, 21, 28, 42, 56 oder 70 Tagen Behandlung erfolgte die Verpaarung mit weiblichen, unbehandelten Tieren. Am Tag nach der Verpaarung wurden Gewicht der Reproduktionsorgane, Spermienmotilität, progressive Spermienmotilität, Spermienzahl und –morphologie untersucht. Erst nach 14 Behandlungstagen waren Testes- und Epididymisgewicht, Spermienzahl, Spermienmotilität und progressive Motilität und nach 21 Tagen auch die Indizes für Spermienlebensfähigkeit und Fertilität signifikant reduziert. Nach 21 Tagen war zudem die Rate abnormaler Spermien erhöht und teils keine Spermienmotilität mehr vorhanden. Der Verpaarungsindex war nur nach 70 Tagen vermindert. Die Autoren schlossen, dass Spermienzahl und –motilität die sensitivsten Parameter für die Toxizität durch Nitrobenzol sind und eine wenigstens 14-tägige Exposition erfolgen muss, bevor Effekte auf die männliche Fertilität der Ratten zu beobachten sind (Kawashima et al. 1995).

In einer nach OECD-Prüfrichtlinie 421 durchgeführten Screeningstudie erhielten zehn männliche und zehn weibliche SD-Ratten pro Dosisgruppe 0, 20, 60 oder 100 mg Nitrobenzol/kg KG und Tag mit der Schlundsonde 14 Tage lang vor der Verpaarung, während der Verpaarung und bis zum vierten Postnataltag, insgesamt 54 Tage lang. Ab 60 mg/kg KG und Tag trat ein signifikant vermindertes Gewicht der Testes und der Epididymis auf. Histopathologisch war eine dosisabhängige Atrophie der Testes (0/10, 1/10, 10/10 und 10/10 bei 0, 20, 60 bzw. 100 mg/kg KG und Tag) sowie ab 60 mg/kg KG und Tag Leydigzellhyperplasie und Verlust der intraluminale Spermien in den Epididymis zu beobachten. Effekte auf die Nachkommen zeigten sich am 4. Postnataltag ab 20 mg/kg KG und Tag in Form eines verringerten Körpergewichts bei den männlichen Nachkommen, in der mittleren Dosisgruppe war bei beiden Geschlechtern bei der Geburt und am 4. Postnataltag sowie in der hohen Dosisgruppe ebenfalls am 4. Postnataltag ein reduzierter Überlebensindex zu beobachten. Bei sechs Muttertieren der mittleren Dosisgruppe traten am 19. Gestationstag Anämie und bei einem Muttertier während der Laktation neurologische Auffälligkeiten wie abnormaler Gang und Schiefhaltung des Kopfes auf. Der Futterkonsum und die Körpergewichtszunahme waren bei den Muttertieren der mittleren Dosisgruppe während der Laktation verringert. Bei der hohen Dosisgruppe zeigten die Tiere ab dem 13. Behandlungstag gesträubtes Fell, Speichelfluss und Anämie, und einige Tiere wiesen neurologische Auffälligkeiten wie Schiefhaltung des Kopfes, kreisende Bewegungen und abnormaler Gang auf. Der Futterkonsum und die Körpergewichtszunahme waren bei beiden Geschlechtern in der hohen Dosisgruppe reduziert. Zwei männliche und sieben weibliche Tiere starben bis zum Ende der Trächtigkeit und zwei weitere weibliche Tiere während der Laktation (Mitsumori et al. 1994). Es ergibt sich ein LOAEL für Fetotoxizität und Toxizität der Elterntiere von 20 mg/kg KG und Tag.

Die Spermatotoxizität von Nitrobenzol wurde zudem in zahlreichen weiteren Studien gezeigt, in denen die Substanz als Positivkontrolle eingesetzt wurde (US EPA 2009).

Zusammengefasst zeigt eine Vielzahl von Studien, dass Nitrobenzol toxisch auf die Testes wirkt. Der empfindlichste Endpunkt ist hierbei die Spermienzahl und -motilität. Letztendlich führt die Exposition gegen Nitrobenzol zum vollständigen Verlust des Keimepithels. Effekte auf die Fertilität werden erst nach mehr als zweiwöchi-

ger Expositionszeit beobachtet, während die Schädigung der Reproduktionsorgane schon nach akuter Exposition nachzuweisen ist. Die aus einer inhalativen Zwei-Generationenstudie stammende NOAEC für männliche Reproduktionstoxizität bei Ratten beträgt 10 ml/m³.

Entwicklungstoxizität

Inhalative Aufnahme

Zum fruchtschädigenden Potenzial von Nitrobenzol liegen zwei Inhalationsuntersuchungen an Ratten vor, eine Zwei-Generationenstudie und ein Teratogenitätsversuch, die im Sammelkapitel „MAK-Werte und Schwangerschaft“ 1991 bewertet wurden. In der Teratogenitätsstudie kam es selbst nach Inhalation der deutlich maternaltoxischen Konzentration von 40 ml/m³ zu keiner embryotoxischen, fetotoxischen oder teratogenen Wirkung. In der Zwei-Generationenstudie führte diese hohe Konzentration zu reversiblen Schädigungen der Testes der Vätertiere, aber fruchtschädigend war sie allenfalls insofern, als die Jungtiere der F1-Generation etwas weniger an Gewicht zunahmen als die Kontrollen. Es ergibt sich für die Ratte eine NOAEC für Entwicklungstoxizität von 40 ml/m³ bei gleichzeitiger ausgeprägter Maternaltoxizität und eine NOAEC für Fetotoxizität von 10 ml/m³ ohne Maternaltoxizität.

Eine weitere unveröffentlichte Firmenstudie aus den 1980er Jahren ist in dieser Bewertung noch nicht enthalten. Im hierzu durchgeführten Dosisfindungsexperiment wurden jeweils zwölf Neuseeländer-Kaninchen vom 7. bis zum 19. Trächtigkeitstag gegen Nitrobenzol in Konzentrationen von 0, 10, 40 oder 80 ml/m³ Ganzkörper-exponiert. Am 20. Trächtigkeitstag erfolgten die Untersuchungen von Leber- und Nierengewicht sowie die Auszählung der Gelbkörper, lebender und toter Feten, früher und später Resorptionen und Implantationen. Es traten keine substanzbedingten Befunde auf. Auch lagen keine klinischen Symptome oder Effekte auf das Körpergewicht der Muttertiere vor. Einziger Effekt war eine erhöhte Methämoglobinkonzentration im Blut am 13. und 19. Trächtigkeitstag (Biodynamics Inc 1984; US EPA 2009).

Die Hauptstudie umfasste Gruppen von jeweils 22 Neuseeländer-Kaninchen, die vom 7. bis zum 19. Trächtigkeitstag an sechs Stunden täglich gegen Nitrobenzol Ganzkörper-exponiert wurden. Die Konzentrationen betrugen 0, 10, 40 oder 100 ml/m³. Am 30. Trächtigkeitstag wurden die Anzahl der Gelbkörper, der lebenden und toten Feten, der frühen und späten Resorptionen und Implantationen bestimmt sowie auch eine vollständige Untersuchung der Feten auf entwicklungstoxische Effekte durchgeführt. Bis auf eine leicht erhöhte Anzahl von Resorptionen und betroffenen Würfen der 100-ml/m³-Gruppe (11 Würfe im Gegensatz zu 7 bei Kontrolltieren) traten keine Effekte auf. Die Resorptionen in der hohen Konzentrationsgruppe lagen in diesem Testlabor nahe denen der historischen Kontrollwerte. Maternale Toxizität zeigte sich in einem Anstieg des relativen Lebergewichts (bis zu 12%) und einem Anstieg des Methämoglobinspiegels um 40 bzw. 60% in den beiden höchsten Konzentrationsgruppen. Es ergab sich für Kaninchen eine NOAEC für Entwicklungstoxizität von 40 ml/m³ (Biodynamics Inc 1984; US EPA 2009).

Orale Aufnahme

In einer Screeningstudie nach OECD-Prüfrichtlinie 421 erhielten zehn männliche und zehn weibliche Sprague-Dawley-Ratten pro Gruppe 0, 20, 60 oder 100 mg Nitrobenzol/kg KG und Tag per Schlundsonde jeweils 14 Tage lang vor der Verpaarung, während der Verpaarung und bis zum vierten Postnataltag (insgesamt 53 Tage lang; siehe Abschnitt „Fertilität“). Effekte auf die Nachkommen zeigten sich am 4. Postnataltag in der niedrigen Dosisgruppe in Form eines verringerten Körpergewichtes der männlichen Nachkommen, ab der mittleren Dosisgruppe bei beiden Geschlechtern und in der hohen Dosisgruppe bei der Geburt und am 4. Postnataltag, an dem auch ein reduzierter Überlebensindex festgestellt wurde. Die Teratogenität wurde nicht untersucht. In der unteren und mittleren Dosisgruppe verstarb jeweils ein Muttertier (Mitsumori et al. 1994). Es ergibt sich ein LOAEL für Fetotoxizität und Maternaltoxizität von 20 mg/kg KG und Tag.

Genotoxizität

In vitro

Nitrobenzol wirkte nur mit metabolischer Aktivierung und nach Zugabe von Norharman im Salmonella-Mutagenitätstest mutagen (Begründung 1998).

Im Folgenden sind die neuen Daten zur Genotoxizität beschrieben und in Tabelle 6 dargestellt.

Untersuchungen mit Zellen aus den Zielorganen der Nitrobenzolwirkung ergaben im Comet-Assay ab 7,6 µg/ml DNA-Schäden in Nieren- und Schilddrüsenzellen (Mattioli et al. 2006; Robbiano et al. 2004).

Im UDS-Test (DNA-Reparatur-Synthese) mit Schilddrüsenzellen vom Menschen oder Hepatozyten von Mensch und Ratte rief Nitrobenzol keine DNA-Reparatur-Synthese hervor (Butterworth et al. 1989; Mattioli et al. 2006).

In Blutlymphozyten von Menschen wurden Chromosomenaberrationen beschrieben, die aufgrund unzureichender und widersprüchlicher Beschreibung der Ergebnisse nicht zur Bewertung herangezogen werden können (Huang et al. 1995, 1996).

In primären Nierenzellen von Mensch und Ratte verursachte Nitrobenzol in hohen Konzentrationen ab 250 bzw. bei 125 µM (31 bzw. 15 µg/ml) die Bildung von Mikronuklei (Robbiano et al. 2004).

In V79-Zellen wurden Mikronuklei ab 0,1 µM (ca. 0,012 µg/ml) induziert, die sich zu ca. 72% als CREST-positiv erwiesen (Bonacker et al. 2004), was ein Hinweis auf aneugene Wirkung ist.

In vivo

Bei Ratten wurden nach Inhalation von bis zu 50 ml/m³ weder Schwesterchromatidaustausche noch Chromosomenaberrationen im Knochenmark (Kligerman et al. 1983) und nach oraler Aufnahme von bis zu 500 mg/kg KG keine DNA-Reparatur-synthese in der Leber (UDS-Test) (Mirsalis et al. 1982) nachgewiesen.

Tab. 6 Untersuchungen zur Genotoxizität von Nitrobenzol in vitro ohne metabolische Aktivierungssysteme an Säugerzellen

Endpunkt	Testsystem	Konz.	wirksame Konz.	Zytotox.	Ergebnis	Anmerkung	Literatur
DNA-Schäden (Comet-Assay)	primäre Nierenzellen (Mensch)	62–500 µM (7,6–62 µg/ml)	ab 62 µM (ab 7,6 µg/ml)	500 µM	+		Robbiano et al. 2004
	primäre Nierenzellen (Ratte)	62–500 µM (7,6–62 µg/ml)	ab 125 µM (ab 15 µg/ml)	500 µM	+		Robbiano et al. 2004
DNA-Schäden (Comet-Assay)	primäre Schilddrüsen-Follikelzellen (Ratte)	1250–5000 µM (154–616 µg/ml)	ab 1250 µM (ab 154 µg/ml)	5000 µM	+		Mattioli et al. 2006
	primäre Schilddrüsenzellen (Mensch)	1250–5000 µM (154–616 µg/ml)	–	5000 µM	–		Mattioli et al. 2006
DNA-Reparatur-Synthese (UDS)	Hepatozyten (Mensch)	10–1000 µM (1,2–123 µg/ml)	–	–	–		Butterworth et al. 1989
	Hepatozyten (Ratte)	10–1000 µM (1,2–123 µg/ml)	–	k.A.	–		Butterworth et al. 1989
Chromosomenaberration	Lymphozyten (Mensch)	50–800 µM (6,2–98 µg/ml)	ab 50 µM (ab 6,2 µg/ml)	k.A.	+	Ergebnisse unzureichend beschrieben, Einzeldaten fehlen, Konz.-Angabe widersprüchlich	Huang et al. 1995
	Lymphozyten (Mensch)	50 mM (6200 µg/ml)	50 mM	k.A.	+	Ergebnisse unzureichend beschrieben, Einzeldaten fehlen, Konz.-Angabe widersprüchlich	Huang et al. 1996

Tab. 6 (Fortsetzung)

Endpunkt	Testsystem	Konz.	wirksame Konz.	Zytotox.	Ergebnis	Anmerkung	Literatur
Mikronukleus	V79	0,005–100 µM (0,0006–12 µg/ml)	ab 0,1 µM (0,012 µg/ml)	–	+	72% CREST-positiv	Bonacker et al. 2004
	primäre Nierenzellen (Mensch)	62–500 µM (7,6–62 µg/ml)	ab 250 µM (31 µg/ml)	500 µM	+		Robbiano et al. 2004
	primäre Nierenzellen (Ratte)	62–500 µM (7,6–62 µg/ml)	ab 125 µM (15 µg/ml)	500 µM	+		Robbiano et al. 2004

Konz. = Konzentration, Zytotox. = Zytotoxizität

Nach intraperitonealer Gabe von bis zu 250 mg/kg KG trat keine Zunahme an Mikronuklei im Knochenmark der Maus auf. Das PCE/NCE-Verhältnis war nicht verändert. Ab der niedrigsten Dosis wurde gesträubtes Fell, ab der mittleren unregelmäßige Atmung und bei der höchsten Dosis Apathie beobachtet. In einem Vorversuch trat ab 300 mg/kg KG Mortalität auf (BASF AG 1996) (siehe auch Begründung 1998).

Seitdem sind Studien an Ratten zur Induktion von DNA-Schäden in Leber, Nieren und Schilddrüse, zur Induktion von Mikronuklei in Nieren sowie eine Untersuchung zur Bindung von Nitrobenzol an die DNA in der Leber von Mäusen erschienen.

Bei Mäusen war bereits bei Dosierungen im μg -Bereich eine Bindung von Nitrobenzol an die DNA in Leberzellen und an Hämoglobin in Erythrozyten nachweisbar. Es wurde ^{14}C -markiertes Nitrobenzol intraperitoneal verabreicht und nach zwei Stunden die DNA und das Hämoglobin auf ^{14}C -Markierung untersucht. Die Dosis von 0,1 $\mu\text{g/kg}$ KG diente als Kontrolle, da sie ungefähr der Nitrobenzol-Konzentration in der Umweltluft entsprach (Li et al. 2003). Eine nähere Spezifizierung der DNA-Bindung erfolgte nicht. Als Expositionsmarker zeigt dieser Befund, dass bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen eine Bindung an die DNA erfolgt. Ob dies jedoch zu Mutationen führt ist ungeklärt.

Bei Ratten führte eine einmalige orale Gabe von $\frac{1}{2}$ der LD_{50} zu DNA-Schäden im Comet-Assay in den Zielorganen Leber, Nieren und Schilddrüse sowie zu Mikronuklei in den Nieren (Mattioli et al. 2006; Robbiano et al. 2004). Niedrigere Dosierungen wurden nicht untersucht.

Die Studien zur Genotoxizität in vivo sind in Tabelle 7 dargestellt.

Genotoxizität der Metaboliten

Der Nitrobenzol-Metabolit Phenylhydroxylamin war nach metabolischer Aktivierung mutagen im Salmonella-typhimurium-Stamm TA100 und verursachte in menschlichen Fibroblasten Schwesterchromatidaustausche (Begründung 1998).

Der Metabolit Nitrosobenzol führte in Gegenwart von NADH und Kupfer(II) zu DNA-Strangbrüchen in Kalbthymus-DNA (Ohkuma und Kawanishi 1999).

Zusammengefasst zeigt Nitrobenzol in vitro in Säugerzellen bei Konzentrationen $\geq 7 \mu\text{g/ml}$ ein klastogenes Potenzial und ist bei deutlich niedrigeren Konzentrationen (ca. $\geq 0,012 \mu\text{g/ml}$) aneugen. Im Mutagenitätstest mit Salmonella typhimurium wirkt Nitrobenzol alleine nicht mutagen.

In vivo zeigt sich bei der Ratte vor allem in hohen, toxischen Dosierungen nach oraler Gabe eine klastogene Wirkung, während bei Ratten und Mäusen nach intraperitonealer Gabe bzw. Inhalation in niedrigen Dosierungen keine klastogene Wirkung im Knochenmark induziert wird.

Insgesamt deuten die Studien zur Genotoxizität von Nitrobenzol auf ein eher geringes genotoxisches Potenzial hin, ähnlich wie beim Anilin, bei dem als Ursache die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies belegt ist (siehe auch Abschnitt „Wirkungsmechanismus“).

Tab. 7 Untersuchungen zur Genotoxizität von Nitrobenzol in vivo

Testsystem	Spezies, Tierzahl/Gruppe	Dosis, Expositionsweg, Untersuchungszeitpunkt	Ergebnis	Bemerkung	Literatur
<i>In vivo/ex vivo</i>					
SCE, Lymphozyten aus Blut u. Milz	Ratten, F344, 3 ♂	0, 5, 16, 50 ml/m ³ , 6 Stunden/Tag, 21-mal in 29 Tagen, inhalativ	–	Blutlymphozyten: Mitoseindex dosisabh. ↓	Kligerman et al. 1983
DNA-Reparatur-Synthese (UDS), primäre Hepatozyten (^{3H} Thymidin-Markierung)	Ratten, F344, 3 ♂	0, 200, 500 mg/kg KG, Schlundsonde	–		Mirsalis et al. 1982
Chromosomenaberrationen, Lymphozyten aus Blut	Ratten, F344, 3 ♂	0, 5, 16, 50 ml/m ³ , 6 Stunden/Tag, 21-mal in 29 Tagen, inhalativ	–	Mitoseindex dosisabh. ↓ u. Arretierung in Mitose	Kligerman et al. 1983
<i>In vivo</i>					
DNA-Bindung, Leber (Massenspektrometrie mit Beschleunigern) Nachweisgrenze: 1 Bindung/10 ¹¹ DNA-Nukleotide;	Mäuse, Kunming, 2-3 ♂	0,1; 0,5; 2; 5; 20; 100 µg/kg KG oder 10 mg/kg KG, ¹⁴ C-markiertes Nitrobenzol, intraperitoneal, Untersuchung nach 2 Stunden	+	0,1 µg/kg KG = Kontrolle, da etwa Nitrobenzol-Konz. in der Luft; DNA-Bindung dosisabh. ↑, Hämoglobin-Bindung in Erythrozyten dosisabh. ↑, aber Ausmaß geringer	Li et al. 2003
DNA-Schäden, Niere (Comet-Assay)	Ratten, Sprague-Dawley, 3 ♂	0, 300 mg/kg KG, oral, ½ LD ₅₀ , Untersuchung nach 48 Stunden	+		Robbiano et al. 2004

Tab. 7 (Fortsetzung)

Testsystem	Spezies, Tierzahl/Gruppe	Dosis, Expositionsweg, Untersuchungszzeitpunkt	Ergebnis	Bemerkung	Literatur
DNA-Schäden, Niere, Schilddrüse u. Leber (Comet-Assay)	Ratten, Sprague-Dawley, 3 ♂	0, 310 mg/kg KG, oral, ½ LD ₅₀ , Untersuchung nach 16 Stunden	+		Mattioli et al. 2006
Mikronukleus, Niere	Ratten, Sprague-Dawley, 3 ♂	0, 300 mg/kg KG oral, ½ LD ₅₀ , Untersuchung nach 48 Stunden	+	keine Angabe zur Zytotoxizität	Robbiano et al. 2004
Mikronukleus, Knochenmark	Mäuse, B6C3F ₁ , 5 ♂/ 5 ♀	I: 0; 62,5; 125; 250 mg/kg KG, intraperitoneal, Untersuchung nach 24 Stunden II: 0, 250 mg/kg KG, intraperitoneal, Untersuchung nach 48 Stunden	-	keine Zytotoxizität; ab 62,5 mg/kg KG : gesträubtes Fell; ab 125 mg/kg KG : unregelmäßige Atmung; 250 mg/kg KG : Apathie u. Hockposition; im Vortest: ≥300 mg/kg KG : Mortalität;	BASF AG 1996

Kanzerogenität

Kurzzeitstudien

In menschlichen Tumorzellen aus der Lunge (WI-38) oder der Leber (Chang-Zellen) wurden von bis zu 250 µg Nitrobenzol/ml keine Zelltransformationen induziert (Styles 1978).

Langzeitstudien

Die bereits in der Begründung von 1998 aufgeführten Untersuchungen zur Kanzerogenität an männlichen und weiblichen Fischer-344-Ratten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten sowie an männlichen und weiblichen B6C3F1-Mäusen (Cattley et al. 1994; CIIT 1993) wiesen zwar Mängel in der Tierhaltung auf (Verlust von Tieren am Anfang der Studie, Zuordnungsprobleme der Tiernummerierung innerhalb einer Expositionsgruppe), die sich jedoch nicht auf die Auswertung der Tumorzinidenzen des Versuches auswirkten (CIIT 1993). Somit wird die Studie trotz dieser Mängel für die Bewertung der kanzerogenen Wirkung herangezogen.

Nur die männlichen Ratten wiesen Tumoren in Leber, Nieren und Schilddrüse auf. Bei allen drei Organen waren die Gesamtinzidenzen von Adenomen und Karzinomen statistisch signifikant erhöht, nicht aber die von Karzinomen alleine. Ein positiver Trendtest ergab sich bei Karzinomen von Leber und Nieren bei F344-Ratten, nicht aber bei Sprague-Dawley-Ratten (siehe Begründung von 1998 und Tabelle 8).

Bei männlichen B6C3F1-Mäusen trat in der Lunge eine statistisch signifikant erhöhte Gesamtinzidenz von Adenomen und Karzinomen auf, nicht aber von Karzinomen alleine. Nur in der höchsten Konzentrationsgruppe war ein signifikanter Anstieg von Schilddrüsenadenomen zu beobachten. In der Brustdrüse der weiblichen B6C3F1-Mäuse war in der höchsten Konzentrationsgruppe die Inzidenz der Adenokarzinome erhöht, die Inzidenzen der anderen beiden exponierten Gruppen wurden nicht bestimmt (siehe Begründung von 1998 und Tabelle 8).

Zusammenfassung und Bewertung der Tumoren

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genotoxizität weisen auf eine sekundäre genotoxische Wirkung hin, die bei der Tumorentstehung jedoch nicht im Vordergrund steht.

Die Tumorentstehung wird vor allem als Folge einer chronischen/zytotoxischen Schädigung angesehen, da in den die Tumoren entwickelnden Geweben meistens auch chronisch entzündliche, degenerative oder proliferative Veränderungen vorhanden sind (Begründung von 1998 und siehe Tabelle 1, 2 und 3 sowie Abschnitt „Wirkungsmechanismus“).

Leber

Die Lebertumoren bei der männlichen Ratte, bei der die Karzinome nicht signifikant erhöht waren, treten bei der höchsten Konzentration von 25 ml/m³ auf, wobei ein signifikant positiver Trend berechnet wurde. Auch treten Spongiosis hepatis und eosinophile Foci sowie zentrilobuläre Hypertrophie auf.

Tab. 8 Studien zur Kanzerogenität von Nitrobenzol, siehe auch Begründung von 1998

Autor:	Cattley et al. 1994; CIIT 1993									
Stoff:	Nitrobenzol (>99,8% rein)									
Spezies:	Ratte , F344/N, 70 ♂ / 70 ♀, Ratte , Sprague Dawley, 70 ♂									
Applikation:	Inhalation									
Konzentration:	0, 1, 5, 25 ml/m³									
Dauer:	2 Jahre, 5 Tage/Woche, 6 Stunden/Tag									
			Expositionskonzentration (ml/m³)							
			0	1		5		25		
Leber, Toxizität und Präneoplasien										
zentrilobuläre Leberzellvergrö- ßerung	SD	♂	3/63	(5%)* ^T	1/67	(1%)	14/70	(20%)*	39/65	(60%)*
	F344	♂	0/69	(0%)* ^T	0/69	(0%)	8/70	(11%)*	57/70	(81%)*
		♀	0/70	(0%)	0/66	(0%)	0/66	(0%)	0/70	(0%)
Spongiose	SD	♂	25/63	(40%)* ^T	25/67	(37%)	25/70	(36%)	37/65	(57%)*
	F344	♂	25/69	(36%)* ^T	24/69	(35%)* ^T	33/70	(47%)	58/70	(83%)*
		♀	0/70	(0%)* ^T	0/66	(0%)	0/66	(0%)	6/70	(9%)*
eosinophile Foci	SD	♂	11/63	(17%)* ^T	3/67	(4%)	8/70	(11%)	19/65	(29%)
	F344	♂	26/69	(42%)* ^T	25/69	(36%)	44/70	(63%)*	57/70	(81%)*
		♀	6/70	(9%)* ^T	9/66	(14%)	13/66	(20%)	16/70	(23%)*
Leber, Tumoren (nur bei männlichen Tieren)										
hepatozelluläre										
Adenome	SD	♂	1/63	(1,6%)	1/67	(1,5%)	2/70	(2,9%)	7/67	(10,4%)*
Karzinome		♂	2/63	(3,2%)	0/67	(0%)	2/70	(2,9%)	2/65	(3,1%)
Adenome u. Karzinome		♂	2/63	(3,2%)	1/67	(1,5%)	4/70	(5,7%)	9/65	(13,8%)*
Adenome	F344	♂	1/69	(1,4%)	3/69	(4,3%)	3/70	(4,3%)	15/70	(21,4%)*
Karzinome		♂	0/69	(0%)* ^T	1/69	(1,4%)	2/70	(2,9%)	4/70	(5,7%)
Adenome u. Karzinome		♂	1/69	(1,4%)* ^T	4/69	(6,0%)	5/70	(7,1%)	16/70	(22,9%)* ^{a)}
Schilddrüse, Präneoplasien										
Follikelzell- Hyperplasie	SD	♂	2/63	(3%)	2/64	(3%)	1/68	(1%)	4/64	(6%)
	F344	♂	0/69	(0%)* ^T	1/69	(1%)	2/70	(3%)	4/70	(6%)

Tab. 8 (Fortsetzung)

			Expositionskonzentration (ml/m ³)							
			0		1		5		25	
Schilddrüse, Tumoren (nur bei männlichen Tieren)										
follikuläre Adenome	F344	♂	0/69	(0%)	0/69	(0%)	2/70	(2,9%)	2/70	(2,9%)
Adenokarzinome		♂	2/69	(2,9%)	1/69	(1,4%)	3/70	(4,3%)	6/70	(8,7%)
Adenome u. Karzinome		♂	2/69	(2,9%)* ^T	1/69	(1,4%)	5/70	(7,1%)	8/70	(11,4%)* ^{b)}
Niere, Toxizität und Präneoplasien										
chronische Nephropathie	SD	♂	54/63	(86%)	60/67	(90%)	63/70	(90%)	59/65	(91%)
	F344	♂	69/69	(100%)	64/68	(94%)	70/70	(100%)	70/70	(100%)
		♀	58/70	(83%)	51/66	(77%)	60/66	(91%)	67/70	(96%)
Tubulusepithel Hyperplasie	SD	♂	3/63	(5%)	1/67	(1%)	5/70	(7%)	6/65	(9%)
	F344	♂	2/69	(3%)* ^T	2/68	(3%)	2/70	(3%)	13/70	(19%)*
		♀	0/70	(0%)	0/66	(0%)	2/66	(3%)	2/70	(3%)
Niere, Tumoren (nur bei männlichen Tieren)										
tubuläre Adenome	F344	♂	0/69	(0%)	0/68	(0%)	0/70	(0%)	5/70	(7,1%)* ^{c)}
Karzinome		♂	0/69	(0%)* ^T	0/68	(0%)	0/70	(0%)	1/70	(1,4%)* ^{d)}
Adenome u. Karzinome		♂	0/69	(0%)* ^T	0/68	(0%)	0/70	(0%)	6/70	(8,7%)*

* p ≤ 0,05; *^T signifikanter positiv korrelierter Trend, p < 0,05

Historische Kontrollen: Inzidenz, Mittelwert, Bereich (Haseman et al. 1998):

^{a)} 35/903, 3,9%, 0–9%^{b)} 9/892, 1,0%, 0–4%^{c)} 9/902, 1,0%, 0–4%^{d)} 1/902, 0,1%, 0–2%

Tab. 8 (Fortsetzung)

Autor:	Cattley et al. 1994; CIIT 1993									
Stoff:	Nitrobenzol (>99,8% rein)									
Spezies:	Maus , B6C3F1, 70 ♂ / 70 ♀,									
Applikation:	Inhalation									
Konzentration:	0, 5, 25, 50 ml/m³									
Dauer:	2 Jahre, 5 Tage/Woche, 6 Stunden/Tag									
Toxizität:	ab 50 ml/m³: KG ↓									
Expositionskonzentration (ml/m³)										
		0		5		25		50		
Lunge, Toxizität und Präneoplasien										
Hyperplasie	bronchio-alveoläre	♂	1/68	(1%)* ^T	2/67	(3%)	8/65	(12%)*	13/66	(20%)*
		♀	0/53	(0%)	2/60	(3%)	5/64	(8%)*	1/62	(2%)
	Bronchiolarisierung	♂	0/68	(0%)* ^T	58/67	(87%)*	58/65	(89%)*	62/66	(94%)*
		♀	0/53	(0%)* ^T	55/60	(92%)*	63/64	(98%)*	62/62	(100%)*
Lunge, Tumoren										
bronchio-alveoläre										
Adenome	♂	7/68	(10,3%)* ^T	12/67	(17,9%)	15/65	(23,1%)	18/66	(27,3%)*	
Karzinome	♂	4/68	(5,9%)	10/67	(15,0%)	8/65	(12,3%)	8/66	(12,1%)	
Adenome u. Karzinome	♂	9/68	(13,2%)* ^T	21/67	(31%)*	21/65	(32,3%)*	23/66	(34,4%)* ^{a)}	
Schilddrüse, Toxizität und Präneoplasien										
Hyperplasie	Follikelzell-	♂	1/65	(2%)* ^T	4/65	(6%)	7/65	(11%)*	12/64	(19%)*
		♀	2/49	(4%)* ^T	1/59	(2%)	1/61	(2%)	8/61	(13%)
Schilddrüse, Tumoren										
Adenome	♂	0/65	(0%)* ^T	4/65	(6%)	1/65	(2%)	7/64	(11%)*	
Mamma, Tumoren										
Adenokarzinome	♀	0/48	(0%)	n. u.		n. u.		5/60	(8,3%)* ^{b)}	

* $p < 0,05$; *^T signifikanter positiv korrelierter Trend, $p < 0,05$; n. u. = nicht untersucht

Historische Kontrollen: Inzidenz, Mittelwert, Bereich (Haseman et al. 1998):

^{a)} 251/1097, 22,9%, 10–42% (Haseman et al. 1998)

^{b)} 31/1902, 2,8%, 0–8% (Haseman et al. 1998); bis zu 12% (CIIT 1993)

Wie im Abschnitt „Wirkungsmechanismus“ erläutert sind die Lebertumoren bei der männlichen Ratte vermutlich ein Resultat aus der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und der zentrilobulären Hypertrophie. Beide Effekte haben sowohl eine Geschlechts- als auch Speziespezifität, die vermutlich auf dem unterschiedlichen Metabolismus beruht. F344-Ratte und Sprague-Dawley-Ratte zeigen sowohl Unterschiede im Metabolismus als auch in der Tumorzinzidenz. Da beim Menschen ähnlich wie bei der Maus p-Aminophenol sowie seine Konjugate im Urin identifiziert werden (US EPA 2009), könnte der humane Metabolismus dem der Maus ähneln, bei der keine erhöhten Inzidenzen von Lebertumoren auftreten. Bei der Ratte kann p-Aminophenol nicht im Urin nachgewiesen werden (siehe auch Abbildung 2, Abschnitt „Toxikokinetik und Metabolismus“). Die Humanrelevanz der Lebertumoren ist unklar, die Leber aber in jedem Fall auch beim Menschen Zielorgan der toxischen Wirkung des Nitrobenzols.

Nieren

Nierenadenome und eine nicht signifikante Erhöhung von Karzinomen treten nur in der höchsten Konzentrationsgruppe von 25 ml/m³ bei der männlichen F344-Ratten auf, nicht jedoch bei Sprague-Dawley-Ratten. Auch für die Nierentumoren werden degenerative Veränderungen und damit eine chronische Toxizität als Ursache angenommen (Begründung von 1998 und Abschnitt „Wirkungsmechanismus“). Anzeichen von Nierentoxizität (Tubulusepithelhyperplasie) und Adenome treten nur in der Zwei-Jahrestudie (Cattley et al. 1994) und nur bei der höchsten Konzentration von 25 ml/m³ auf, wobei die Tiere beider Geschlechter eine chronische Nephropathie aufweisen. Jedoch werden in einer 90-Tagestudie schon bei 5 ml/m³ minimale Veränderungen an den Nieren von F344-Ratten beschrieben (CIIT 1984). Die besondere Empfindlichkeit der F344-Ratte ist vermutlich ein Resultat der chronischen progressiven Nephropathie, die keine Humanrelevanz hat, und eventuell auf einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies oder anderer toxischer Metaboliten beruht, die spezies-, geschlechts- und auch stammspezifisch sehr verschieden verlaufen (siehe Abschnitt „Wirkungsmechanismus“).

Schilddrüse

In der Schilddrüse sind bei männlichen F344-Ratten bei der höchsten Konzentration nur Adenome zusammen mit Karzinomen nicht signifikant erhöht (11,4%), Adenome alleine betragen 2,9%, Karzinome 8,7%. Bei männlichen B6C3F1-Mäusen tritt nur bei der höchsten Konzentration ein signifikanter Anstieg von Schilddrüsenadenomen (11%), jedoch nicht von Karzinomen auf. Follikelzell-Hyperplasien liegen bei männlichen, nicht aber bei weiblichen Ratten vor, aber auch bei männlichen und weiblichen Mäusen, wobei hier die männlichen Tiere die höhere Inzidenz aufweisen (Cattley et al. 1994; CIIT 1993).

Die Tumoren der Schilddrüse werden auf die Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in der Leber und die sich daraus ergebenden Störungen im Metabolismus der Schilddrüsenhormone zurückgeführt (siehe Abschnitt „Wirkungsmechanismus“). Bezüglich Störungen in diesem hormonellen Mechanismus ist der Mensch weitaus weniger empfindlich als die Ratte, so dass die Tumoren kaum Humanrelevanz haben.

Lunge

Die Lungentumoren der männlichen B6C3F1-Maus, die sich nur als signifikant erweisen, wenn Adenome und Karzinome addiert werden, liegen mit bis zu 34,4% innerhalb der Inzidenz historischer Kontrollen (10–42%, siehe Tabelle 8). Die Tiere haben ab 25 ml/m³ erhöhte Inzidenzen bronchio-alveolärer Hyperplasien und ab der niedrigsten Dosis eine dosisabhängig erhöhte Bronchiolarisierung (87–92% bei 5 ml/m³ im Gegensatz zu 0% in der Kontrolle). Die Bronchiolarisierung, die als präkanzergener Effekt angesehen werden kann, tritt im Gegensatz zu den Tumorbefunden auch bei den weiblichen Tieren identisch hoch ausgeprägt wie bei den männlichen Tieren auf. Eine bessere Übereinstimmung mit den Tumorbefunden, die nur bei den männlichen Tieren auftreten, hat die bronchio-alveoläre Hyperplasie (Cattley et al. 1994; CIIT 1993).

Untersuchungen einer möglichen genotoxischen Wirkung an der Lunge liegen nicht vor. In einer Zusammenstellung zeigt sich, dass häufig nur die Maus von Lungentumoren betroffen ist, nicht aber die Ratte. So treten nur bei zwei von 23 Chemikalien Tumoren in diesem Organ in beiden Spezies auf (Hasegan und Lockhart 1993). Geschlechtsspezifische Unterschiede für Tumoren in der Lunge von B6C3F1-Mäusen werden in den NTP-Kontrollgruppen gezeigt, in denen die männlichen Tiere eine etwas höhere Spontaninzidenz aufweisen als die weiblichen. Jedoch ist der Anstieg bei Chemikalien-induzierten Tumoren im Verhältnis zur Kontrolle bei den weiblichen Tieren größer als bei den männlichen (Moore et al. 2013). Die einzige Substanz, die in einer NTP-Inhalationsstudie auch nur bei männlichen, nicht jedoch bei weiblichen Mäusen Lungentumoren induziert („some evidence“), ist Ethylbenzol. Hier wird weder eine Erklärung für die geschlechtsspezifische Wirkung noch für die unterschiedliche Organspezifität bei Ratte und Maus gegeben.

Die durch Nitrobenzol erhöhte Tumorentstehung an der Mauslunge ist vermutlich auf oxidativen Stress (hierdurch vermutlich auch die induzierte Reizwirkung), kombiniert mit einer toxischen Wirkung – eventuell spezies- und geschlechtsspezifisch – zurückzuführen. Wie auch im Abschnitt „Wirkungsmechanismus“ beschrieben, ist die Humanrelevanz dieser Tumoren unklar.

Brustdrüse

Die Inzidenz der Adenokarzinome der Brustdrüse weiblicher Mäuse wurde nur in der höchsten Konzentration von 50 ml/m³ bestimmt. Hier waren es 8,3% und damit im Bereich der historischen Kontrolle von bis zu 12% (siehe Tabelle 8). Da die Adenokarzinome der Brustdrüse bei der Maus eine hohe Spontaninzidenz haben, die möglicherweise durch die Toxizität bei hohen Konzentrationen verstärkt wird, die Inzidenz aber dennoch im Bereich der historischen Kontrollinzidenzen liegt, ist nicht von einer Humanrelevanz dieses Befundes auszugehen.

Bewertung

Nitrobenzol verursacht bei Ratten nach inhalativer Exposition Tumoren in Leber, Nieren und Schilddrüse und bei Mäusen in Lunge und Mamma. Nitrobenzol hat

ein geringes genotoxisches Potenzial. Kritische grenzwertrelevante Effekte sind die Bronchiolarisierung bei Mäusen und die Pigmentierung der Milz (Hämosiderose) bei Ratten.

Krebserzeugende Wirkung. Nitrobenzol verursacht nach inhalativer Verabreichung bei hohen Konzentrationen Adenome und teils auch Karzinome, die bei Ratten in Leber, Nieren und Schilddrüse und bei Mäusen in Lunge und Mamma auftreten. Der Stoff ist allenfalls bei hohen Dosen genotoxisch. Wie im Abschnitt „Kanzerogenität“ und im Abschnitt „Wirkungsmechanismus“ im Detail diskutiert, werden die durch Nitrobenzol induzierten Tumoren primär durch chronisch-toxische Mechanismen verursacht, wobei auch eine – vermutlich sekundäre – genotoxische bzw. DNA-schädigende Wirkung in hohen Dosierungen auftritt.

Nitrobenzol hat mit Phenylhydroxylamin den gleichen Metaboliten wie Anilin, der für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich ist. Auch eine Methämoglobinbildung (MetHb) wird durch Nitrobenzol induziert, jedoch in deutlich stärkerem Ausmaß als bei Anilin, und es werden auch die entsprechenden Effekte an der Milz beobachtet. Die Tumoren entstehen bei Nitrobenzol im Gegensatz zu Anilin aber nicht in der Milz, sondern in verschiedenen anderen Geweben. Es ist nach wie vor schwierig, eine Ursachenkette von der MetHb-Bildung, der Milztoxizität bis zur Tumorinduktion herzustellen. Die Tumoren entstehen vermutlich an den Orten mit der größten Zytotoxizität. Dies gilt generell für alle aromatischen Amine, bei denen die akut und chronisch toxischen Effekte vor allem im Sinne einer Tumorpromotion eine wesentliche Rolle spielen. Unter anderem ergibt sich eine proliferationssteigernde Wirkung als Folge der toxischen Wirkung in den typischen Zielorganen, die mit Entzündungen und erhöhten Proliferationsraten einhergeht. Ungeklärt ist dabei, inwieweit dies Folge einer unspezifischen Zytotoxizität ist, z. B. durch den vermehrten Abbau von Erythrozyten, oder ob dabei spezifische, biochemische Mechanismen, wie Hemmung oder Steigerung der Apoptose, eine Rolle spielen. Gegen die Vorstellung von der „Überforderung der Milz“ durch den Erythrozyten-Abbau spricht die Tatsache, dass die Tumorbildung nicht mit dem Ausmaß der MetHb-Bildung korreliert (Begründung „Monozyklische aromatische Amino- und Nitroverbindungen“ 2003).

Eingruppiert in die Reihe der aromatischen Amine und der Bildung gleicher Metaboliten wie bei Anilin, welches in Kanzerogenitäts-Kategorie 4 eingestuft ist (Nachtrag Anilin 2007), stellt sich Nitrobenzol bei einer Gesamtbetrachtung der Tumoren als Kanzerogen dar.

Aufgrund der untergeordneten Bedeutung der Genotoxizität und der nichtlinearen Dosis-Wirkungs-Beziehung der Tumorzinidenzen wird Nitrobenzol in Kanzerogenitäts-Kategorie 4 eingestuft.

Keimzellmutagene Wirkung. Bei Ratten zeigt sich nach oraler Gabe vor allem in toxischen Dosierungen eine klastogene Wirkung in Leber, Nieren und Schilddrüse. Bei Mäusen bzw. Ratten wird nach intraperitonealer Gabe bzw. Inhalation bei niedrigen Dosierungen keine klastogene Wirkung im Knochenmark induziert. In vitro tritt bei niedrigen Konzentrationen eine aneugene Wirkung auf, die in vivo nicht untersucht ist. Die beobachtete testikuläre Atrophie belegt die Erreichbarkeit der Keimzellen. Untersuchungen zur Genotoxizität an Keimzellen fehlen. Insgesamt

deuten die Studien zur Genotoxizität von Nitrobenzol auf ein geringes genotoxisches Potenzial hin, ähnlich wie beim Anilin, bei dem als Ursache die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies belegt ist (siehe auch Abschnitt „Wirkungsmechanismus“). Daher wird Nitrobenzol nicht in eine Kategorie für Keimzellmutagene eingestuft.

MAK-Wert. Die Reizwirkung auf Haut und Augen ist gering (siehe Begründung 1998). Aus den oralen 90-Tage-Studien an Ratte und Maus, die im Rahmen des NTP durchgeführt wurden, konnte kein NOAEL abgeleitet werden. Der LOAEL beträgt für die Ratte 9,38 mg/kg KG und Tag und für die Maus 18,75 mg/kg KG und Tag. Die systemischen Zielorgane Leber, Niere und Blut entsprechen denen nach inhalativer Exposition. Zur toxikokinetischen Übertragung dieser LOAEL in eine Konzentration in der Luft am Arbeitsplatz werden berücksichtigt: die den toxikokinetischen Unterschieden zwischen der Ratte bzw. der Maus und dem Menschen entsprechenden speziesspezifischen Korrekturwerte (1:4; 1:7), die angenommene orale Resorption (100%), das Körpergewicht (70 kg) und das Atemvolumen (10 m³) des Menschen sowie die angenommene 100%ige inhalative Resorption. Damit errechnen sich entsprechende Konzentrationen (LAEC) von 16,4 mg/m³ bzw. 18,8 mg/m³ (3,2 bzw. 3,7 ml/m³).

In der chronischen Inhalationsstudie an B6C3F1-Mäusen treten ab der niedrigsten Konzentration von 5 ml/m³ in der Lunge Bronchiolarisierung, Leberzellvergrößerung (zentrilobulär) und vielkernige Leberzellen, eine Pigmentierung des olfaktorischen Epithels und bei weiblichen Tieren eine Degeneration des olfaktorischen Epithels auf (Cattley et al. 1994). Der kritische Effekt für die Ableitung eines Grenzwertes ist die Bronchiolarisierung bei der Maus, die bei der niedrigsten Konzentration von 5 ml/m³ schon in hoher Inzidenz bei 87 bis 92% der Tiere im Gegensatz zu 0% in der Kontrolle auftritt. Eine Bronchiolarisierung tritt bei Mäusen oft nach Exposition gegen Reizstoffe auf (Hedrich 2012) und ist humanrelevant (dePianto et al 2014; Wang et al. 2009). Da die Bronchiolarisierung bei der niedrigsten Konzentration schon eine sehr hohe Inzidenz aufweist, ist keine Benchmark-Berechnung möglich. Die Studie kann deshalb nicht zur Ableitung eines Grenzwertes herangezogen werden.

Aus der chronischen Inhalationsstudie an Sprague-Dawley-Ratten resultiert eine NOAEC von 1 ml/m³ und wie bei der Maus eine LOAEC von 5 ml/m³.

Bei F344-Ratten tritt bei 1 ml/m³ eine Pigmentierung im Riechepithel und bei den männlichen Tieren eine Pigmentierung sowie eine extramedulläre Hämatopoese in der Milz auf (Cattley et al. 1994). Alle drei Effekte weisen eine hohe Spontaninzidenz auf und zeigen nur eine geringe konzentrationsabhängige Verstärkung, wobei jedoch von den Autoren keine Angabe des Schweregrades der Befunde erfolgte, so dass trotzdem eine eindeutige Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bestanden haben könnte. Bei der Zunahme der Pigmentierung im Riechepithel könnte es sich um eine im Alter erhöhte Empfindlichkeit der Tiere handeln, deren Adversität unklar ist.

Da Effekte an der Milz aufgrund der durch Nitrobenzol verursachten Methämoglobinbildung zu erwarten sind, werden diese bei männlichen F344-Ratten bei 1 ml/m³ auftretenden Effekte als Ausgangspunkt für die Ableitung eines MAK-Wertes herangezogen. Dieser Wert schützt auch vor dem kritischen Effekt, der Bronchiolarisierung bei der Maus, der ab 5 ml/m³ auftritt.

Da die Effekte auf die Milz der männlichen F344-Ratte jedoch nur minimal und allenfalls als beginnender Effekt zu werten sind, eine hohe Spontaninzidenz haben und bei der weiblichen F344-Ratte, der männlichen CD-Ratte und der Maus durch Nitrobenzol bis mindestens 5 ml/m^3 nicht signifikant verstärkt werden, kann eine NAEC von $0,33 \text{ ml/m}^3$ extrapoliert werden. Da Effekte auf die Milz bei Ratten stärker ausgeprägt sind als beim Menschen, wie Studien mit dem MetHb-Bildner Anilin zeigen (Nachtrag „Anilin“ 2007) wird eine NAEL der systemischen Toxizität für den Menschen in gleicher Höhe angenommen. Da dieser Wert aus einem Tierversuch stammt, wird die entsprechende Konzentration für den Menschen nach dem üblichen Vorgehen der Kommission bei der Hälfte der NAEC festgesetzt. Da sich aus der Molmasse von $123,6 \text{ g/mol}$, dem Dampfdruck von $0,2 \text{ hPa}$ und dem $\log K_{ow}$ von $1,86$ (ECHA 2014) nach der Formel von Buist et al. (2012) ein Blut:Luft-Verteilungskoeffizient >5 ergibt, ist die Berücksichtigung des erhöhten Atemvolumens am Arbeitsplatz im Vergleich zum Tierversuch für die Extrapolation der systemischen Effekte auf die Milz gerechtfertigt. Unter Berücksichtigung des Preferred Value Approach wird damit ein MAK-Wert von $0,1 \text{ ml/m}^3$ festgesetzt. Dieser Wert liegt weit unter der LOAEC von 5 ml/m^3 aus der chronischen Inhalationsstudie an B6C3F1-Mäusen.

Spitzenbegrenzung. Der MAK-Wert wird von der LOAEC von 1 ml/m^3 bei F344-Ratten abgeleitet. Den prozentual stärksten Anstieg von den bei 1 ml/m^3 signifikanten Effekten bei F344-Ratten hat die Pigmentierung des olfaktorischen Epithels bei weiblichen Tieren. Da bereits bei den Kontrolltieren eine Inzidenz von 55% beobachtet wird, scheint es sich um die Verstärkung eines altersbedingten Effekts zu handeln, der darüber hinaus in der 90-Tage-Inhalationsstudie nicht gesehen wurde. Somit handelt es sich um keinen akuten Effekt. Die Hämosiderinpigmentierung der Milz ist eine Folge der geschädigten Erythrozyten und auch nicht als akuter Effekt durch Spitzenkonzentrationen aufzufassen, solange diese nicht zur Methämoglobin (MetHb)-Bildung führen. Nitrobenzol wird deshalb der Spitzenbegrenzungs-Kategorie II zugeordnet. Die toxischen Wirkungen gehen von der reduktiven Metabolisierung aus. Nach inhalativer und intravenöser Applikation beim Menschen ist eine eher langsame Ausscheidung von Metaboliten gezeigt worden. Wegen der initialen Halbwertszeit von fünf Stunden wird ein Überschreitungsfaktor von 4 festgelegt (siehe Nachtrag Spitzenbegrenzung 2011). Von Probanden werden 1 bis 6 ml/m^3 (IARC 1996) offenbar ohne Reizung sechs Stunden lang vertragen, so dass bei $0,4 \text{ ml/m}^3$ auch nicht mit einer Reizwirkung zu rechnen ist. Bei der zulässigen Spitzenkonzentration von $0,4 \text{ ml/m}^3$ ist nicht mit einer MetHb-Bildung zu rechnen, da bei 5 ml/m^3 bei F344-Ratten der MetHb-Spiegel nur 3% beträgt.

Fruchtschädigende Wirkung. In Entwicklungstoxizitätsstudien nach Inhalation zeigen sich bei Ratten bis zur höchsten getesteten Konzentration von 40 ml/m^3 keine Effekte auf die Nachkommen bei gleichzeitig vorliegender Maternaltoxizität. Bei Kaninchen tritt bei der höchsten Konzentration von 100 ml/m^3 eine vermehrte Anzahl an Resorptionen auf, die nahe der der historischen Kontrolle liegt. Die NOAEC beträgt 40 ml/m^3 . In einer Zwei-Generationenstudie nach Inhalation sind bei den männlichen F1-Nachkommen bei 40 ml/m^3 der Fertilitätsindex, die Testes- und Nebenhodengewichte und die Zahl der Spermien reduziert. Der NOAEL für entwicklungstoxische Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane beträgt 10 ml/m^3 .

Nach oraler Gabe sind bei Ratten ab der niedrigsten Dosis von 20 mg/kg KG und Tag am 4. Lebenstag Effekte in Form von reduziertem Körpergewicht der Nachkommen festzustellen. Der Effekt auf das Gewicht der Nachkommen könnte sich auch postnatal über die Muttermilch ergeben haben. Auch eine Auswirkung der Bolusgabe im Vergleich zur Inhalation ist eine mögliche Erklärung. Bei Inhalation werden bei Ratten und Kaninchen keine solchen Befunde festgestellt, so dass die Ergebnisse nach oraler Gabe nicht weiter zur Bewertung der Entwicklungstoxizität am Arbeitsplatz herangezogen werden.

Da die 400- bzw. 100-fachen Abstände aus den NOAEC für Entwicklungstoxizität für Ratte und Kaninchen bzw. für entwicklungstoxische Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane zum MAK-Wert von 0,1 ml/m³ ausreichend groß sind, keine teratogenen Effekte aufgetreten sind, und anzunehmen ist, dass bei Nitrobenzol, wie bei Anilin gezeigt, die Nachkommen hinsichtlich der Methämoglobinbildung nicht empfindlicher reagieren als die adulten Tiere, wird Nitrobenzol der Schwangerschaftsgruppe C zugeordnet.

Hautresorption. Bei inhalativer Ganzkörperexposition von Probanden in Ruhe werden zwei Drittel über die Lunge und ein Drittel der Gesamtaufnahme aus der Gasphase über die Haut aufgenommen (Begründung 1998). Daher kann die innere Nitrobenzol-Belastung durch die Hautaufnahme um mehr als 25% erhöht werden und die „H“-Markierung von Nitrobenzol wird bestätigt.

Sensibilisierende Wirkung. Da keine Befunde zur haut- und atemwegssensibilisierenden Wirkung beim Menschen vorliegen und ein valider Local Lymph Node Assay an der Maus ein negatives Ergebnis liefert, erfolgt weiterhin weder eine Markierung mit „Sh“ noch mit „Sa“.

Literatur

- Agrawal A, Gutch M, Arora R, Jain N (2011) Acute cardiogenic pulmonary oedema with multi-organ dysfunction – still to learn more about nitrobenzene poisoning. *BMJ Case Rep*, doi: 10.1136/bcr.2011.5026
- Aguiar EG, Koldobsky C, de Toranzo EG, Castro JA (1987) Species and sex differences in the liver microsomal nitroreductive biotransformation of nifurtimox and benznidazole. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 287: 181–187
- Ask K, Décologne N, Asare N, Holme JA, Artur Y, Pelczar H, Camus P (2004) Distribution of nitroreductive activity toward nilotamide in rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 201: 1–9
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1990) Toxicological profile for nitrobenzene. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, USA, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=22&tid=3>
- BASF AG (1996) Cytogenetic study in vivo of nitrobenzene in mice, micronucleus test, single intraperitoneal application. Project No 26M0116/949010, BASF AG, Ludwigshafen, unveröffentlicht
- Belisario MA, Pecce R, Garofalo A, Sannolo N, Malorni A (1996) Erythrocyte enzymes catalyze 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene nitroreduction. *Toxicology* 108: 101–108

- Benson AM (1993) Conversion of 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) to 4-Hydroxyaminoquinoline 1-Oxide by a Dicumarol-Resistant Hepatic 4NQO Nitroreductase in Rats and Mice. *Biochem Pharmacol* 46: 1217–1221
- Biodynamics Inc (1984) An inhalation teratology study in rabbits with nitrobenzene (final report). Produced Biodynamics Inc, East Millstone, NJ for the Nitrobenzene Association, Wilmington, DE; Project No. 83-2725. EPA Doc No 40-8424492, NTIS OTS0510651
- Bonacker D, Stoiber T, Böhm KJ, Unger E, Degen GH, Thier R, Bolt HM (2004) Chromosomal genotoxicity of nitrobenzene and benzonitrile. *Arch Toxicol* 78: 49–57
- Buist HE, de Wit-Bos L, Bouwman T, Vaes WHJ (2012) Predicting blood:air partition coefficients using basic physicochemical properties. *Regul Toxicol Pharmacol* 62: 23–28
- Butterworth BE, Smith-Oliver T, Earle L, Loury DJ, White RD, Doolittle DJ, Working PK, Cattley RC, Jirtle R, Michalopoulos G, Strom S (1989) Use of primary cultures of human hepatocytes in toxicology studies. *Cancer Res* 49: 1075–1084
- Carreón T, Hein MJ, Hanley KW, Viet SM, Ruder AM (2014) Bladder cancer incidence among workers exposed to o-toluidine, aniline and nitrobenzene at a rubber chemical manufacturing plant. *Occup Environ Med* 71: 175–182
- Cattley RC, Everitt JI, Gross EA (1994) Carcinogenicity and toxicity of inhaled nitrobenzene in B6C3F1 mice and F344 and CD-rats. *Fundam Appl Toxicol* 22: 328–340
- Chongtham DS, Phurailatpam J, Singh MM, Singh TR (1999) Methaemoglobinaemia in nitrobenzene poisoning – a case report. *J Indian Med Assoc* 97: 469–470
- CIIT (Chemical Industry Institute of Toxicology) (1984) Ninety day inhalation toxicity study of nitrobenzene in F344-rats, CD-rats, and B6C3F1-mice. Chemical Industry Institute of Toxicology, Research Triangle Park, NC, USA, unveröffentlicht
- CIIT (1993) A chronic inhalation toxicity study of nitrobenzene in F344-rats, CD-rats, and B6C3F1-mice. Summary of findings. Chemical Industry Institute of Toxicology, Research Triangle Park, NC, USA, unveröffentlicht
- DePianto DJ, Chandriani S, Abbas AR, Jia G, N'Diaye EN, Caplazi P, Kauder SE, Biswas S, Karnik SK, Ha C, Modrusan Z, Matthey MA, Kukreja J, Collard HR, Egen JG, Wolters PJ, Arron JR (2014) Heterogeneous gene expression signatures correspond to distinct lung pathologies and biomarkers of disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 70: 48–56
- ECHA (European Chemicals Agency) (2014) Information on registered substances. Dataset on nitrobenzene (CAS Number 98-95-3), individual submission, first publication 03.03.2011, last modification 11.03.2014, <http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals>
- Eyer P (1979) Reactions of nitrosobenzene with reduced glutathione. *Chem Biol Interact* 24: 227–239
- Eyer P, Ascherl M (1987) Reactions of para-substituted nitrosoamines with human hemoglobin. *Biol Chem Hoppe Seyler* 368: 285–294
- Eyer P, Lierheimer E (1980) Biotransformation of nitrobenzene in the red blood cell and the role of glutathione. *Xenobiotica* 10: 517–526
- Green MN, Josimovich JB, Tsou KC, Seligman AM (1956) Nitroreductase activity of animal tissue and of normal and neoplastic human tissue. *Cancer* 9: 176–182
- Gupta G, Poddar B, Salaria M, Parmar V (2000) Acute nitrobenzene poisoning. *Indian Pediatr* 37: 1147–1148
- Haseman JK, Lockhart AM (1993) Correlations between chemically related site-specific carcinogenic effects in long-term studies in rats and mice. *Environ Health Perspect* 101: 50–54

- Haseman JK, Hailey JR, Morris RW (1998) Spontaneous neoplasm incidences in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice in two-year carcinogenicity studies: a National Toxicology Program update. *Toxicol Pathol* 26: 428–441
- Hedrich HJ (2012) The laboratory mouse, Hedrich HJ (Hrsg), 2. überarbeitete Auflage, 1. Juni 2012, ISBN: 978-0-12-382009-9, Academic Press, Elsevier, London, UK
- Hsu CH, Stedeford T, Okochi-Takada E, Ushijima T, Noguchi H, Muro-Cacho C, Holder JW, Banasik M (2007) Framework analysis for the carcinogenic mode of action of nitrobenzene. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 25: 155–184
- Huang Q, Wang L, Han S (1995) The genotoxicity of substituted nitrobenzenes and the quantitative structure-activity relationship studies. *Chemosphere* 30: 915–923
- Huang QG, Kong LR, Liu YB, Wang LS (1996) Relationships between molecular structure and chromosomal aberrations in in vitro human lymphocytes induced by substituted nitrobenzenes. *Bull Environ Contam Toxicol* 57: 349–353
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1996) Nitrobenzene. In: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Band 65, IARC, Lyon, FR, 380–408, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol65/mono65-11.pdf>
- Ikeda M, Kita A (1964) Excretion of p-nitrophenol and p-aminophenol in the urine of a patient exposed to nitrobenzene. *Br J Ind Med* 21: 210–213
- Kawashima K, Usami M, Sakemi K, Ohno Y (1995) Studies on the establishment of appropriate spermatogenic endpoints for male fertility disturbance in rodent induced by drugs and chemicals. I. Nitrobenzene. *J Toxicol Sci* 20: 15–22
- Kirkland DJ, Dresch JH, Marshall RR, Baumeister M, Gerloff C, Gocke E (1992) Normal chromosomal aberration frequencies in peripheral lymphocytes of healthy human volunteers exposed to a maximum daily dose of paracetamol in a double blind trial. *Mutat Res* 279: 181–194
- Kligerman AD, Erexson GL, Wilmer JL, Phelps MC (1983) Analysis of cytogenetic damage in rat lymphocytes following in vivo exposure to nitrobenzene. *Toxicol Lett* 18: 219–226
- Lehnert G, Henschler D (Hrsg) (1989) Nitrobenzol, Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte) und Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA), 1.–5. Lieferung, VCH, Weinheim
- Li H, Wang H, Sun H, Liu Y, Liu K, Peng S (2003) Binding of nitrobenzene to hepatic DNA and hemoglobin at low doses in mice. *Toxicol Lett* 139: 25–32
- Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Boor PJ, Khan MF (2008) Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. *Toxicol Appl Pharmacol* 233: 247–253
- Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Hazra TK, Boor PJ, Khan MF (2011) Induction of NEIL1 and NEIL2 DNA glycosylases in aniline-induced splenic toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 251: 1–7
- Ma H, Wang J, Abdel-Rahman SZ, Boor PJ, Khan ME (2013) Induction of base excision repair enzymes NTH1 and APE1 in rat spleen following aniline exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 267: 276–283
- Maples KR, Eyer P, Mason RP (1990) Aniline-, phenylhydroxylamine-, nitrosobenzene-, and nitrobenzene-induced hemoglobin thyl free radical formation in vivo and in vitro. *Mol Pharmacol* 37: 311–318
- Martínez MA, Ballesteros S, Almarza E, Sánchez de la Torre C, Búa S (2003) Acute nitrobenzene poisoning with severe associated methemoglobinemia: identification in whole blood by GC-FID and GC-MS. *J Anal Toxicol* 27: 221–225

- Mattioli F, Martelli A, Gosmar M, Garbero C, Manfredi V, Varaldo E, Torre GC, Brambilla G (2006) DNA fragmentation and DNA repair synthesis induced in rat and human thyroid cells by chemicals carcinogenic to the rat thyroid. *Mutat Res* 609: 146–153
- Meek ME, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003) A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Crit Rev Toxicol* 33: 591–653
- Medinsky MA, Irons RD (1985) Sex, strain and species differences in the response of rodents to nitrobenzene vapors. In: Rickert DE (Hrsg) Toxicity of nitroaromatic compounds, 5th CIIT Conference on Toxicology, Raleigh/NC, January 28–29, 1982, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, DC, USA
- Mirsalis JC, Tyson CK, Butterworth BE (1982) Detection of genotoxic carcinogens in the in vivo-in vitro hepatocyte DNA repair assay. *Environ Mutagen* 4: 553–562
- Mitsumori K, Kodama Y, Uchida O, Takada K, Saito M, Naito K, Tanaka S, Kurokawa Y, Usami M, Kawashima K, Yasuhara K, Toyoda K, Onodera H, Furukawa F, Takahashi M, Hayashi Y (1994) Confirmation study, using nitrobenzene, of the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity test protocol proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J Toxicol Sci* 19: 141–149
- Moore NP, McFadden LG, Landenberger BD, Thomas J (2013) Gender differences in the incidence of background and chemically induced primary pulmonary neoplasms in B6C3F1 mice: a retrospective analysis of the National Toxicology Program (NTP) carcinogenicity bioassays. *Exp Toxicol Pathol* 65: 1109–1115
- Neumann HG (2007) Aromatic amines in experimental cancer research: tissue-specific effects, an old problem and new solutions. *Crit Rev Toxicol* 37: 211–36
- Ohkuma Y, Kawanishi S (1999) Oxidative DNA damage by a metabolite of carcinogenic and reproductive toxic nitrobenzene in the presence of NADH and Cu(II). *Biochem Biophys Res Commun* 257: 555–560
- Robbiano L, Baroni D, Carrozzino R, Mereto E, Brambilla G (2004) DNA damage and micronuclei induced in rat and human kidney cells by six chemicals carcinogenic to the rat kidney. *Toxicology* 204: 187–195
- SCOEL (2002) Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for nitrobenzene. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, <http://ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=6757&langId=en>
- Stevens M (1967) Use of the albino guinea pig to detect the skin sensitising ability of chemicals. *Br J Ind Med* 24: 189–202
- Stockstill BL, Chang LY, Ménache MG, Mellick PW, Mercer RR, Crapo JD (1995) Bronchiolarized metaplasia and interstitial fibrosis in rat lungs chronically exposed to high ambient levels of ozone. *Toxicol Appl Pharmacol* 134: 251–263
- Styles JA (1978) Mammalian cell transformation in vitro. Six tests for carcinogenicity. *Br J Cancer* 37: 931–936
- Swenberg JA (1993) Alpha 2u-globulin nephropathy: review of the cellular and molecular mechanisms involved and their implications for human risk assessment. *Environ Health Perspect* 101: 39–44
- Sziza M, Magos L (1959) Toxikologische Untersuchung einiger in der ungarischen Industrie zur Anwendung gelangenden aromatischen Nitroverbindungen. *Arch Gewerbepathol Gewerbehyg* 17: 217–226

- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1985) Health and environmental effects profile for nitrobenzene. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC, USA, ECAO-CIN-P145
- US EPA (1991) Alpha2u-globulin: Association with chemically-induced renal toxicity and neoplasia in the male rat. Washington, DC, USA, <http://nepis.epa.gov>
- US EPA (2009) Toxicological review of nitrobenzene (CAS No. 98-95-3), in support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS), January 2009, Washington, DC, USA
- Wang JM, Ueng TH, Lin JK (1992) Biochemical and morphological alterations in the lungs and livers of mice following exposure to polluted air in a traffic tunnel. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 16: 77–83
- Wang XY, Demelash A, Kim H, Jensen-Taubman S, Dakir el H, Ozbun L, Birrer MJ, Linnoila RI (2009) Matrilysin-1 mediates bronchiolization of alveoli, a potential premalignant change in lung cancer. *Am J Pathol* 175: 592–604
- Wang J, Ma H, Boor PJ, Ramanujam VM, Ansari GA, Khan MF (2010) Up-regulation of heme oxygenase-1 in rat spleen after aniline exposure. *Free Radic Biol Med* 48: 513–518
- Weber K, Razinger T, Hardisty JF, Mann P, Martel KC, Frische EA, Blumbach K, Hillen S, Song A, Anzai T, Chevalier HJ (2011) Differences in rat models used in routine toxicity studies. *Int J Toxicol* 30: 162–173
- Wen B, Coe KJ, Rademacher P, Fitch WL, Monshouwer M, Nelson SD (2008) Comparison of in vitro bioactivation of flutamide and its cyano analogue: evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome P450 reductase. *Chem Res Toxicol* 21: 2393–2406
- WHO (World Health Organization) (2003) Nitrobenzene. IPCS (International programme on chemical safety) – Environmental health criteria 230, WHO, Genf, Schweiz
http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/230_part_I.pdf?ua=1
http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/230_part_II.pdf?ua=1

abgeschlossen am 08.10.2015