

**Umweltforschungsplan
des Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz und Reaktorsicherheit**

Förderkennzeichen (UFOPLAN) 203 61 215

**Pathogenetische und immunbiologische Untersuchungen zur Frage: Ist die Extrapolation der Staubkanzerogenität von der Ratte auf den Menschen gerechtfertigt?
Teil II: Histologie**

Abschlussbericht

**Dr. Heinrich Ernst
Dr. Angelika Kolling
Dr. Bernd Bellmann
Priv.-Doz. Dr. Susanne Rittinghausen
Prof. Dr. Uwe Heinrich
Prof. Dr. Friedrich Pott**

**Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM)
Nikolai-Fuchs-Str. 1
30625 Hannover**

Institutsleiter

Prof. Dr. Uwe Heinrich

**IM AUFTRAG
DES UMWELTBUNDESAMTES**

November 2005

Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB	2.	3.
4. Titel des Berichts Pathogenetische und immunbiologische Untersuchungen zur Frage: Ist die Extrapolation der Staubkanzerogenität von der Ratte auf den Menschen gerechtfertigt? Teil II: Histologie		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Ernst, Heinrich; Rittinghausen, Susanne; Kolling, Angelika; Bellmann, Bernd; Heinrich, Uwe; Pott, Friedrich		8. Abschlußdatum Juni 2005
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin Nikolai-Fuchs-Str.1 30625 Hannover		9. Veröffentlichungsdatum November 2005
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Wörlitzer Platz 1, 06844 Dessau		10. UFOPLAN-Nr. FKZ 20361215
		11. Seitenzahl 75
		12. Literaturangaben 81
		13. Tabellen und Diagramme 16
		14. Abbildungen 5
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung <u>Fragestellungen</u> eines Kanzerogenitätsversuchs mit intratracheal instillierten Stäuben an Wistar-Ratten: 1. Erzeugt nicht bio-beständiges amorphes SiO ₂ bei chronischer Entzündung durch viele kleine Dosen Tumoren? – 2. Wirkt Ruß-UF (mittl. D. 0.014 µm, BET-Oberfl. ~300m ² /g) in der Nähe des Staubvolumengrenzwerts (1 µL/g Kontrolllunge; Kontrolllunge 1,3 g) kanzerogen (geschätzte Lungendosis 1,8 µL, Oberfl. 1 m ²)? – 3. Ist eine niedrige Kohlenstaubdosis mit großem mittl. Durchm. (4 µm) noch messbar kanzerogen (geschätzte Lungendosis 4,8 µL oder 0,027 m ²)? – 4. Reduziert der Silikosehemmstoff Polyvinylpyridin-N-oxid (PVNO) die Kanzerogenität einer relativ niedrigen Quarzdosis doch deutlich? Sie war in einem früheren Versuch mit höherer Dosis nicht erniedrigt, was zur Hypothese wesentlich unterschiedlicher Wirkungswege zur Fibrose und Tumorentstehung führte. – 5. In welchen Fällen bringt eine Intensivhistologie (IH, z.B. Diagnostik von 60 Schnitten/Lunge) anstatt einer Routinehistologie (RH, 6 Schnitte/Lunge) einen wesentlichen Erkenntnisgewinn? <u>Ergebnisse</u> liegen von 17 Ratten jeder Gruppe vor (Kontrolle: 22), die länger als 2 Jahre im Versuch waren: 1. Amorphes SiO ₂ : 2 Tumortiere mit RH, 6 mit IH plus 7 mit Präneoplasien; Entzündungsgrad nach 9 Mon. wie Ruß-UF; PMN höher und Fibrose stärker als beim Ruß, dennoch durch Ruß mehr Tumoren. (Kontr. kein Tumor, 1 Präneoplasie) – 2. Ruß-UF: 6 Tumortiere mit RH. Vergleich RH mit IH bei 7 Ratten: Verhältnis der Tumortiere 1 zu 3, der Tumoranzahl 4 zu 10. – 3. Kohlenstaub: Kein Tumor mit IH, 3 Präneoplasien. Dosisvergleich Kohle zu Ruß: Vol. 2,7 zu 1, Oberfl. 1 zu 37; Durchm.verhältnis 1 zu 286. – 4. Mäßige Reduktion der Kanzerogenität durch PVNO; PVNO-Hemmefekte nach wie vor durch Adsorption an Quarzoberfläche erklärbar. – 5. Im Bereich der Nachweisgrenze einer Kanzerogenität kann die IH entscheidend höhere Tumorhäufigkeiten bringen.		
17. Schlagwörter Staub, Lunge, Ratte, Entzündung, Quarz, amorphesSiO ₂ , Ruß, Kohlenstaub, Poly-2-vinylpyridin-N-oxid (PVNO)		
18. Preis	19.	20.

Inhaltsverzeichnis

0.1	Zusammenfassung.....	3
0.2	Summary.....	4
1.	Einleitung.....	5
2.	Material und Methoden	7
	Prüfsubstanzen	7
	Versuchstiere und Tierhaltung	7
	Behandlung	8
	Quarz	8
	Amorphes SiO ₂	8
	Ruß-UF	9
	Kohlenstaub	9
	Sektion der Versuchstiere	9
	Herstellung der Präparate für die histologische Untersuchung und histopathologische Diagnostik	10
	Histologie an Einzelschnitten	10
	Histologie an Stufenschnitten	10
	Näherungsweise Ermittlung von Tumorvolumina	10
	Diagnostische Kriterien	11
	Herstellung der Präparate für die bildanalytische Bestimmung des Fibrosegrades und Meßmethode	12
	Statistik.....	12
3.	Ergebnisse.....	13
	Histopathologie	13
	<i>Dritter Teil des Hauptversuchs über 9 Monate (Prüfung 05N99524)</i>	13
	<i>Vierter Teil des Hauptversuchs über 30 Monate (Prüfung 05N99525)</i>	13
4.	Bewertung der Ergebnisse und Diskussion.....	17
	Applikationsmethode.....	17
	Wie sind Entzündungsreaktionen, Fibrosegrad, Präneoplasien und Tumoren bei Exposition gegenüber Quarz, Quarz + PVNO, amorphes SiO ₂ , Printex®-90-Ruß und Kohlenstaub miteinander quantitativ assoziiert? Welchen Stellenwert hat eine chronische Entzündung als Tumorursache?	18
	Reduziert der Silikosehemmstoff PVNO neben der Fibroseentwicklung auch die Tumorentstehung und die Häufigkeit präneoplastischer Läsionen, die durch eine relativ niedrige Quarzdosis erzeugt werden?	21
	Führt amorphes SiO ₂ als zwar relativ schnell eliminiert, aber toxischer Staub nach Verabreichung kleiner Einzeldosen zu Tumoren?	21
	Wirken Ruß (Printex®-90 als Modellsubstanz für Dieselruß) und Kohlenstaub in niedriger Dosis im Intratrachealversuch bei der Ratte kanzerogen?	23
	Unterscheiden sich histologisch die Reaktionen auf „große feine“ noch alveolengängige Partikel von denen auf ultrafeine Partikel?	24
	Schlussfolgerungen für die Planung und Durchführung von Kanzerogenitätsversuchen, die sich aus der Erkennung einer höheren Anzahl von Tumoren durch die Diagnostik einer größeren Anzahl von Gewebsschnitten ergeben.....	24
	Welche Schlüsse können von den Rattenexperimenten auf die Wirkung von Staub-Expositionen auf den Menschen gezogen werden?	26
5.	Literatur.....	29
6.	Anhang Text.....	35
6.1	Welches Dosismaß ist für einen Vergleich der kanzerogenen Wirkungsstärken verschiedener GBS der geeignetste? (F. Pott)	35
6.2	Vergleich von epidemiologisch mit tierexperimentell gestützten Krebsrisiken durch Feinstäube (F. Pott)	37
7.	Anhang Tabellen.....	45

Tabelle 7.1: Kenndaten des Kohlen- und Quarzstaubs	45
Tabelle 7.2: Kenndaten des geprüften Rußes und des amorphen SiO ₂	46
Tabelle 7.3: Idealstäube und untersuchte Stäube mit einigen ihrer physikalischen Kenndaten:.....	47
Tabelle 7.4: Behandlungsgruppen 9-Monatsversuch (ITEM Prüfung 05N99524)	48
Tabelle 7.5: Behandlungsgruppen 30 Monatsversuch (ITEM Prüfung 05N99525).....	48
Tabelle 7.6: Lebenszeiten der Einzeltiere im Versuch	49
Tabelle 7.7: Näherungsbestimmung der Volumina (mm ³) aller Lungentumoren, die in 70 Lungen der vier Versuchsgruppen nach Auswertung von 60 Schnitten pro Lunge histopathologisch diagnostiziert wurden.	61
Tabelle 7.8: 9-Monatsversuch (Prüfung 05N99524). Zusammenfassung der histopathologischen Lungenbefunde	62
Tabelle 7.9: Häufigkeiten der histopathologisch diagnostizierten Lungentumoren und Präneoplasien bei weiblichen Wistar-Ratten durch Untersuchung von 6 und zum Teil von 60 Lungenschnitten nach intratrachealer Instillation von Stäuben mit unterschiedlicher kanzerogener Potenz	64
Tabelle 7.10: Wahrscheinlichkeit in % einen Tumor definierter Größe (bzw. Höhe) bei der angegebenen Anzahl Schnitte zu finden.	65
Tabelle 7.11: 30-Monatsversuch (Prüfung 05N99525). Zusammenfassung der nicht-neoplastischen histopathologischen Befunde der Lunge.	66
Tabelle 7.12: 9-Monatsversuch (Prüfung 05N99524) und 30-Monatsversuch [inklusive der Ergebnisse der Serienschnitte] (Prüfung 05N99525) Numerischer Mittelwert der Einzelbewertungen von 10 bzw. 17 Lungen/Gruppe, bei denen das Ausmaß der Veränderungen in Schweregrade von 0 – 5 eingeteilt wurde.	69
Tabelle 7.13: Schweregrad histologisch beurteilter und bildanalytisch gemessener nicht neoplastischer Lungenveränderungen 9 und 28 - 29 Monate nach intratrachealer Instillation von Stäuben (Mittelwerte).....	70
Tabelle 7.14: Häufigkeiten der histopathologisch diagnostizierten Lungentumoren und Präneoplasien bei weiblichen Wistar-Ratten durch Untersuchung von 6 und zum Teil von 60 Lungenschnitten nach intratrachealer Instillation von Stäuben mit unterschiedlicher kanzerogener Potenz.	72
Tabelle 7.15: Zwischenergebnisse des mittleren Entzündungs- und Fibrosegrades pro Versuchsgruppe.	74
Tabelle 7.16: Relative Häufigkeiten der Lungentumortypen bei Mensch und Ratte	75

0.1 Zusammenfassung

Der Kanzerogenitätsversuch an Ratten sollte als letzte Stufe einer Untersuchungsreihe Fragen zur Staubkanzerogenität beantworten. Dazu wurden als spezifisch toxische Stäube Quarz und ultrafeines amorphes SiO₂ ausgewählt, außerdem zwei granuläre Stäube ohne bekannte spezifische Toxizität, die sich in ihrer Partikelgröße und spezifischen Oberfläche erheblich unterscheiden; das sind ultrafeiner Industrieruß (mittl. Größe 0,014 µm, BET-Oberfläche ca. 300 m²/g) und quarzfreier Kohlenstaub (mittl. Größe 4 µm, BET-Oberfläche 4,1 m²/g). Darüber hinaus wurde eine Quarzgruppe mit dem Silikosehemmstoff Poly-2-vinylpyridin-N-oxid (PVNO) behandelt, um zu überprüfen, ob PVNO die durch Quarz induzierte Kanzerogenese bei niedriger Quarzdosis ebenso wenig hemmt wie früher bei hoher Dosis.

Die Stäube wurden Wistar-Ratten als Suspension in NaCl-Lösung in die Luftröhre instilliert, und zwar in relativ niedrigen Dosen: 3 mg Quarz, 15 mg amorphes SiO₂ (aufgeteilt auf 30 Instillationen von 0,5 mg im Abstand von 2 Wochen wegen der kurzen Verweildauer in der Lunge), 5 mg Ruß-UF und 10 mg Kohlenstaub (aufgeteilt auf 10 Instillationen in wöchentlichem Abstand). Nach 9 Monaten wurden 10 Tiere jeder Gruppe getötet und auf Zellen in der bronchio-alveolären Spülflüssigkeit und Lungenveränderungen untersucht. Alle anderen Tieren lebten ihre normale Lebensdauer bis zum Versuchsabschluß im 29. Monat nach Versuchsbeginn.

Von den alt gewordenen Tieren konnten nur 17 aus jeder Gruppe untersucht werden, und zwar mit unterschiedlichem Aufwand. In drei Gruppen (amorphes SiO₂, Kohlenstaub, Kontrolle) wurden von allen Lungen 60 Schnitte anstatt routinemäßig 6 Schnitte auf Tumoren und Präneoplasien untersucht, weil insbesondere bei dem bisher „negativen“ amorphen SiO₂ möglichst alle Tumortiere erkannt werden sollten. Die Ergebnisse zeigen die tendenziell erwarteten Unterschiede zwischen Intensivhistologie (60 Schnitte untersucht, 6 von 17 Tieren mit Lungentumor, 7 mit Präneoplasien) und Routinehistologie (nur jeder 10. Schnitt beurteilt, 2 von 17 Tieren mit Lungentumor, keine Präneoplasien). Die nicht signifikante Kanzerogenität nach der Routineuntersuchung geht allerdings nicht parallel mit den Befunden über Entzündung und Fibrose, deren Ausprägung etwa ebenso stark ist wie bei den beiden Gruppen Quarz mit PVNO und Ruß, bei denen auch die Kanzerogenität mit 47 % bzw. 35 % deutlich im positiven Bereich liegt. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten (PMN) in der Lungenspülflüssigkeit war beim amorphen SiO₂ sogar 66 % höher als in der Quarzgruppe ohne PVNO. Dazu stellt sich die Frage nach einem zusätzlichen Faktor, der bei den in der Lunge persistierenden Stäuben neben der Entzündung zur Tumorinduktion beiträgt. Dieser Faktor könnte z.B. in einem anderen Entzündungstyp liegen. Mehrere Autoren schließen aus ihren Befunden auf eine Partikelaufnahme durch Epithelzellen und dort auf eine direkte toxische Wirkung, die auch ohne Entzündung oder parallel dazu abläuft. Die neuen Ergebnisse sprechen nicht dafür, dass chronische Entzündungen jeder Genese für die Lunge ein kanzerogenes Agens darstellen, dessen Stärke mit den bisher üblichen diagnostischen Methoden quantifiziert werden kann.

PVNO hemmte die Quarzkanzerogenität zwar im Prinzip, aber quantitativ nur mäßig. Hier besteht ein Unterschied zu alten Untersuchungen, in denen der Hemmeffekt von PVNO auf die zytotoxische und fibrogene Quarzwirkung stärker ausgeprägt war und bis zur Reduzierung auf die Wirkung von „Inertstaub“ geführt hatte.

Ultrafeiner Ruß erzeugte bei 35 % der 17 mit Routinediagnostik untersuchten Tiere Tumoren, und zwar mit einer Lungenstaubdosis, die nur etwa 1½-mal so hoch war wie der Volumengrenzwert für Feinstaub der MAK-Kommission. Kohlenstaub mit rechnerisch im Mittel fast 300-mal größeren Partikeln induzierte in der niedrigen verabreichten Dosis bei den 17 untersuchten Tieren keine Tumoren. Dieser fehlende positive Befund kann nicht im Sinne eines tolerables Krebsrisikos von weniger als 1 : 1.000 bei Einhaltung des MAK-Wertes interpretiert werden, weil die etwa 7-fache Dosis sich in einem früheren Versuch mit 57 % Tumorhäufigkeit als stark tumorerzeugend erwiesen hat und der Vertrauensbereich bei der kleinen Tierzahl groß ist.

0.2 Summary

The carcinogenicity experiment with rats, as the last part of a series of investigations, was to provide information on dust carcinogenicity. Quartz and ultrafine amorphous SiO₂ as specifically toxic dusts were selected for this experiment, and in addition two granular dusts without known specific toxicity, but with marked differences in particle size and specific surface area: ultrafine industrial carbon black (mean size 0.014 µm, BET surface approx. 300 m²/g) and non-quartz-containing coal dust (mean size 4 µm, BET surface 4.1 m²/g). In addition, one quartz group was treated with the silicosis inhibitor poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO), so as to verify whether PVNO also does not inhibit quartz-induced carcinogenesis at low quartz doses, as previously observed with high quartz doses.

The dusts, suspended in NaCl solution, were instilled into the trachea of Wistar rats at relatively low doses: 3 mg quartz, 15 mg amorphous SiO₂ (split between 30 instillations of 0.5 mg each at intervals of 2 weeks because of the short retention time in the lung), 5 mg UF carbon black and 10 mg coal dust (split between 10 instillations at weekly intervals). After 9 months, 10 animals of each group were killed and examined for cells in the bronchoalveolar lavage fluid and for pulmonary lesions. All other animals lived for their normal lifetime until termination of the experiment in month 29 after the experimental start date.

Out of the animals that had reached an old age, only 17 from each group could be examined, and investigations were performed at different levels of intensity. In three groups (amorphous SiO₂, coal dust, control), 60 sections per lung, instead of the routine 6 sections, were investigated for tumors and preneoplastic lesions, aiming to detect all tumor-bearing animals in particular in the group treated with amorphous SiO₂, which so far had produced "negative" results. The results obtained are in line with the expected differences between intensive (60 sections investigated, 6 of 17 animals with lung tumors, 7 with preneoplastic lesions) and routine histological analyses (only every 10th section analyzed, 2 of 17 animals with lung tumors, no preneoplastic lesions). The non-significant carcinogenicity indicated by the routine investigation, however, is in contrast to the findings of inflammation and fibrosis, which were found at degrees roughly corresponding to those in the two groups treated with quartz and PVNO and with carbon black, where carcinogenicity (47 % and 35 %, respectively) was also clearly in the positive range. The number of neutrophil granulocytes (PMN) in lung lavage fluid was even 66 % higher with amorphous SiO₂ than in the group treated with quartz but not with PVNO. The question thus arises as to whether there is an additional factor contributing to tumor induction besides inflammation in the case of dusts that persist in the lung. This factor could e.g. lie in a different type of inflammation. Several authors have concluded from their findings that the epithelial cells take up particles, leading to a direct toxic effect which may also occur without inflammation or in parallel with it. The new results do not support the hypothesis that chronic inflammation of any origin acts to the lung as a carcinogenic agent whose potency could be quantified with the presently common diagnostic methods.

PVNO, in principle, inhibited quartz carcinogenicity, but quantitatively the effect was only moderate. There is a difference here compared to previous investigations, in which the inhibitory effect of PVNO on the cytotoxic and fibrogenic actions of quartz had been stronger, resulting in a reduction even to the effect of "inert dust".

Ultrafine carbon black produced tumors in 35 % of the 17 animals examined with the routine diagnostic methods, and this result was obtained with a lung dust dose that was only about 1.5 times the volume limit value for fine dust defined by the MAK commission. Coal dust, whose calculated mean particle size is larger by a factor of almost 300, induced no tumors at the low dosage in the 17 animals examined. This non-positive finding though cannot be interpreted in the sense of a tolerable cancer risk of less than 1 : 1.000 if the MAK value is complied with, because an approx. 7-fold dose proved to be strongly carcinogenic in a previous experiment with a tumor incidence of 57 % and the confidence interval is large with so small a number of animals.

1. Einleitung

Zahlreiche schwerlösliche Stäube mit geringer oder bisher nicht erkannter spezifischer toxischer Wirkung haben in der Rattenlunge nach Inhalation oder intratrachealer Instillation zur Tumorbildung geführt. Unklar ist, inwieweit Lungenläsionen nach hoher Exposition von Stäuben als rattenspezifisch angesehen werden; insbesondere eine persistierende Entzündung sowie multifokale bronchiolo-alveolare Hyperplasien, die aus Typ-II Pneumozyten und Bronchialepithelien hervorgehen.

Ziel des Forschungsprojektes war eine zeitlich mehrstufige Untersuchung der Beziehungen zwischen Entzündungsstadien und Fibroseentwicklung als Vorläufer einer späteren Tumorentstehung in der Rattenlunge nach intratrachealer Instillation unterschiedlicher Stäube: Quarz, Quarz + PVNO (subkutan applizierter Silikosehemmstoff), amorphes SiO₂ (löslich), Kohlenfeinstaub und ultrafeiner Ruß. Diese Studie umfasste 5 Abschnitte:

1. Vorversuche
2. Hauptversuch 1 Monat (05N98524)
3. Hauptversuch 3 Monate (05N99501)
4. Hauptversuch 9 Monate (05N99524)
5. Hauptversuch 28-29 Monate (05N99525)

Studie 1, 2, und 3 (05N98524 und 05N99501) dienten zur Dosisfindung für den Kanzerogenitätsversuch. Nach Abschluss der 1- und 3-Monatsstudie richteten sich die längerfristigen Versuche (9 und 30 Monate) auf die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- Wie sind Entzündungsreaktionen, Fibrosegrad, Präneoplasien und Tumorhäufigkeit durch Quarz (DQ 12), Quarz + PVNO, amorphes SiO₂, Ruß Printex®-90 und Kohlenstaub miteinander quantitativ assoziiert?
- Reduziert der Silikosehemmstoff PVNO (Polyvinylpyridin-N-oxid) neben der Fibroseentwicklung auch die Tumorentstehung und die Häufigkeit der präneoplastischen Läsionen, die durch eine relativ niedrige Quarzdosis erzeugt werden? Lässt sich aus der Antwort auf diese Frage schließen, dass Fibrose und Lungentumorhäufigkeit sich zumindest partiell voneinander unabhängig entwickeln?
- Führt amorphes SiO₂ als zwar leicht löslicher, aber toxischer Staub nach Verabreichung kleiner Einzeldosen zu Tumoren durch die induzierte chronische Entzündung? Lässt sich die Tumorursache als *chronische Entzündung* identifizieren, unabhängig von der Ursache der Entzündung, oder ist die Anwesenheit von biobeständigen Partikeln in der Lunge eine zusätzliche Voraussetzung für die Tumorentstehung?

(Anmerkung: Zum Zeitpunkt des Projektantrags wurde aufgrund von Hinweisen angenommen, der in Wasser unlösliche Staub würde in der Lunge größtenteils mit kurzer Halbwertszeit gelöst. Die Annahme einer leichten Löslichkeit konnte aber nicht mit Daten untermauert werden. Zu belegen ist bisher nur eine kürzere Persistenz in der Lunge im Vergleich mit anderen Stäuben.)

- Unterscheiden sich die histologisch erfassbaren Reaktionen auf Partikel, deren Größen am oberen Ende der Alveolengängigkeit liegen, wesentlich von denen auf ultrafeine Partikel?
- Wirkt eine relativ niedrige Dosis ultrafeiner Rußpartikel im Instillationsversuch an der Rattenlunge noch kanzerogen?
- Wirkt eine relativ niedrige Kohlenstaubdosis (mittlerer Durchmesser 4 µm) im Instillationsversuch an der Rattenlunge noch kanzerogen?
- Ist es erforderlich, mit der Schnitzzahl von 60/Lunge zu arbeiten, um bei langen Tumorinduktionszeiten auch kleine, makroskopisch nicht erkennbare Tumoren histopathologisch erfassen zu können?
- Inwieweit sprechen die bekannten Reaktionen auf granuläre biobeständige Stäube in der Menschenlunge für oder gegen eine Analogie der Befunde bei Ratte und Mensch?

Die wichtigsten Ergebnisse aus den Vorversuchen, der 28-Tage und 90-Tage-Studie wurden veröffentlicht (Ernst et al. 2002). Die Auswertung beinhaltete die Analyse der Lungenspülflüssigkeit (BALF), immunbiologische, gentoxische und histopathologische Untersuchungen. Sie soll im Folgenden kurz dargestellt werden: In den Quarz- und amorphen SiO₂-Gruppen bewirkte PVNO eine deutliche Verringerung verschiedener Entzündungsparameter. Auch histopathologische Untersuchungen (28- und 90-Tage-Studien) zeigten in den PVNO-Gruppen eine Verringerung von Inzidenz- und Schweregrad der interstitiellen Fibrose, bronchiolo-alveolären Hyperplasien und granulomatöser Alveolitis. Die *in vitro* Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Stickoxid (NO) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) von BALF-Zellen gegenüber Lipopolysacchariden (LPS) war in allen Partikelgruppen verringert. PVNO bewirkte eine Erhöhung der Reaktivität gegenüber LPS in den Quarz- und amorphen SiO₂-Gruppen. Nach 9 Monaten zeigte die Analyse der BALF ähnlich erhöhte Enzymwerte, Gesamtproteinwerte und Leukozytenzahlen. Inwieweit diese Reaktionen mit der Tumorhäufigkeit in den Versuchsgruppen korrelieren, sollte nach der histologischen Auswertung der Kanzerogenitätsstudie beantwortet werden.

Histologische Ergebnisse der 9-Monatsstudie (05N99524) und der Kanzerogenitätsstudie (05N99525) werden im Folgenden beschrieben.

2. Material und Methoden

Prüfsubstanzen

Quarz: Dörentruper Quarzsand, Mahlung Nr. 12 (Robock 1973). Partikelgröße 50 % < 1,1 µm. Quarzstaub wurde in einer Reihe von Inhalationsstudien an Ratten untersucht. Sowohl nach Inhalation als auch nach intratrachealer Instillation wurden Lungentumoren beschrieben. Alveolengängiger kristalliner SiO₂-Staub in Form von Quarz und Cristobalit ist als Humankanzerogen eingestuft (IARC, 1997; Greim, 1999; Schlüter, 2003). In dieser Studie wurde Quarz als Positivkontrolle verwendet.

Amorphes SiO₂: Aerosil® 150 von Degussa (verdampftes Siliziumdioxid) mit einem mittleren arithmetischen Durchmesser der Primärpartikel von 0,014 µm; BET Oberfläche 150±15 m²/g; Dichte ~ 2,2 g/m³; > 99,8 % SiO₂ (Degussa 1984). Amorphes SiO₂ ist akut toxisch und kann eine Fibrose erzeugen; bisher ist keine eindeutige Kanzerogenität beschrieben worden.

Ruß: Printex®-90 von Degussa mit einem mittleren Durchmesser der Primärpartikel von 0,014 µm; BET Oberfläche ca. 300 m²/g, Dichte 1,8-1,9 g/m³ (Degussa 1994). Mit diesem Rußtyp wurden zwei Inhalationsstudien an Ratten durchgeführt, in denen Lungentumoren nachgewiesen wurden (Heinrich et al. 1994; 1995). Die Lungenbeladungen mit Ruß am Ende des ersten Expositionsjahres waren jedoch mit 15 und 38 mg sehr hoch.

Kohlenstaub: gemahlene Magerkohle mit SiO₂ < 0,1 %, Asche 5 %, Dichte 1,4 g/ml, Partikelgröße 50 % 4 µm (gemessen mit dem Coulter Counter) (Armbruster et al. 1979), BET Oberfläche 4,1 m²/g (Eickhoff 2001).

Weitere Kenndaten der vier geprüften Stäube können **Tabelle 7.1** bis **Tabelle 7.3** entnommen werden.

Poly-2-vinylpyridin-N-oxid (PVNO): Laborname P 204 (Brockhaus & Schlipkötter, 1960). Hergestellt 1986 im Labor von Dr. Brockhaus, Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Düsseldorf; 2 % NaCl-Lösung. PVNO dient als experimentelles Modell, um den Mechanismus der quarzinduzierten Tumorentwicklung im Vergleich mit der bekannten Silikosehemmung (Pott et al. 1970; Pott, 2004) in diesem Projekt zu untersuchen.

Tween® 80 (Polyoxyethylen-sorbitanmonooleat): von Sigma-Aldrich P-1754. Tween® 80 wurde als Detergens für die Suspension von ultrafeinem Ruß und Kohlenstaub verwendet.

Versuchstiere und Tierhaltung

Weibliche Wistar WU Ratten (Crl:Wi(WU)BR) wurden im Alter von 6 Wochen von Charles River Deutschland, Sulzfeld, bezogen und randomisiert auf die Käfige verteilt. Die Tiere wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten: Zwei Ratten pro Polycarbonat-Käfig mit 800 cm² Grundfläche, Leitungswasser, pelletiertes Futter (1324N spezial, Altromin International, D 32791 Lage) ad libitum, Weichholz-Einstreugranulat, Raumtemperatur 22 ±2° C, relative Luftfeuchtigkeit 55 ±15 % und 12 h hell/dunkel-Zyklus. Alle Tiere wurden täglich beobachtet, ihr Körpergewicht individuell einmal pro Woche in den ersten drei Monaten ermittelt, in der Folgezeit alle 4 Wochen bis zum Versuchsende.

Behandlung

Die Partikelsuspensionen wurden den mit CO₂:O₂ (65 %:35 %) anästhesierten Ratten intratracheal instilliert. Unmittelbar vor der Applikation wurden die Suspensionen mittels Ultraschall homogenisiert und mit einem Mixer bis nach der Instillation in Suspension gehalten. Dosierungen und Behandlungsintervalle sind **Tabelle 7.4** und **Tabelle 7.5** zu entnehmen.

Begründung der angewandten Dosen

Quarz

Die Dosis wurde so gewählt, dass kein Wirkungsmaximum erreichen werden sollte, sie sollte so niedrig sein, dass sie durch einen nicht spezifisch toxischen Staub mit ähnlicher Partikelgrößenverteilung und Dichte höchstens zu einer nicht signifikanten Erhöhung der Tumorraten führen würde. Auch wurde beabsichtigt, dass das Maximum der lichtmikroskopisch beurteilten Entzündungsstärke eindeutig unter dem Maximum der histopathologischen Bewertungsskala liegen sollte. Damit sollte eine Verkürzung der Lebenszeit durch die Silikose vermieden werden, wie sie in erheblichem Maße nach Instillation einer Dosis von 15 x 3 mg der gleichen Quarzstaubcharge aufgetreten war (Pott et al., 1994). Allerdings hatten in der gleichen Versuchsreihe 15 Instillationen zu je 3 mg Quarz Min-U-Sil 15 die Überlebenszeit nicht verkürzt; außerdem wurde in morphometrischen Untersuchungen eine deutliche Hemmung der Fibroseentwicklung durch PVNO nach mehr als 2-jähriger Versuchszeit beobachtet (Friemann et al. 1995), aber im Unterschied dazu *keine* Reduzierung der Tumorraten. Infolgedessen ging es bei der Wahl der Quarzdosis darum, ein „zu hoch“, als auch ein „zu niedrig“ zu vermeiden, letzteres, um ein Verminderungspotential des PVNO auf die Kanzerogenität, wenn es denn wirklich vorliegt, auch erkennbar zu machen. Mit der nunmehr angewandten Instillation von 3 mg Quarzstaub schienen die Anforderungen erfüllt.

Amorphes SiO₂

Ziel war es, eine chronische pulmonale Entzündung ähnlich wie durch alveolengängige granuläre biobeständige Stäube ohne bekannte spezifische Kanzerogenität (GBS) zu erzeugen und aufrecht zu erhalten; die Entzündung sollte aber nicht wesentlich mit der Anwesenheit eines GBS in der Lunge assoziiert sein. Aufgrund der mehrfach beschriebenen starken entzündlichen Wirkung von amorphem SiO₂ (s. 4.4) und keinem begründbaren Verdacht auf eine Kanzerogenität nach makroskopischer Auswertung der 19-Stäube-Studie (Pott und Roller, 2000) fiel die Wahl auf hochdisperse amorphes Siliciumdioxid. Dieser Ultrafeinstaub ist zwar in Wasser nicht löslich (Degussa, Sicherheitsdatenblatt für AEROSIL 200; 24.06.1982); aber seine seit langem bekannte hohe akute Toxizität einerseits und die Rückbildung von erzeugten Entzündungsreaktionen und Granulomen nach dem Absetzen der Exposition andererseits wurde auf seine – im Verhältnis zum Quarz – rasche Elimination zurückgeführt. Im Rahmen des Projekts wurde die Verweildauer von Aerosil 150 in der Rattenlunge untersucht (Ernst et al. 2002). 6 Stunden nach der Instillation von 2 mg wurden in den Lungen 82 % SiO₂ gefunden, 18 % nach zwei Tagen. Die sich daran anschließende Halbwertszeit betrug 11 Tage. Dabei konnte allerdings gelöstes und nicht gelöstes SiO₂ nicht voneinander unterschieden werden. Hiermit ist eine wichtige Frage über das Verhalten im Körper nicht geklärt.

Im Hauptversuch wurden 30 Instillationen von je x 0,5 mg SiO₂ amorph in zweiwöchigem

Abstand verabreicht mit der Erwartung, dass die damit über einen Zeitraum von etwa fünfviertel Jahren erzeugte chronische Entzündung ausreicht, um eine Tumorentstehung zu induzieren, falls ein solcher Wirkungsmechanismus den entscheidenden Verursacher darstellt.

Ruß-UF

Die instillierte Dosis sollte zu einer Lungenbeladung führen, die für den Ultrafeinstaub nicht wie in den meisten vorangegangenen Untersuchungen deutlich über dem Staubvolumengrenzwert der MAK-Kommission von 1 µL Staub/g Kontroll-Lunge liegt (Greim, 1997), sondern nur unwesentlich darüber. Dieser Grenzwert gilt zwar nur für Feinstaub und nicht für Ultrafeinstaub, aber die von der MAK-Kommission formal festgelegte Grenze zwischen der Partikelgröße von Feinstaub und Ultrafeinstaub von 0,1 µm sollte nicht als biologisch begründete Schwelle betrachtet werden, sondern als Punkt irgendwo in einem kontinuierlichen Übergang, dessen Verlauf noch nicht hinreichend bekannt ist. Zur Zeit der Antragstellung 1997 war noch von der Vorstellung ausgegangen worden, der hier verwandte ultrafeine Ruß Printex 90 sei ein gut geeigneter Modellstaub für Dieselrußpartikel, weil die am Dieselruß adsorbierten organischen Stoffe keinen wesentlichen Anteil an der kanzerogenen Wirkung verursachen und weil die Primärpartikel von Dieselruß in der gleichen Größenklasse liegen (Klingenberg et al., 1991). Diese Annahmen treffen bezüglich der organischen Stoffe nach wie vor zu, aber die kugelförmigen Primärteilchen des Dieselruß von 0,01 bis 0,05 µm Durchmesser vergrößern sich durch Agglomeration und Aggregatbildung weit mehr als Ruß Printex 90. Dieser Unterschied erklärt die in mehreren Untersuchungen etwa um den Faktor 2 stärkere Wirkung des künstlichen Rußes im Vergleich zum Dieselruß.

Kohlenstaub

Die Gesamtdosis von 10 mg wurde aufgrund der Erfahrungen aus der 19-Stäube-Studie gewählt (Pott und Roller, 2003). Die dort angewendeten Dosen wiederum hatten sich an der Staublast der Lungen von Bergleuten aus dem Steinkohlenbergbau orientiert, die im Mittel bei etwa 15 g pro Lunge lag mit Werten über 50g bis zu 100 g (Einbrodt, 1965; 1967; King et al., 1956). Das Lungengewicht von Männern im Alter von 20 Jahren beträgt etwa 1.000 g (Geigy, 1968), das entspricht 15 mg Staub pro g Lunge; bei einer Dichte von 2 g/mL wären das 7,5 µL Staub/g Lunge. In der 19-Stäube-Studie wurden nach 11 Instillationen von je 6 mg des gleichen Kohlenstaubes, der in der aktuellen Studie angewendet wurde, bei 57 % der Ratten Lungentumoren diagnostiziert (Pott et al., 2000). Infolgedessen erschien es möglich, mit 15 % dieser Dosis Tumoren zu erzeugen. Im Rückblick muss es jedoch im Rahmen der Streubreite solcher Ergebnisse und des großen mittleren Partikeldurchmessers des Kohlenstaubs, der mit seinem Medianwert von 4 µm mit dem größeren Teil seiner Masse außerhalb des Feinstaubbereichs lag, als Fehleinschätzung betrachtet werden, hiermit eine wahrscheinlich statistisch signifikante Erhöhung der Tumorrate zu erwarten. Bei Anwendung des Maßstabs von Pott und Roller (2003) für die kanzerogene Wirkungsstärke, der bei der Versuchsplanung noch nicht vorlag, würden etwa 30 mg des verwendeten Kohlenstaubs der Wirkungsstärke von 5 mg ultrafeinem Ruß entsprochen haben.

Sektion der Versuchstiere

Die Ratten wurden moribund oder am Studienende (nach 9 bzw. etwa 28 Monaten) schmerzlos durch Ausbluten getötet. Im Anschluss daran erfolgte die Sektion und Protokollierung der Befunde. Die Überlebenszeiten der Tiere nach Versuchsbeginn sind in **Tabelle 7.6** eingetragen.

Herstellung der Präparate für die histologische Untersuchung und histopathologische Diagnostik

Die Lungen aller Tiere der Kanzerogenitätsstudie (9 Monats-Studie, Prüf-Nr.: 05N99524, sog. 30 Monats-Studie, Prüf-Nr.: 05N99525; die im 29. Monat noch lebenden Tiere wurden getötet) wurden durch Instillation von 10 %igem Formalin (intratracheale Infusion von 10 %iger neutraler Formalinlösung mit 20 cm Wasserdruck) fixiert. Alle fünf nach den Zuschneide-Richtlinien für Inhalationsstudien nach Bahnemann et al. (1995) getrimmten Lungenlappen wurden dehydriert und in Paraffin eingeblockt. Zusätzlich wurden jeweils Trachea und die lungen-assoziierten Lymphknoten (LALN) asserviert.

Histologie an Einzelschnitten

Von 102 Tieren (17 Tiere/Versuchsgruppe) wurden 3 µm dicke Schnitte aus 6 Lungenblöcken hergestellt (Lappen 3 und 5, je die ventrale und dorsale Hälfte; Lappen 2 + 4, Lappen 1), mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und histologisch untersucht. In den Fällen, in denen ein Tumor bereits makroskopisch auffiel, wurde zusätzlich ein Schnitt durch den Tumor gelegt.

Histologie an Stufenschnitten

Von 77 Tieren (22 Tieren der Kontrolle, 7 Tieren der Quarz-, Quarz + PVNO- und der Printex®-Ruß-Gruppe sowie je 17 Tieren der Aerosil®- und Kohlenstaub-Gruppe/Versuchsgruppe) wurden aus 6 Lungenblöcken (ventrale und dorsale Lungenhälfte von Lungenlappen 3 (lobus dexter caudalis) und 5 (lobus sinister), Lappen 1 (lobus dexter cranialis), Lappen 2 (lobus dexter medialis) und Lappen 4 (lobus dexter accessorius) mindestens 60 bis maximal 78 Hämatoxylin-Eosin gefärbte, 3 µm dicke Stufenschnitte/Lunge im Abstand von 250 µm angefertigt und histologisch untersucht (nur Prüfung 05N99525).

Näherungsweise Ermittlung von Tumorvolumina

Bei den in den Serienschnitten entdeckten Neoplasien und Präneoplasien wurde eine Flächenbestimmung mit Hilfe zweier Durchmesser durchgeführt. Die Längenmessungen wurden mit Hilfe eines Messgitters im Strahlengang des Mikroskops am mikroskopischen Objekt durchgeführt. Die längste Tumorausdehnung wurde als Hauptachse mit einem mittleren senkrecht zu dieser Linie stehenden Querdurchmesser multipliziert. Die Fläche wurde in mm² angegeben. Fläche x Abstand (0,25 mm) ergibt das Volumen einer Tumorschabe. Eine Addition aller ermittelten Scheiben pro Tumor ergibt einen Näherungswert für das Volumen des Gesamttumors (Abbildung 1).

$$n$$
$$V = D * \sum_{i=1}^n A_i \quad (n = \text{Zahl der Schnittebenen}, A = \text{gemessene Fläche}, D = \text{Schnittabstand})$$

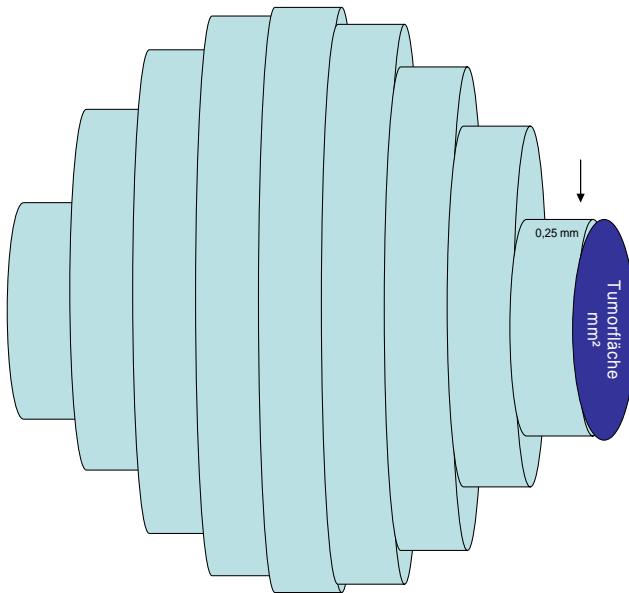


Abbildung 1: Bestimmung der Tumorvolumina. Die Einzelwerte sind **Tabelle 7.7** im Anhang zu entnehmen.

Diagnostische Kriterien

Für die histopathologische Befundung wurde die vom Projekt 'International Harmonization of Rat Nomenclature' (http://webintern.item.fraunhofer.de/webreni/reni_f/RIDX_F.htm) vorgeschlagene Nomenklatur zur Klassifikation von Lungentumoren und Präneoplasien bei der Ratte verwendet. Die dazu gehörigen diagnostischen Kriterien wurden von der IARC (Dungworth et al. 1992) veröffentlicht.

Für die semiquantitative Bewertung der nicht-neoplastischen histopathologischen Lungenbefunde wurde eine Graduierung, die neben histologischen Kriterien insbesondere Ausbreitung bzw. Größe berücksichtigt, nach folgendem Schema durchgeführt:

0 = keine Veränderungen, 1 = sehr geringgradig, 2 = geringgradig, 3 = mittelgradig, 4 = hochgradig, 5 = sehr hochgradig.

Herstellung der Präparate für die bildanalytische Bestimmung des Fibrosegrades und Meßmethode

Quantitative Bestimmung des Bindegewebsanteils in der Lunge: Nach 9 und 28 Monaten Versuchszeit wurden von je 60 Tieren (10 Tiere/Versuchsgruppe) 3 µm dicke Schnitte aus einem Lungenblock mit Siriusrot zur Darstellung von Bindegewebe angefärbt und bildanalytisch untersucht (Prüfung 5N99525). Dabei wurde nach 9 Monaten Versuchszeit von den 3 kleinen Lappen der rechten Lunge und nach 28 Monaten Versuchszeit vom linken Lungenlappen die gesamte Fläche analysiert. Es wurden Bilder mit dem 10-fach Okular aufgenommen und der Flächenanteil der durch Siriusrot gefärbten bindegewebshaltigen Bereiche an der Lungenfläche bestimmt. Bei Kontrolltieren war die Fläche des gesamten linken Lungenlappens bzw. der 3 rechten Lungenlappen deutlich geringer als bei den behandelten Gruppen, vermutlich bedingt durch stärkeres Kollabieren der Lunge bei der Fixierung. Dadurch ergibt sich eine scheinbare Erhöhung im Bindegewebsanteil für die Tiere der Kontrollgruppe. Deshalb wurde aus dem Bindegewebsanteil und der Gesamtfläche der Lunge die Gesamtfläche des Bindegewebes im Lungenlappen bestimmt und als Messparameter verwendet. Die Gesamtfläche des analysierten linken Lungenlappens nach 28 Monaten war im Vergleich zur Gesamtfläche der analysierten 3 kleinen Lungenlappen nach 9 Monaten Versuchszeit gemittelt über die 6 Gruppen um etwa 15% kleiner.

Statistik

Die statistische Auswertung der histopathologischen Befunde wurde mit dem paarweisen Fisher-Test (Kontrolle gegen Behandlungsgruppen) durch das P.L.A.C.E.S. System (Version 2000.1, Instem Life Science Systems, UK) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Histopathologie

Dritter Teil des Hauptversuchs über 9 Monate (Prüfung 05N99524)

Untersuchungsparameter:

Lunge:

Eine tabellarische Übersicht über die histopathologischen Befunde der Lunge befindet sich im Anhang in **Tabelle 7.8**.

In der 9-Monatsstudie traten in keiner der Behandlungsgruppen Neoplasien auf, nur 2 Tiere der Quarzgruppe entwickelten hochgradige bronchiolo-alveoläre Hyperplasien mit fokalen Atypien.

Die Quarzgruppe wies im Vergleich zu den übrigen Behandlungsgruppen die deutlichste interstitielle Fibrose (mittel- bis hochgradig), die ausgepräteste alveoläre Lipoproteinose sowie die stärkste entzündliche Reaktion, gekennzeichnet durch überwiegend mittelgradige alveoläre und interstitielle Entzündungszellinfiltrate, auf.

Der Zusatz von PVNO führte zu einer deutlichen Verminderung der alveolären Lipoproteinose (hochgradig → geringgradig), zu einer Reduktion der Entzündungsreaktionen (80 % mittelgradig → 30 % mittelgradig und 60 % geringgradig) und zu einer geringeren Ausbildung der interstitiellen Fibrose sowie der bronchiolo-alveolären Hyperplasien.

Interstitielle fibrotische Granulome wurden bei allen Tieren der Aerosil®-Gruppe (gering- bis mittelgradig) aber nur bei je einem Tier (mittelgradig) der beiden Quarzgruppen beobachtet (**Tabelle 7.8**).

Vierter Teil des Hauptversuchs über 30 Monate (Prüfung 05N99525)

Ergebnisse der Tumordiagnostik

Makroskopisch haben sich Tumoren nicht eindeutig feststellen lassen, da die mehr oder weniger erhabenen weißen oder weißgrauen speckigen Bezirke vor allem in der Quarz- und Aerosil®-Gruppen sowohl als Zeichen einer Fibrose als auch in einigen Fällen als Tumor zu deuten sind (siehe Forschungsbericht FKZ 2986661273, Ergebnisse, 4. Makroskopische Sektionsbefunde der Lungen und lungenassoziierten Lymphknoten).

Die in den einzelnen Versuchsgruppen histologisch diagnostizierten präneoplastischen und neoplastischen Alterationen der Lunge von Ratten, die mindestens zwei Jahre nach der ersten Instillation überlebten, sind in **Tabelle 7.9** zusammengefasst, unterteilt nach Typen und nach Häufigkeiten der Lungen mit einem oder mehr als einem Tumor pro Gruppe, außerdem die Zahl der insgesamt gefundenen Tumoren und die Anzahl der Ratten mit präneoplastischen Lungentumoren, die alle fokalen/multifokalen bronchiolo-alveolären Hyperplasien Grad 4 und Grad 5 sowie Plattenepithelmetaplasien Grad 4 und 5 umfassen. Bei insgesamt 70 Lungentumoren aus den Versuchsgruppen Quarz, Quarz + PVNO, SiO₂ amorph und Ruß wurde das Volumen bestimmt; die Ergebnisse zeigt **Tabelle 7.7**. Dabei handelt es sich um diejenigen Tumoren, die in diesen vier Versuchsgruppen in Spalte b) der **Tabelle 7.9** eingetragen sind.

Kurzbeschreibung der in Tabelle 7.9 zusammengestellten Ergebnisse:

- Partikel-induzierte Tumoren traten in der höchsten Inzidenz (71 %) bei den mit Quarz behandelten Ratten auf. Sie umfassten bronchiolo-alveolare Adenome und Karzinome, zystisch keratinisierende Epitheliome sowie keratinisierende und nicht keratinisierende Plattenepithelkarzinome. Die Behandlung mit dem Silikosehemmstoff Polyvinyl-pyridin-N-oxid (PVNO) senkte die Tumorhäufigkeit bei den 17 mit 6 Schnitten untersuchten Tieren von 70 % auf 47 %, die mittlere Tumorhäufigkeit pro Lunge wurde durch PVNO um den Faktor 2,5 von 1,9 auf 0,71 reduziert. Das Volumen der 10 vermessenen Lungentumoren aus der PVNO-Gruppe (**Tabelle 7.7**) lag in 9 Fällen unter 5 mm³, nur ein Tumor war größer, während das Tumorgesamtvolumen in der Quarzgruppe bei etwa jedem dritten der 44 vermessenen Tumoren größer war als 5 mm³, davon bei vier über 100 mm³ (**Abbildung 2**).
- In der Gruppe Amorphes SiO₂ wurde mit der histologischen Routinediagnostik bei 2 von 17 Tieren (12 %) ein Lungentumor gefunden. Nach Untersuchung der Lungen an je 60 Stufenschnitten („Intensivhistologie“) fanden sich bei 6 Ratten Tumoren und bei 7 Tieren eine Präneoplasie, mit der Routinehistologie keine. Mit diesem Ergebnis ist die Zahl der Tumortiere im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant erhöht, wenn die Kontrolle mit 0,0 % Lungentumoren angenommen wird: 6 / 17 = 35,3 %, p = 0,0038.
- Ultrafeiner Ruß erzeugte mit einer Lungenstaubbelastung, die nur wenig über dem Staubvolumengrenzwert der MAK-Kommission lag, eine mit 8 Tumortieren eindeutig erhöhte Lungentumorhäufigkeit. Zwei dieser 8 Tiere wurden nur durch die Untersuchung von 60 anstatt von 6 Lungengewebsschnitten „positiv“.
- In der Kohlenstaubgruppe fanden sich keine Tumoren in 17 Lungen; von allen sind 60 Stufenschnitte untersucht worden; bei 3 Tieren wurde eine Präneoplasie diagnostiziert. Der Unterschied zur Kontrolle mit 1 Präneoplasie ist statistisch nicht signifikant.

Berechnung der Wahrscheinlichkeit der Tumorerkennung

Mit Hilfe der Daten, über wie viele Stufenschnitte sich die gefundenen Tumoren verteilt, wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der man in Abhängigkeit von der Tumorhöhe den Tumor bei verschiedener Anzahl Schnitte finden müsste. Dabei wurde bei den beiden großen Lungenlappen eine Höhe von

$20 \times 0,25 = 5 \text{ mm}$ und bei den 3 kleinen Lungenlappen eine Gesamthöhe von $10 \times 0,25 = 2,5 \text{ mm}$ angenommen.

Die Verteilung der Schnitte ist in der Fußnote zur **Tabelle 7.10** erläutert. Bei der in diesem Versuch bei der Analyse der Stufenschnitte gefundenen Verteilung der Tumorhöhe ergeben sich folgende Wahrscheinlichkeiten, Tumoren zu finden:

44 % bei 3 Schnitten
74 % bei 7 Schnitten
86 % bei 12 Schnitten

In **Tabelle 7.10** wird angegeben mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Tumor mit definierter Höhe (z. B. 1 mm) bei Untersuchung von 3 Schnitten (34%), 7 Schnitten (80%) und 12 Schnitten (100%) entdeckt werden kann.

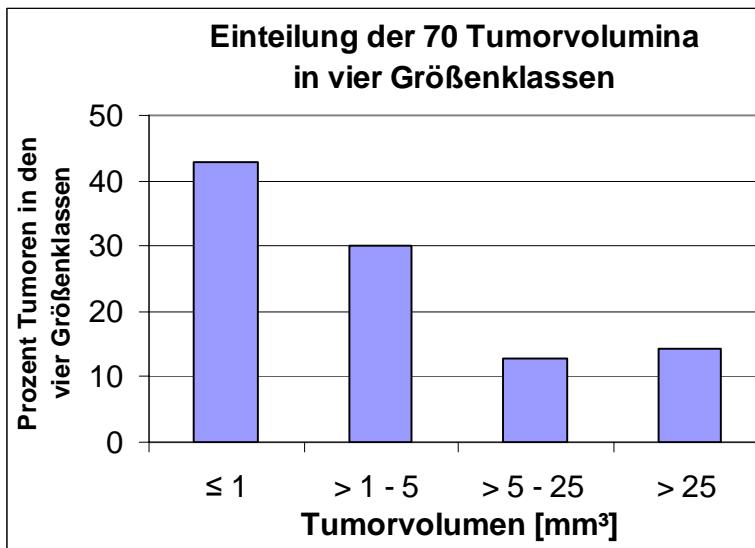


Abbildung 2. Zusammenfassung der 70 vermessenen Tumoren (Ergebnisse der Näherungsbestimmungen in **Tabelle 7.7** und Aufteilung in vier Größenklassen. Der kleinste Durchmesser des Anschnitts eines Tumors, mit dem er noch als solcher histologisch diagnostiziert werden kann, beträgt etwa 0,2 mm.

Nicht neoplastische Veränderungen

Eine tabellarische Übersicht über die nicht-neoplastischen histopathologischen Befunde der Lunge befindet sich im Anhang in **Tabelle 7.11**. **Tabelle 7.12** zeigt die numerischen Mittelwerte der Einzelbewertungen/Behandlungsgruppe, bei denen das Ausmaß der Läsionen in Schwergrade von 0-5 eingeteilt wurde. Die Mittelwerte der 9-Monatsstudie werden denen der 30 Monatsstudie gegenübergestellt.

In allen Behandlungsgruppen - jedoch in sehr unterschiedlichem Ausmaß - konnten partikel-induzierte histologische Veränderungen festgestellt werden. Interstitielle und intra-alveolare Ansammlungen von partikel-beladenen Makrophagen (mit Anzeichen von Degeneration und Nekrose am stärksten bei der Quarz-Gruppe, in geringerem Ausmaß auch bei der Quarz+PVNO- und Printex®-Ruß-Gruppe), eine multifokale alveolare Lipoproteinose (mit Akkumulation von Surfactant, Zelldebris und proteinhaltigem Material), alveolare und überwiegend interstitielle Entzündungszellinfiltrate sowie eine interstitielle Fibrose traten in allen Gruppen auf. Die stärkste entzündliche Reaktion, ausgeprägteste Fibrose und deutlichste alveolare Lipoproteinose fand sich in der Quarz-Gruppe. Diese Tendenz zeigte sich bereits nach 9 Monaten (20 % der Ratten in der Quarz-Gruppe mit hochgradiger Fibrose, nach 30 Monaten 50%). Der Zusatz von PVNO führte nach 9 Monaten -verglichen mit den Tieren der Quarz-Gruppe- zu einer deutlichen Verminderung der alveolären Lipoproteinose (hochgradig → geringgradig), zu einer Reduktion der Entzündungsreaktionen um etwa einen Schwergrad sowie zu einer geringgradigeren Ausbildung der interstitiellen Fibrose. Bei den Ratten der Quarz+PVNO-Gruppe, die im 29. Monat seziert wurden, waren die entzündlichen Veränderungen stärker ausgebildet als nach 9 Monaten, aber deutlich geringer als bei der Quarz-Gruppe des gleichen Sektionszeitraums. Fibrotische Granulome in mittel- bis hochgradiger Ausbildung waren bei 10/17 Tieren nur bei der Quarz+PVNO-Gruppe zu beobachten. Die Ratten der Aerosil®- und Kohlenstaub-Gruppe unterschieden sich

hinsichtlich der Entzündungsparameter nur geringfügig, bei beiden Gruppen waren sie geringgradig ausgebildet. Auffallend war, dass bei den Ratten der Aerosil®-Gruppe, die nach 9 Monaten seziert wurden, fibrotische Granulome nachweisbar waren, die in den Lungen der Tiere der Aerosil®-Gruppe, die im 29. Lebensmonat getötet wurden, nicht mehr beobachtet wurden. Die Ratten der Printex®-Ruß-Gruppe zeigten überwiegend mittelgradige entzündliche Alterationen. Cholesteringranulome konnten bei allen Tieren der Quarz-, bei 94% der Quarz+PVNO-, bei 94% der Printex®-Ruß, bei 53% der Aerosil®- und bei 24% der Kohlenstaub-Gruppe nachgewiesen werden. Becherzellhyper- und -metaplasien traten bei der Mehrzahl der Tiere der Quarz-, Quarz+PVNO- und der Printex®-Ruß-Gruppe in mittel- bis hochgradiger Form auf.

Plattenepithelmetaplasien ließen sich bei 2/17 Tieren der Kohlenstaub- (Zahl der betroffenen Tiere nach Auswertung von 60 Schnitten/Lunge), 7/17 in der Printex®-Ruß- (Zahl der betroffenen Tiere nach Auswertung von 60 Schnitten/Lunge bei 7 Tieren und bei 10 Tieren nach Auswertung von 6 Schnitten/Lunge), bei 10/17 der Quarz+PVNO- (Auswertung von 60 Schnitten/Lunge bei 7 Tieren, bei 10 Tieren Auswertung von 6 Schnitten/Lunge) und bei 11/17 Tieren in der Quarz-Gruppe (Auswertung von 60 Schnitten/Lunge bei 7 Tieren, bei 10 Tieren Auswertung von 6 Schnitten/Lunge) feststellen. In der Kohlenstaub-Gruppe waren sie nur geringgradig ausgebildet, während sie in den übrigen Gruppen alle Schweregrade aufwiesen, wobei vor allem die Quarz-Gruppe mittel- bis hochgradige Metaplasien zeigte.

Bronchiolo-alveolare Hyperplasien wurden in allen Versuchgruppen festgestellt. Überwiegend geringgradig bei der Kontrolle und Kohlenstaub-Gruppe (Einzeltiere auch mittel- und hochgradig), gering- bis mittelgradig in der Printex®-Ruß-Gruppe (Einzeltiere auch hochgradig), gering- bis mittelgradig in der Aerosil®-Gruppe (Einzeltiere auch hochgradig), überwiegend hochgradig in der Quarz-Gruppe.

In **Tabelle 7.13** sind neben der Zusammenfassung der histologisch beurteilten nicht-neoplastischen Läsionen in den 6 Versuchsgруппen, insbesondere die Ausprägung von Entzündung und Lungenfibrose, auch die bildanalytischen Befunde der mit Siriusrot angefärbten Bindegewebsflächen als quantitatives Maß für die Fibrose enthalten.

Ergebnisse der bildanalytischen Bestimmung des Fibrosegrades

Da auch bei Kontrolltieren, die histologisch keine Fibrose aufwiesen, ein Teil der Gewebefläche aus Bindegewebe besteht, wurde zusätzlich der Anstieg über den Kontrollwert angegeben (**Tabelle 7.13**). Dieser Wert kann als ein Maß für die staubinduzierte Bindegewebszunahme und damit als Grad für eine Lungenfibrose angesehen werden. Außerdem wurde in der untersten Zeile der Tabelle eine Normierung auf die Quarzgruppe (= 100%) vorgenommen. Die Fibrose war in der Quarzgruppe schon nach 9 Monaten am höchsten von allen Behandlungsgruppen und stieg bis zum Termin 28 Monate noch stark an. Durch PVNO wurde die fibrotische Wirkung von Quarz nach 9 Monaten deutlich verringert und es gab fast keinen Anstieg der Wirkung zum Termin nach 28 Monaten. Die Wirkung von amorphen SiO₂ (Aerosil) war nach 9 Monaten nur wenig geringer als die von Quarz, es wurde aber nur eine geringe Zunahme der Fibrose zwischen 9 und 28 Monaten gefunden. Die Wirkung von Ruß war ähnlich wie die von Aerosil und die Wirkung vom Kohlenstaub war gering.

4. Bewertung der Ergebnisse und Diskussion

Applikationsmethode

Vorab sei zur Anwendung der Verabreichungsmethode durch intratracheale Instillationen Folgendes erklärt, um den grundsätzlichen Einwand gegen die unphysiologische Applikationsart aufzugreifen: Bei der Planung ihrer Instillationsexperimente wie auch der intraperitonealen Injektionsexperimente sind Pott und Roller (1994, 2000, 2003) von der physiologisch begründeten Vorstellung ausgegangen, dass die Wirkung der Gesamtdosis stärker ist, wenn ihre Verabreichung auf mehrere Einzeldosen verteilt und dadurch die Ablagerung von wenig wirksamen Staubanhäufungen in der Lunge oder im Abdominalraum vermieden wird. Im Gegensatz dazu wird häufig die Vermutung geäußert, die Komprimierung der im Inhalationsversuch langfristig retinierten Staubdosis auf wenige Instillationen verursache einen massiven abseits der physiologischen Vorgänge liegenden Boluseffekt, der zu einer unrealistischen Verstärkung der Wirkungen führe. infolgedessen ergäbe diese Prüfmethode auch in einem chronischen Versuch keine Dosis-Wirkungsbeziehungen, die sich für eine aussagekräftige Risikoabschätzung verwerten ließen.

Der vermutete artifizielle Boluseffekt müsste sich folgerichtig bei der Konzentration auf eine einzige Instillation noch verstärken. Die ursprüngliche Annahme, dass die Gesamtwirkung durch Beschränkung auf eine einmalige Instillation eher geschwächt wird, wurde durch den Vergleich der Wirkung von 15 x 3 mg Quarz mit 1 x 45 mg Quarz bestätigt: Die mittlere Überlebenszeit der nur einmal instillierten Ratten war jedoch mit 78 gegenüber 65 Wochen 13 Wochen länger und die Tumorraten mit 23 % gegenüber 38% geringer (Pott und Roller, 1994). Die weniger gleichmäßige Partikelverteilung nach einmaliger Instillation scheint die Wirkung durch Ablagerung in größeren Staubagglomeraten zu erniedrigen, möglicherweise wird auch die Lungenreinigung verstärkt. Insgesamt erklärt sich die deutlich stärkere kanzerogene Wirkung einer durch Instillationen verabreichten Dosis gegenüber der im Verlauf einer chronischen Inhalation in einem Jahr retinierten Staubdosis auf physiologische Weise durch die erheblich früher beginnende und dadurch verlängerte Einwirkungszeit der meist innerhalb von wenigen Wochen instillierten Gesamtdosis. In den EPA Guidelines for Carcinogen Risk Assessment wird daher den *Early-Life Exposures* eine besondere Bedeutung zugemessen (U.S.EPA, 2005). Die höhere Empfindlichkeit der Methode kann tatsächliche Wirkungen leichter deutlich machen, die die Schwäche durch die hoch liegende Nachweisgrenze eines Exzess-Krebsrisikos im Bereich von 10 % in gewisser Weise ausgleicht.

Beim Vergleich der kanzerogenen Wirkungsstärken von nicht spezifisch toxischen Stäuben in Inhalations- und Instillationsexperimenten wurde eine im Mittel um den Faktor 5 stärkere Wirkung der nach Instillation retinierten Staubvolumendosis in der Lunge errechnet (Roller und Pott, 2005). Als Datenbasis diente bei den Inhalationsexperimenten die am Ende des ersten Jahres in den Lungen gemessene Staubmasse, aus der das Staubvolumen berechnet wurde. Für die Instillationsexperimente wurden aufgrund von Literaturdaten zwei Drittel der nominal instillierten Staubvolumendosis als *langfristig wirksame Dosis* angenommen.

Wie sind Entzündungsreaktionen, Fibrosegrad, Präneoplasien und Tumoren bei Exposition gegenüber Quarz, Quarz + PVNO, amorphes SiO₂, Printex®-90-Ruß und Kohlenstaub miteinander quantitativ assoziiert?

Welchen Stellenwert hat eine chronische Entzündung als Tumorursache?

In **Abbildung 3** werden die Entzündungs- und Fibrosegrade nach 9 Monaten mit den Ergebnissen aus der Tumordiagnostik am Versuchsende in Beziehung gesetzt. Dies ist die biologisch besser zutreffende Vergleichsbasis als die Entzündungs- und Fibrosewerte nach 28 Monaten, weil die Entzündungsstärke im ersten Versuchsjahr eher die Größe des kanzerogenen Reizes abbildet als der Entzündungsgrad am Lebensende, wenn die Tumoren längst entstanden sind. Außerdem lässt sich an den Ergebnissen nach neun Monaten erkennen, inwieweit die Ausprägungen von Entzündung und Fibrose miteinander assoziiert sind.

Von besonderem Interesse ist der Vergleich zwischen den Gruppen Quarz + PVNO, SiO₂ amorph und Ruß-UF. Hier fällt auf, daß die fett eingerahmten Ergebnisse der neoplastischen und präneoplastischen Veränderungen durch amorphes SiO₂ deutlich geringer sind als in den beiden anderen Versuchsgruppen, obwohl der Entzündungsgrad nach histologischer Bestimmung bei allen drei Versuchsgruppen in einem ähnlichen Verhältnis zum Fibrosegrad steht wie beim Quarz (Säulengruppen durch einen gepunkteten Rahmen gekennzeichnet). In der Rußgruppe ist die histologisch festgestellte Fibrose schwächer ausgeprägt, aber die bildanalytisch bestimmte Bindegewebsfläche ist als der zuverlässiger Wert anzusehen. Die als empfindlicher Gradmesser für die Entzündungsstärke geltenden neutrophilen Granulozyten (PMN) in der bronchiolo-alveolären Spülflüssigkeit waren bei den mit amorphem SiO₂ instillierten Ratten sogar deutlich höher als in der Quarz-Gruppe.

Es gibt keinen Zweifel darüber, dass der Fibrose eine Entzündung vorausgegangen sein muss, aber die Fibrose ist nicht die Voraussetzung für die Tumorentstehung; zu diesem Ergebnis kamen auch frühere Untersuchungen an Ratten (Friemann, 1995). Auch die Beurteilung der humanpathologischen Befunde spricht dagegen, dass Lungentumoren als Folge einer Silikose entstehen (Müller und Wiethege; 2000), obwohl sog. silikotische Narbenkarzinome als Berufskrankheit anerkannt wurden. Die bereits in den 1980er Jahren lange diskutierte Frage, ob die Asbestose die Voraussetzung für die Entstehung von Lungenkrebs und Mesotheliom sei, wurde schließlich verneint.

Eine der Kernfragen des Projekts war: Führt amorphes SiO₂ als toxischer Staub mit kurzer Verweildauer in der Lunge nach Verabreichung kleiner Einzeldosen zu Tumoren durch die damit induzierte chronische Entzündung? Aufgrund der Ergebnisse lautet die Antwort: Im Vergleich mit den beiden Versuchsgruppen Quarz + PVNO und Ruß-UF hätte durch die Entzündung eine höhere Tumorhäufigkeit erwartet werden können. (Davon unabhängig ist die durch eine Intensivhistologie gestiegene Häufigkeit von Tumoren und Präneoplasien zu betrachten.) Allerdings ist zu berücksichtigen, dass als Entzündungsparameter nur die Granulozyten in der BAL zugrunde gelegt wurden und es deutliche Unterschiede im morphologischen Bild zwischen der SiO₂-Gruppe und den Gruppen, die mit persistierenden Partikeln behandelt wurden, gab. Diese Unterschiede wurden z.T. schon beschrieben (Ernst et al. 2002), sollen aber noch ausführlicher in einer gesonderten Publikation berichtet werden. Dennoch könnte die Tumorursache nicht nur eine chronische Entzündung sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass *zusätzliche Faktoren* für die wesentlich häufigeren neoplastischen Veränderungen und ihre Vorstufen bei den beiden Versuchsgruppen Quarz+ PVNO und Ruß-UF mitverantwortlich sind. Möglicherweise sind diese Faktoren bereits in unterschiedlichen

Entzündungstypen zu finden, deren Differenzierung mit den im Rahmen dieses Projekts untersuchten Parametern nicht ermittelt werden konnte. Das würde bedeuten: Nicht jede Art von Entzündung hat für die Lunge die gleiche kanzerogene Wirkung. Hierzu fehlen allerdings noch konkretere Hinweise. Daher ist unabhängig von dem Entzündungsgeschehen die Anwesenheit von biobeständigen Partikeln nach Aufnahme in Epithelzellen als mögliche Ursache für die Tumorentstehung zu diskutieren, die die relativ geringen neoplastischen Effekte durch amorphes SiO₂ erklären könnte. Eine Aufnahme von Partikeln durch Epithelzellen der Lunge wurde in mehreren Arbeiten beschrieben (Gore und Patrick, 1982; Churg et al., 1990; Churg, 1996, dort weitere Arbeiten zitiert). Auch Johnston et al. (2000) und Saber et al. (2005) interpretieren ihre Befunde dahingehend, dass eine Entzündung keine alleinige Voraussetzung für eine DNA-Schädigung durch Partikeln darstellt. In einer Übersichtsarbeit über Untersuchungen der Wirkungsmechanismen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass entzündliche Prozesse allein die Ursache der neoplastischen Veränderungen sind, allerdings ohne dass die oben genannten Arbeiten, soweit sie zu jener Zeit vorlagen, berücksichtigt wurden (Greim et al., 2001).

Da auch amorphes SiO₂ nicht innerhalb eines Tages aus der Lunge eliminiert wird, könnte mit einer Aufnahme in die Epithelzellen der Lunge und mit einer direkten toxischen Wirkung gerechnet werden, die allerdings wegen der kürzeren Persistenz in der Lunge im Vergleich mit den anderen Stäuben erheblich geringer sein müßte als die von ultrafeinem Ruß. Beim quantitativen Vergleich innerhalb unseres Experiments ist jedoch zu berücksichtigen, daß amorphes SiO₂ in einer 2,4-fach höheren Volumendosis verabreicht wurde als Ruß. Es fehlen ausreichende Kenntnisse über den Stoffwechsel von amorphem SiO₂, die in die Beurteilung eingehen müßten.

Bei dem geprüften Kohlenstaub mit einem mittleren Durchmesser von 4 µm ist mit einem Feinstaubanteil von nur etwa einem Drittel der Massendosis zu rechnen. Entzündungsreaktionen und bildanalytisch gemessene Fibrosefläche betragen etwa 30 % des Quarzwertes, also einen beachtenswerten Anteil. Tumoren waren allerdings nicht einmal mit der Intensivhistologie zu erkennen und präneoplastische Reaktionen zeigten sich nur an einem erhöhten Wert der bronchiolo-alveolären Hyperplasien nach 9 Monaten (Grad 1,4 gegenüber 0,0 in der Kontrolle). Wegen der mittleren Partikelgröße, die rechnerisch fast 300-mal so groß ist wie die des Ruß-UF, ist mit einer selteneren Aufnahme in die Epithelzellen zu rechnen, so dass die Wirkung entsprechend kleiner sein dürfte.

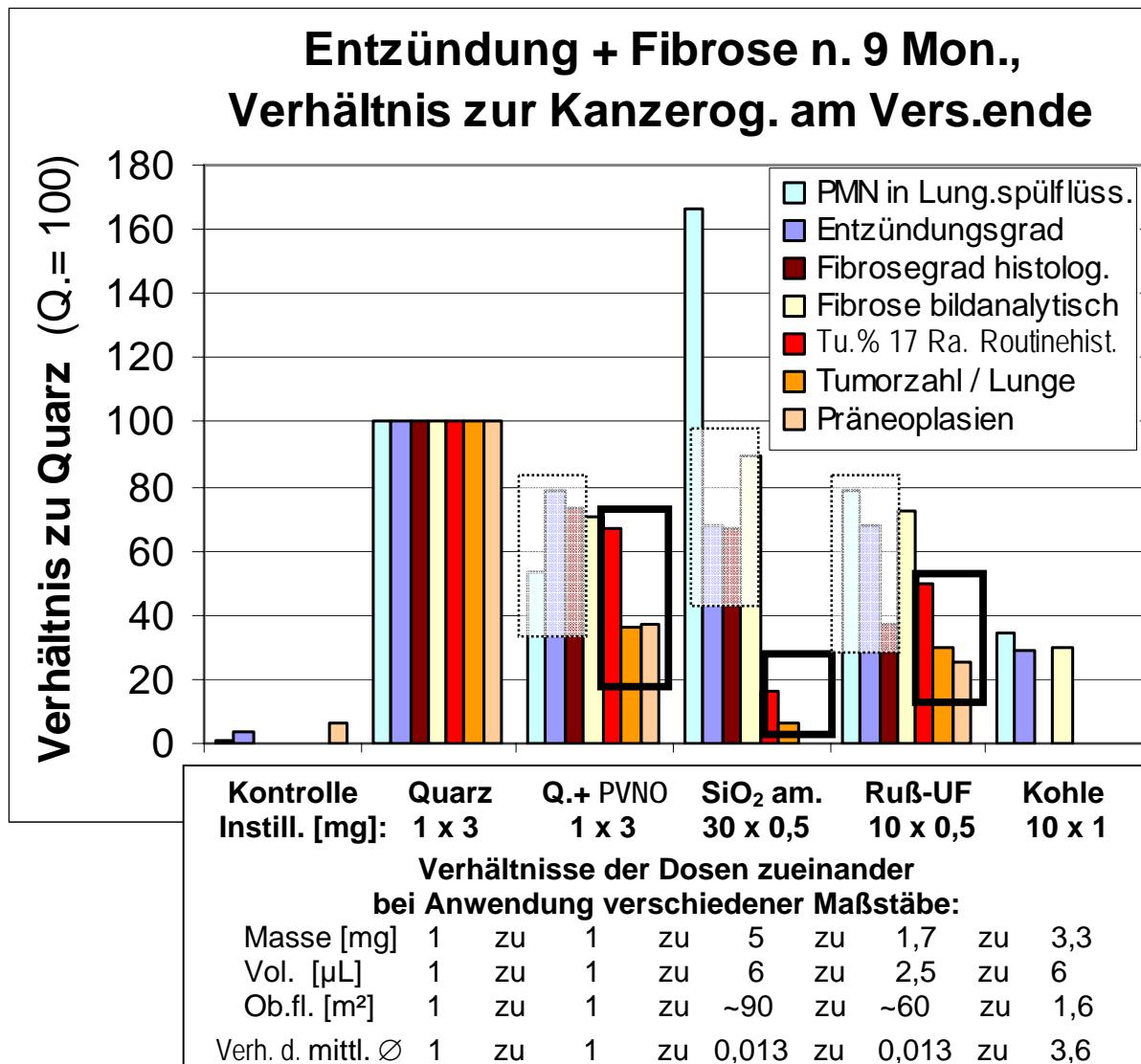


Abbildung 3: PMN, Entzündungs- und Fibrosegrade 9 Monate nach Versuchsbeginn (**Tabelle 7.13**), dazu Ergebnisse der routinehistologischen Untersuchung auf neoplastische Lungenveränderungen am Versuchsende im Vergleich zur Quarzgruppe (= 100 gesetzt, **Tabelle 7.14**). Bei den Ergebnissen aus den bildanalytischen Fibrosebestimmungen wurden die Werte der Kontrolle abgezogen.

Reduziert der Silikosehemmstoff PVNO neben der Fibroseentwicklung auch die Tumorentstehung und die Häufigkeit präneoplastischer Läsionen, die durch eine relativ niedrige Quarzdosis erzeugt werden?

Die PVNO-Behandlung hat in den ersten 9 Monaten nur zu einer ziemlich begrenzten Reduzierung von Entzündungs- und Fibrosegrad durch Quarz geführt. Der bildanalytisch gemessene Fibrosegrad am Ende der Versuchszeit entsprach den Erwartungen aufgrund der Erfahrungen aus alten Versuchen (Pott et al., 1970; Pott 2004). Eine Verminderung der Kanzerogenität durch Quarz (**Abbildung 3**) zeigt sich in einer (nur wenig) niedrigeren Tumorrate und Anzahl der Tiere mit Tumorvorstufen, in einer deutlich kleineren mittleren Anzahl der Tumoren pro Lunge und in der deutlich geringeren Größe der Lungentumoren (**Tabelle 7.7**), die auf ein später eintretendes Tumorwachstum schließen lässt. Allerdings ist die untersuchte Tierzahl mit 17 relativ klein.

Die in der Quarz + PVNO-Gruppe im Vergleich mit der Quarz-Gruppe ohne subkutane PVNO-Injektion reduzierte Wirkung wurde zweifellos durch PVNO verursacht. Die Hemmung der toxischen Wirkungen geschieht vermutlich durch PVNO-Adsorption an die Quarzoberfläche und daran anschließende Blockierung einer der für die Wirkung ursächlichen Baugruppen auf der Quarzoberfläche (Radikale, Silanolgruppen, ionisierte Silanolgruppen). Einzelheiten sind nicht geklärt. Bezuglich Entzündung und Fibrose war der PVNO-Effekt bekannt, für die Kanzerogenität wurde er jetzt erstmalig gezeigt. Er war einerseits aufgrund der Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus zu erwarten, weil die Entzündung als die Voraussetzung für die Tumorinduktion angesehen wird.

Andererseits kommt eine direkte mutagene Wirkung von Stäuben auf Epithelzellen in Betracht, da Staubteilchen auch von Epithelzellen aufgenommen werden können, nicht nur von Makrophagen. Mit 3 mg eines nicht toxischen Staubes mit der gleichen Größenverteilung und der gleichen Dichte wie Quarz wäre vielleicht bei 1 von 17 Tieren ein Lungentumor zu erwarten gewesen, hier waren es fünf. Der PVNO-Effekt ist zwar prinzipiell vorhanden, eine weitgehende Inaktivierung der Quarztoxizität bis in die Nähe eines nicht spezifisch toxischen Staubes, die aufgrund vieler alter Experimente *in vivo* und *in vitro* als PVNO-Effekt hätte erwartet werden können, zeigte sich aber nur bei der bildanalytischen Fibromessung nach 28 Monaten (**Tabelle 7.13**); sie ist bei der Kanzerogenität deutlich weniger gegeben. Infolgedessen ist mit wesentlich unterschiedlichen Wirkungsmechanismen auf dem Weg zur Fibrose und zur Tumorentstehung zu rechnen. Die PVNO-Wirkungen lassen sich zwar nach wie vor mit der Adsorption der polymeren Substanz an die Quarzoberfläche am einfachsten erklären. Andere Mechanismen, über die in der Literatur berichtet wurde, insbesondere die einer Stabilisierung von zellulären Membranen gegenüber Giftwirkungen verschiedener Art, bleiben auch für Quarz möglich.

Die neuen Erkenntnisse zusammenfassend, ist festzuhalten: PVNO hemmte die Quarzkanzerogenität partiell, aber nicht weitgehend.

Führt amorphes SiO₂ als zwar relativ schnell eliminiert, aber toxischer Staub nach Verabreichung kleiner Einzeldosen zu Tumoren?

Erst in neuerer Zeit (Pott und Roller, 2000; 2003) wurde ein Kanzerogenitätsversuch mit amorphem SiO₂ beschrieben, in dem nach 5 oder 10 Instillationen von je 3 mg makroskopisch kein Tumornachweis geführt werden konnte. Mehrere Untersuchungen über die akuten und subchronischen Wirkungen auf die Lunge nach Inhalation und Instillation liegen aus früheren Jahren vor (Klosterkötter, 1965, 1966, 1968), außerdem Experimente über Wirkungen auf die Abdominalorgane nach intravenöser und

intraperitonealer Injektion (Mohn, 1963, 1965). Eine relativ neue Übersichtsarbeit von Warheit (2001) enthält weitere Ergebnisse. Demnach verursacht industriell hergestelltes amorphes SiO₂ auch unter extremen Bedingungen keine Silikose, und die induzierten Granulome bilden sich nach dem Ende der Exposition zurück. Die Erkenntnis, dass amorphes SiO₂ eine fibroblastische Wirkung zur Folge hat, geht auf Arbeiten von Rössle im Jahre 1914 zurück (zit. aus Mohn, 1963).

Die hochdispersen amorphen SiO₂-Stäube zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach Inhalation und intraperitonealer Injektion relativ schnell eliminiert werden (Klosterkötter und Einbrodt, 1965; Klosterkötter, 1966). Die Frage nach der Lösungsgeschwindigkeit des in Wasser unlöslichen Staubes in Zellen und Körperflüssigkeiten ist nicht geklärt.

Nunmehr zeigen die Ergebnisse nach routinemäßiger histologischer Begutachtung mit 2 Tumortieren von 17 noch keine statistisch signifikant erhöhte Tumorinzidenz. Im Gegensatz dazu lagen Entzündungs- und Fibrosegrade nach 9 Monaten mit etwa 70 % der Werte von Quarz nicht erheblich tiefer, sondern im gleichen Bereich wie in den Gruppen Quarz+PVNO und Ruß; die PMN waren sogar 66 % über dem Wert der Quarz-Gruppe angestiegen (**Abbildung 3**). Nach 28 Monaten ist der Entzündungsgrad niedriger als in den Gruppen Quarz+PVNO und Ruß. Dies lässt sich mit der bekannten Rückbildungstendenz der Läsionen erklären, die nach dem Abschluss der 30-maligen Instillation gegenüber amorphem SiO₂ zu erwarten sind, während die Initiation und Promotion der Kanzerogenese vorher begonnen haben sollte. Infolge des normalen Anstiegs des Entzündungs- und Fibrosegrads mit zunehmendem Lebensalter ist das absolute Niveau der histologisch gefundenen Veränderungen nach 9 und 28 Monaten ungefähr in der gleichen Höhe, bildanalytisch wurde zwischen dem 10. und 29. Monat ein geringerer Anstieg festgestellt als in der Kontrolle.

Aussagen aus älteren Versuchen, nach denen amorphes SiO₂ nur zu Granulomen führte, aber nicht zur permanenten Fibrose, wurden hier nicht bestätigt, sondern bildanalytisch ergaben sich nach 9 und 28 Monaten Fibrosegrade, die in ähnlicher Höhe oder höher waren als in den Gruppen Quarz+PVNO und Ruß-UF; nur histologisch hatte der Fibrosegrad geringfügig abgenommen.

Das gefundene Niveau der entzündlichen und fibrotischen Reaktionen während der Zeit der Instillationen von amorphem SiO₂ nach 9 Monaten hätte eine deutlichere kanzerogene Wirkung bei der üblichen histologischen Beurteilung erwarten lassen, falls die in den beiden Gruppen Quarz+PVNO und Ruß-UF gefundenen Tumoren allein durch die Entzündung hervorgerufen wurden. Tatsächlich aber waren ein signifikanter Tumornachweis und der Befund mehrerer Neoplasien erst nach einer histologischen Diagnostik von 60 Schnitten pro Lunge verifizierbar.

Die Interpretation der Ergebnisse mit amorphem SiO₂ im Hinblick auf mögliche Wirkungsmechanismen ist jedoch nur die eine Seite der experimentellen Ergebnisse, die andere Seite ist das Faktum, dass hier ein Stoff Lungentumoren induziert hat, der aufgrund von Hypothesen dazu als nicht fähig eingeschätzt worden war. Allerdings wurde – außer innerhalb der 19-Stäube-Studie – keine Kanzerogenitätsprüfung durchgeführt. Die nunmehr nach verlängerter Expositionsduer mit 30 Instillationen zu je 0,5 mg im zwei wöchentlichen Abstand - im Unterschied zu dem vorangegangenen Versuch mit 10 wöchentlichen Instillationen zu je 3 mg - erhöhte Dosis war nicht unbedingt deutlich wirksamer, denn die bisher gefundene Anzahl von 6 Tieren mit Lungentumor und 7 Tieren mit mindestens einer Präneoplasie wurde ja erst durch die Intensivhistologie gefunden (**Abbildung 4**). Nunmehr liegt jedoch ein positives Ergebnis

vor. In dieser Situation ist es erforderlich, die vorliegenden Ergebnisse durch histologische Untersuchungen einer größeren Zahl von Lungen auf eine breitere Grundlage zu stellen. Infolgedessen sollten zunächst zumindest weitere 10 Lungen der Tiere aus der Altersklasse von mehr als zwei Jahren Versuchszeit an 60 Gewebsschnitten histologisch untersucht werden, auch in der Kontrollgruppe (in der Kontrollgruppe überlebten 30 Ratten mindestens 2 Jahre, in der SiO₂-Gruppe 38 Ratten). Die Untersuchung der hohen Zahl von Lungenschnitten ist unumgänglich, um die Trefferwahrscheinlichkeit der offenbar spät entstandenen und zum Zeitpunkt des natürlichen Lebensendes noch kleinen Tumoren zu erhöhen.

Amorphes SiO₂ wurde 30 Mal instilliert, die Kontrollgruppe zum Vergleich mit der Ruß- und Kohlenstaubgruppe nur 10 Mal. Eine entzündliche und damit möglicherweise tumorpromovierende Wirkung von sehr häufigen Instillationen mit einem Risiko von z.B. 1 von 10.000 lässt sich nicht ausschließen, weil über die pathophysiologischen Abläufe zu wenig bekannt ist. In Kontrollgruppen früherer Experimente mit Wistar-Ratten wurden 20 Instillationen der Trägerflüssigkeit verabreicht, ohne dass ein Tumor gefunden wurde; eine weitere Versuchsgruppe erhielt 20 x 0,5 mg Rockwool und war ebenfalls negativ (Pott et al. 1987; 1994).

Wirken Ruß (Printex®-90 als Modellsubstanz für Dieselruß) und Kohlenstaub in niedriger Dosis im Intratrachealversuch bei der Ratte kanzerogen?

Eine niedrige Dosis ultrafeiner Rußpartikel ist bei der Ratte als kanzerogen einzustufen, da sie nach routinehistologischer Auswertung bei 6/17 Tieren (= 35 %) zur Ausbildung von Tumoren (überwiegend zu bronchiolo-alveolären Karzinomen) führte. Präneoplasien in Form fokaler exzessiver bronchiolo-alveolärer Hyperplasien fanden sich bei 4/17 (**Tabelle 7.14**) und als aggregierte Plattenepithelmetaplasien bei 2/17 Tieren. Die Zahl der Ratten mit Präneoplasien ist nicht statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht, zeigt aber eine deutliche Tendenz.

Bei einer Zusammenfassung der Befunde nach Untersuchung von 6 und 60 Schnitten bei 17 Ratten erreicht die kanzerogene Wirkung von Ruß-UF sowohl bezüglich der *Tumorraten* als auch mit dem Kriterium *Tumorzahl pro Lunge* unter den gegebenen Versuchsbedingungen die gleiche Höhe wie Quarz+PVNO (**Tabelle 7.9** Vergleich der Spalten c) beider Gruppen). Der Anteil der Tiere mit Lungentumor liegt beim Ruß mit 35 % gegenüber 47 % beim Quarz+PVNO nach Auswertung von 6 Schnitten bei 17 Ratten nur wenig tiefer (Vergleich der Spalten d).

In der **Kohlenstaubgruppe** wurden im Unterschied zum Ruß keine Tumoren gefunden, obwohl alle 17 Lungen an 60 Gewebsschnitten histologisch untersucht wurden. In drei Lungen wurde eine Präneoplasie diagnostiziert, im Vergleich dazu 1 Präneoplasie in der Kontrollgruppe mit 22 untersuchten Lungen. Dieses Ergebnis zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kanzerogenität von Ruß-UF und Kohlenstaub *in diesem Experiment* mit den Dosismäßigstäben Partikelmasse (Verhältnis der Dosen 1 zu 2) und Partikelvolumen (Verhältnis 1 zu 2,6). Falls aber die Partikeloberfläche als Dosismäß angewendet wird, wurde der Ruß mit einer 37mal höheren Dosis verabreicht als der Kohlenstaub; demnach wäre Kohlenstaub extrem unterdosiert worden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt die Kohlenstaubgruppe bei der Graduierung von bronchiolo-alveolären Hyperplasien als eine Vorstufe zu Neoplasien nach 9 Monaten mit 1,4 und 28 Monaten mit 1,7 deutlich höhere Werte als die Kontrolle mit 0,0 nach 9 und 0,6 nach 28 Monaten; auch die alveolären Entzündungszellinfiltrate sind im Vergleich zur Kontrolle erhöht (**Tabelle 7.13**).

Unterscheiden sich histologisch die Reaktionen auf „große feine“ noch alveolengängige Partikel von denen auf ultrafeine Partikel?

Nach den vorliegenden Untersuchungen wurden nach Instillation von nur noch zu etwa 50% der Teilchenzahl im Feinstaubbereich liegendem Kohlenstaubs (mittl. Durchmesser 4 µm) keine Neoplasien festgestellt. Die mittlere Teilchengröße war rechnerisch 286-fach größer als die des ultrafeinen Rußes und führte daher zu einer erheblich unterschiedlichen Verteilung in der Lunge. Hingegen entwickelten 47 % (8/17 Tieren) der mit ultrafeinen Rußpartikeln behandelten Ratten Tumoren, bei denen es sich überwiegend um bronchiolo-alveoläre Karzinome handelte. Als Präneoplasien einzustufende fokale, sehr hochgradige (1/22 Kontrolle) und hochgradige (3/17 Kohlenstaubgruppe) bronchiolo-alveoläre Hyperplasien fanden sich bei Einzeltieren in Kontrolle und Kohlenstaubgruppe. Die übrigen der gegenüber Kohlenstaub exponierten Ratten wiesen ausschließlich sehr geringgradige bis geringgradige bronchiolo-alveoläre Hyperplasien - wie sie in ähnlicher Form auch bei der Kontrolle beobachtet werden können - auf. Hingegen führte eine niedrige Dosis ultrafeiner Rußpartikel zwar ebenfalls nur bei 3/17 Tieren zu fokal exzessiven bronchiolo-alveolären Hyperplasien, aber die übrigen Tiere zeigten überwiegend mittelgradige bronchiolo-alveoläre Hyperplasien. Plattenepithelmetaplasien als adaptative Reaktion auf einen toxischen Reiz mit möglicher Progression zu benignen zystischen Epitheliomen bis hin zu Plattenepithelkarzinomen (Boorman et al., 1996) traten bei 2/17 Tieren der Kohlenstaubgruppe geringgradig, hingegen bei 2/17 Tieren der Rußgruppe als aggregierte Metaplasien (Präneoplasien) auf. Alveolare Lipoproteinose, Cholesteringranulome, Entzündungszellinfiltrationen, interstitielle Fibrose, Becherzellmeta- und -hyperplasien waren bei den mit Kohlenstaub behandelten Ratten eher geringgradig, hingegen bei den mit ultrafeinem Printex®-Ruß behandelten Ratten überwiegend mittelgradig ausgebildet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nach Instillation von 10 x 0,5 mg ultrafeinen Printex®-Rußes die persistierende Entzündung und Tumorinzidenz deutlich höher sind, als nach der Instillation von 10 x 1 mg des Kohlenstaubs, der allerdings – wie erläutert – unter Berücksichtigung der Vorkenntnis über die Wirkungsunterschiede zwischen größeren und ultrafeinen Partikeln unterdosiert wurde, aber die Messwerte für die bronchiolo-alveolären Hyperplasien und die Entzündungszellinfiltrate lagen immerhin deutlich über denen der Kontrolle.

Schlussfolgerungen für die Planung und Durchführung von Kanzerogenitätsversuchen, die sich aus der Erkennung einer höheren Anzahl von Tumoren durch die Diagnostik einer größeren Anzahl von Gewebsschnitten ergeben

Die kanzerogene Wirkung von amorphem SiO₂ ist besonders gut geeignet, um die befürchtete Nicht-Erkennung einer kanzerogenen Wirkung zu demonstrieren.

Abbildung 4 veranschaulicht den Unterschied zwischen den durch Intensiv-Histologie (Untersuchung von 60 Schnitten pro Lunge) und Routine-Histologie (Untersuchung von 6 Schnitten pro Lunge) erkannten Tumorhäufigkeiten. Die Höhe und die Bedeutung dieses großen Unterschieds im Falle des amorphen SiO₂ ist sicherlich nicht die Regel.

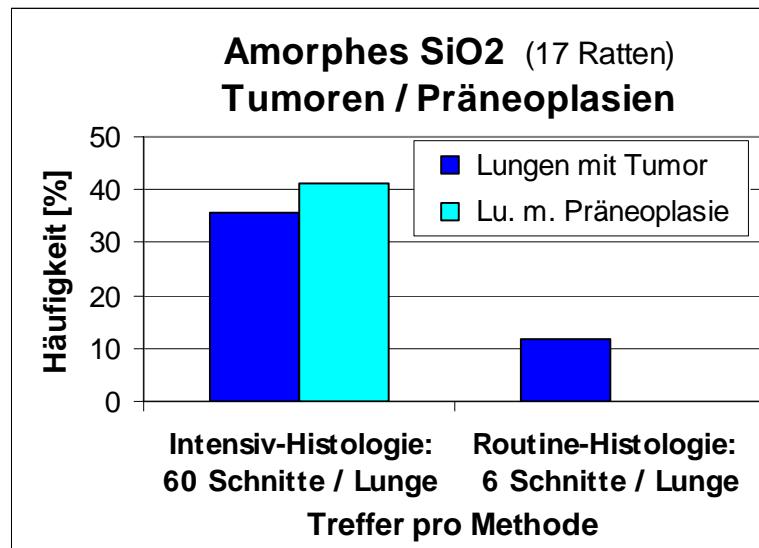


Abbildung 4: Vergleich zwischen den Ergebnissen der Intensivhistologie und der Routinehistologie. Unter der Voraussetzung, dass in der Kontrolle auch bei einer größeren Anzahl der untersuchten Tiere keine Tumoren gefunden werden, bleibt die Tumorhäufigkeit durch amorphes SiO₂ von 35 % statistisch signifikant erhöht (siehe **Tabelle 7.14**) Die relativ hohe Anzahl der Tiere mit Präneoplasien, die in der Regel klein sind und daher nur mit hohen Schnittzahlen zu erfassen sind, unterstützt die Beurteilung des Experiments als „positiv“. Bei der routinemäßigen histologischen Untersuchung von 6 Schnitten pro Rattenlunge werden kleine Tumoren mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an einer Stelle angeschnitten, die eine Diagnose als Tumor oder Präneoplasie zulässt

Der große Aufwand sollte daher nur besonderen Fällen vorbehalten bleiben, über die in jedem Einzelfall entschieden werden muss. Dieses Experiment sollte zunächst einmal zeigen, wie solche Unterschiede ausfallen können, und zwar nicht nur bezüglich der Anzahl der Ratten mit Tumoren, die in der Regel allein als Maß für die kanzerogene Wirkung betrachtet werden, sondern auch im Hinblick auf die Anzahl von Tumoren pro Ratte. In der Quarzgruppe wurden bei 7 mit 60 Schnitten untersuchten Lungen insgesamt 44 Tumoren gefunden im Unterschied zu 17 Tumoren, die bei der Untersuchung von 6 Schnitten ermittelt worden wären (**Tabelle 7.9**). Nach **Tabelle 7.10** beträgt die mittlere Wahrscheinlichkeit 34 %, um Tumoren mit der Höhe von 1 mm an drei Schnitten zu diagnostizieren; mit 7 Schnitten erhöht sich die Wahrscheinlichkeit auf 80 %, mit 12 Schnitten beträgt sie 100 %. Immerhin hatten die kleinen Tumoren mit einer Größe von maximal 1 mm³ einen Anteil von 43 % aller auf ihre Größe untersuchten Tumoren, so dass die Irrtumswahrscheinlichkeit bei einem großen Anteil hoch ist.

Andererseits ist zu berücksichtigen, dass die Tumorentstehung ein Phänomen des höheren Lebensalters ist; je niedriger die Exposition gegenüber einem Kanzerogen, desto später treten in einem Kollektiv Tumoren auf. Das gilt für Versuchstiere ebenso wie für den Menschen. Bei der Abwägung von Aufwand und Trefferhäufigkeit sollte die Untersuchung mit hohem Aufwand bei alt gewordenen Tieren beginnen, wobei das Versuchsziel und die Notwendigkeit einer statistischen Absicherung den Aufwand mitbestimmen muss. Wichtige Anhaltspunkte für solche Abwägungen lassen sich in den Ergebnissen der verschiedenen Versuchsgruppen finden, die insbesondere aus **Tabelle 7.14** hervorgehen. Der Versuch sollte mit einer ausreichend hohen Anzahl an

Tieren beginnen, damit genügend Tiere ein hohes Alter erreichen. Wenn bei den alten Tieren mit hohem Aufwand keine Tumoren gefunden werden, kann die Untersuchung früher gestorbenen Tiere unterbleiben, soweit nicht aus toxikologischer Sicht außerhalb der Kanzerogenität ein Informationsinteresse besteht.

Die berechtigte Frage, ob der Nachweis eines beginnenden Tumorwachstums im hohen Lebensalter noch eine Bedeutung hat, ist für das betroffene Individuum zu verneinen, auch dann, wenn es sich um einen Menschen handeln würde; denn mit der Diagnose „beginnender Lungentumor“ bei der Sektion bzw. der anschließenden histologischen Untersuchung von tumorverdächtigem Gewebe ist kein Krankheitswert zu Lebzeiten und keine Todesursache verbunden. Aus präventivmedizinischer Sicht ist ein solcher Befund jedoch ganz anders zu bewerten. Hier ist er, sofern eine statistisch signifikant erhöhte Häufigkeit gezeigt werden kann, ein entscheidender Nachweis für eine kanzerogene Wirkung einer bestimmten Exposition.

Ein solcher Nachweis hat insofern eine große Bedeutung, weil die Nachweisgrenze für eine kanzerogene Wirkung wegen der normalerweise kleinen Tierzahlen mit einem Exzess Risiko von ungefähr 10 % sehr hoch liegt im Vergleich zu der sozialmedizinisch oder politisch zumutbaren Höhe eines Krebsrisikos, das in allen Veröffentlichungen zu diesem Thema bei „irgendwo unter 1 zu 1.000“ angesetzt wird. Den Fall *amorphes SiO₂* könnte man als Musterbeispiel für die Bedeutung einer Intensivhistologie bezeichnen: Bisher lag mit diesem Staub nur *eine* Studie mit negativem Ergebnis vor; in diesem neuen Experiment wurde entgegen den Regeln für Kanzerogenitätsstudien nur eine einzige Versuchsgruppe eingesetzt, und zwar mit einer Dosierung, die auf die Persistenz einer chronischen Entzündung in Höhe der mit ultrafeinem Ruß behandelten Versuchsgruppe gezielt war. Dieses Ziel wurde relativ gut erreicht und damit gezeigt, dass die Entzündung die entstandenen Tumoren zumindest nicht allein ausreichend erklärt. Mit der Routinehistologie konnte bei der kleinen untersuchten Tierzahl nur *ein Verdacht auf kanzerogenes Potential* geäußert werden, der mit einer höheren Dosis in einem Nachfolgeversuch hätte überprüft werden müssen. Einem Kanzerogenitätsnachweis durch höhere Dosen wird aber in den letzten Jahren zunehmend die Hypothese einer Wirkungsschwelle entgegen gestellt. Unabhängig davon, ob eine solche Argumentation im Einzelfall berechtigt ist, ist der Tumornachweis bei einer niedrigeren Dosis immer das überzeugendere Argument für eine Kanzerogenität. Infolgedessen ist der erheblich höhere Aufwand der Intensivhistologie in den wie beim Musterbeispiel *amorphes SiO₂* gelagerten Fällen angezeigt. Wenn in einer Versuchsgruppe makroskopisch nur ein fraglich positiver Tumorbefund vorliegt, wird das Ergebnis einer intensiven histologischen Untersuchung von zunächst nur wenigen, alt gewordenen Tieren Hinweise auf die angemessene weitere Vorgehensweise geben.

Insgesamt lässt sich im Rückblick auf frühere Ergebnisse aus Kanzerogenitätsprüfungen von Schadstoffen an Ratten schließen, dass die Berechnungen der Dosis-Häufigkeitsbeziehungen die wahren Verhältnisse in der Regel unterschätzt haben. Dies gilt unabhängig davon, in welchem Maße die Ergebnisse im Einzelfall von der Ratte auf den Menschen übertragbar sind.

Welche Schlüsse können von den Rattenexperimenten auf die Wirkung von Staub-Expositionen auf den Menschen gezogen werden?

Aus zahlreichen Untersuchungen an Mensch und Ratte mit Quarzstaub und einigen anderen Stäuben haben sich grundsätzliche Ähnlichkeiten bezüglich pathophysiologischer und pathologisch-anatomischer Wirkungen ergeben, so dass das

Tiermodell in der Regel in allgemeiner Weise als aussagekräftig für die Abläufe von Staubwirkungen beim Menschen angesehen werden kann. In den Untersuchungen wurden aber auch quantitative Unterschiede in der Ausprägung einzelner Wirkungsparameter deutlich, deren Bedeutung für die Übertragung von Dosis-Wirkungsbeziehungen für die im Vordergrund stehenden Endpunkte Entzündung, Fibrose und insbesondere die Kanzerogenität von der Ratte auf den Menschen zum Teil noch nicht hinreichend beurteilt werden können. Infolgedessen ist eine Gegenüberstellung von Abschätzungen der Krebsrisiken aufgrund von Studien an Ratte und Mensch durch Feinstäube von Interesse; sie findet sich im Anhang unter 6.2.

Die wesentlichsten Ergebnisse der Untersuchungen dieses Projekts werden im Folgenden zusammengefasst. Es erscheint gerechtfertigt, sie in allgemeiner Form als auf den Menschen übertragbar anzusehen.

Eine gute Assoziation zwischen Entzündungsgrad der Lunge und Fibrosegrad wurde bestätigt, aber auch gezeigt, dass der Entzündungsparameter PMN in der Lungenspülflüssigkeit im Falle des amorphen SiO₂ mit dem Fibrosegrad in einer deutlich anderen Beziehung steht als beim Quarz. Da die Messung der PMN auch in der Humanmedizin für diagnostische Zwecke angewandt wird, sollte der neue Befund aufgegriffen und auf seine Bedeutung für die Humanmedizin geprüft werden.

Die vermutete enge Assoziation zwischen Entzündungsgrad der Lunge und neoplastischen oder präneoplastischen Reaktionen wurde am Beispiel des amorphen SiO₂ im Verhältnis zum Quarzstaub mit den angewandten Messgrößen nicht bestätigt, denn die Kanzerogenität war in dieser Gruppe im Vergleich mit den bio-beständigen Stäuben nur schwach und nicht signifikant. Das Ergebnis lässt auf die Mitwirkung eines zusätzlichen Faktors bei der Tumorinduktion durch biobeständige Stäube schließen. Dieser Faktor könnte z.B. in einem anderen Entzündungstyp liegen; hierzu fehlen entsprechende Untersuchungen, die eine solche Ursache belegen. Mehrere Autoren schließen allerdings aus ihren Befunden auf eine direkte toxische Wirkung von Partikeln auf die Epithelzellen, die auch ohne Entzündung oder parallel zum Entzündungsgeschehen abläuft. Unsere Ergebnisse sprechen nicht dafür, dass chronische Entzündungen jeder Art für die Lunge ein kanzerogenes Agens darstellen, dessen Stärke mit den bisher üblichen diagnostischen Methoden quantifiziert werden kann. Wegen der großen Bedeutung dieses Zusammenhangs für die menschliche Lunge sollte die Frage nach einem optimalen Gradmesser für die Entzündung als Ursache der Kanzerogenität untersucht werden.

Die neuen Erkenntnisse über die PVNO-Wirkung zusammenfassend ist festzuhalten: PVNO hemmte die Quarzkanzerogenität zwar im Prinzip, aber quantitativ nur mäßig. Im Unterschied dazu war der in verschiedenen älteren Untersuchungen beobachtete Hemmeffekt von PVNO auf die zytotoxische und fibrogene Quarzwirkung stärker ausgeprägt und verlief dort bis zur Reduzierung auf die Wirkung von „Inertstaub“.

Eine kanzerogene Wirkung von amorphem SiO₂ wurde erstmals erkannt, aber nur nach histologischer Diagnostik von ca. 60 Schnitten pro Lunge. Dieser Befund sollte durch eine größere Tierzahl bestätigt werden, da es sich um einen Staub handelt, der für verschiedene Anwendungsbereiche in großen Mengen produziert wird, so dass sich die Frage nach regulatorischen Konsequenzen stellt.

Ultrafeiner Ruß erzeugte bei 35 % der 17 mit Routinediagnostik untersuchten Tiere Tumoren, und zwar mit einer Lungenstaubdosis, die nur etwa 1½-mal so hoch war wie der Volumengrenzwert für Feinstaub der MAK-Kommission. Kohlenstaub war in der

verabreichten niedrigen Dosis bei den 17 untersuchten Tieren nicht kanzerogen. Dieser fehlende positive Befund sollte nicht im Sinne einer grundsätzlich fehlenden Kanzerogenität beim MAK-Wert interpretiert werden, weil die etwa 7-fache Dosis sich in einem früheren Versuch als eindeutig tumorerzeugend erwiesen hat und der Vertrauensbereich bei der kleinen Tierzahl groß ist. Ein tolerables Krebsrisiko durch Einhaltung des MAK-Wertes von < 1 : 1.000 hätte allenfalls durch einen negativen Befund nach Gabe einer sehr hohen Dosis ohne lebensverkürzende Wirkung weitgehend ausgeschlossen werden können.

Die histologischen Reaktionen auf alveolengängige Partikel im oberen Größenbereich unterscheiden sich mit den angewandten histologischen Methoden nicht qualitativ von denen auf ultrafeine Partikel. Es konnten nur quantitative Unterschiede festgestellt werden. Die Bedeutung der Partikelgröße für die kanzerogene Wirkungsstärke und die damit im Zusammenhang stehende Frage nach dem geeigneten Dosismaß wird im Anhang zum Textteil (6.1) vor dem Hintergrund eines größeren Kenntnisstandes diskutiert.

Aus der Erkennung einer zwei- bis dreifach höheren Anzahl von Tumoren durch die Diagnostik der hohen Anzahl von 60 Gewebsschnitten pro Lunge ergeben ergibt sich für die Planung und Durchführung von Kanzerogenitätsversuchen folgende Schlussfolgerungen: Der hohe Aufwand der histologischen Diagnostik einer mehrfachen Anzahl von Schnitten anstatt der routinemäßigen Untersuchung von 6 Schnitten sollte nur besonderen Fällen vorbehalten bleiben, über die von Fall zu Fall entschieden werden muss, und zwar in einem mehrstufigen Verfahren, das mit der Untersuchung vieler Schnitte an zwei bis drei alt gewordenen Tieren beginnen sollte. Das Ergebnis hieraus, das Versuchsziel, die Anforderungen an eine statistische Absicherung und die zur Verfügung stehenden Mittel müssen in die Entscheidung für die weitere Vorgehensweise einfließen.

5. Literatur

- Armbruster, L.; Emmerichs, M.; Ios, E.: Kombination der Mikrosiebung und der Korngrößenanalyse mit dem Coulter Counter. In: Der Minister für Wirtschaft, Mittelstand und Verkehr des Landes Nordrhein-Westfalen (Hrsg.): Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau, Arbeitsgemeinschaft Staub- und Silikosebekämpfung, Band 12. Essen: Verlag Glückauf GmbH 1979, 129-135
- Arndt, R.: Modelle zur Festlegung risikobasierter Grenzwerte. Symposium Prävention am Scheideweg – risikobasierte Grenzwerte und ihre Folgen, Gießen, 17. November 2004. Vortrag
- Bahnemann, R., Jacobs, M., Karbe, E. et al.: RITA – Registry of industrial toxicology animal-data. Guides for organ sampling and trimming procedures in rats. Exp Toxic Pathol 47 (1995), 247-266
- Boorman, G.A.; Brockmann, M.; Carlton, W.C.; Davis, J.M.G.; Dungworth, D.L.; Hahn, F.F.; Mohr, U.; Richter-Reichhelm, H.-B.; Turusov, V.S.; Wagner, B.M.: Classification of cystic keratinizing squamous lesions of the rat lung: report of a Workshop. Toxicol. Pathol. 24 (1996), 564-572
- Borm JA, Schins RPF, Albrecht C. Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. Int J Cancer 2004; 110: 3-14.
- Brockhaus, A., Schlipkötter, H.W.: Tierexperimente über die Wirkung von Quarzstaub in Gegenwart von basischen und sauren Ionenaustauschern. Beitr Silikose-Forsch 1960; Sonderband Grundfragen Silikoseforsch 4 (1960), pp 155-163
- Churg A.: The Uptake of Mineral Particles by Pulmonary Epithelial Cells. Am J. Respir Crit Care Med 154 (1996), 1124-1140
- Churg A.; Wright, J.L.; Stevens, B.: Exogenous Mineral Particles in the Human Bronchial Mucosa and Lung Parenchyma. I. Nonsmokers in the General Population. Experimental Lung Research 16 (1990), 159-175
- Csicsaky, M., Roller M., Pott F.: Quantitative Risikoabschätzungen für ausgewählte krebszeugende Arbeitsstoffe. Hrsg. v.d. Bundesanstalt für Arbeitsschutz, Dortmund. Bremerhaven: Wirtschaftsverl. NW, Verl.f.neue Wissenschaft 1993. 36 S. = Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz - Sonderschrift - S 31
- Degussa (Ed.): AEROSIL®. PT 6-24-2-1084 H. Frankfurt 11, 1984
- Degussa (Ed.): Pigmentruße für Kunststoffe. Schriftenreihe Pigmente. Pig 40-1-205-883 Ra. September 1983
- Degussa (Ed.): Pigmentruße/Pigment Blacks. Technische Daten/Technical Data. PT 10-27-4-194 Ha Prosp.Nr. 1000/0/1. Frankfurt am Main, 1994
- Degussa (Ed.): Über biologische Wirkungen von SiO₂, Al₂O₃ und TiO₂. Schriftenreihe Pigmente. Pig. 64-3-205-583. Mai 1983
- Degussa (Ed.): Was ist Ruß? PT 17-15-3-1191 Be, 1991
- Driscoll, K.E.: Role of inflammation in the development of rat lung tumors in response to chronic particle exposure. Inhal. Toxicol. 8 (1996), Suppl. 139-153
- Dungworth, D.L.; Hahn, F.; Hayashi, Y.; Keenan, K.; Mohr, U.; Rittinghausen, S.; Schwartz, L.: Respiratory system. In: Mohr, U. (Hrsg.): International classification of rodent tumours. Part 1: The rat. 1. Respiratory system, IARC Sci. Publ. No. 122. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1992

- Eickhoff, K.-P.: Bestimmung von Dichte, spezifischer Partikeloberfläche und Partikelgröße. Prüfbericht Nr. B0104014 der Gesellschaft für Oberflächen- und Festkörperuntersuchungen mbH für die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Dortmund. Hamburg 2001.
- Einbrodt, H.J.: Der Aussagewert von Lungenstaubanalysen. *Arbeitsmed. - Sozialmed. - Arbeitshyg.* 4 (1967), 142-143
- Einbrodt, H.J.: Quantitative und qualitative Untersuchungen über die Staubretention in der menschlichen Lunge. *Beitr. Silikose-Forsch.* 87 (1965), 1-105
- Ernst, H.; Rittinghausen, S.; Bartsch, W.; Creutzenberg, O.; Dasenbrock, C.; Görlitz, B.; Hecht, M.; Kairies U.; Muhle H.; Müller M.; Heinrich U.; Pott, F.: Pulmonary inflammation in rats after intratracheal instillation of quartz, amorphous SiO₂, carbon black, and coal dust and the influence of poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO). *Exp. Toxic. Pathol.* 54 (2002), 109-126
- Friemann, J., Kubitsa, R., Weishaupt, Ch., Varnai, M., Pott, F., Musinski, G.: Untersuchungen zur formalen Pathogenese quarzstaubinduzierter Lungentumoren bei der Ratte. Teil I: Pneumozytenproliferation und Lungenumbau. *Silikosebericht NRW* 19, 1995, pp. 291-310
- Geigy A.G., J.R., Pharma (Hrsg.): *Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen*. 7. Aufl. Redaktion: Diem, K.; Lentner, C.. Basel (1968)
- Gore DJ, Patrick G. A quantitative study of the penetration of insoluble particles into the tissue of the conducting airways 1982. *Ann occup Hyg* 1982; 26: 149-64.
- Greim H. (Hrsg): Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen) der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Siliciumdioxid. 29. Lieferung 1997. Wiley-VCH, Weinheim (1999)
- Greim H. (Hrsg): Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen) der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Allgemeiner Staubgrenzwert. 25. Lieferung 1997. Wiley-VCH, Weinheim (1997)
- Greim H., Borm P., Schins R., Donaldson, K., Driscoll, K., Hartwig, A., Kuempel, E.D., Oberdörster, G., Speit, G.: Toxicity of fibers and particles – Report of the workshop held in Munich, Germany, 26 – 27 October 2000. *Inhal. Toxicol.* 2001; 13: 737-54.
- Heinrich, U.; Dungworth, D.L.; Pott, F.; Peters, L.; Dasenbrock, C.; Levsen, K.; Koch, W.; Creutzenberg, O.; Schulte, A.: The carcinogenic effects of carbon black particles and tar-pitch condensation aerosol after inhalation exposure of rats. *Inhaled Particles VII. Ann. Occup. Hyg.* 38 (1994) Suppl. 1, 351-356
- Heinrich U.; Fuhst, R.; Rittinghausen, S.; Creutzenberg, O.; Bellmann B.; Koch, W.; Levsen, K.: Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to Diesel engine exhaust, carbon black and titanium dioxide. *Inhal. Toxicol.* 7 (1995), 533-556
- Heinrich, U., Muhle H., Takenaka S., Ernst H., Fuhst R., Mohr U., Pott F., Stöber W.: Chronic effects on the respiratory tract of hamsters, mice and rats after long-term inhalation of high concentrations of filtered and unfiltered Diesel engine emissions. *J.Appl.Toxicol.*, 6 (1986a), 383-395
- Heinrich, U.; Pott F.; Rittinghausen, S.: Comparison of chronic inhalation effects in rodents after long-term exposure to either coal oven flue gas mixed with pyrolyzed pitch or Diesel engine exhaust. In: Ishinishi, N.; Koizumi, A.; McClellan, R.O.; Stöber, W. (eds): *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust.*; 441-457. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Sci. Publ. (Biomedical Div.) (1986b) (= *Developments in Toxicology and Environmental Science*. Vol. 13.)
- Hoffmann, B., Jöckel, K.-H.: Diesel exhaust and coal mine dust: Lung cancer risk in

- Occupational Setting. Framing the future in light of the past: Living in a chemical world. 3rd International Scientific Conference Bologna – Italy, Sept. 18-21, 2005
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Vol.68. Silica, Some Silicates, Coal Dust and para-Aramid Fibrils. Silica 41-242. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC. Lyon (1997)
- ILSI Risk Sciences Institute Workshop Participants: The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: A workshop consensus report. *Inhal. Toxicol.* 12 (2000), 1-17 Johnston, C.J.; Driscoll, K.E.; Finkelstein, J.N.; Baggs, R.; O'Reilly, M.A.; Carter, J.; Gelein, R., Oberdörster, G.: Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol. Sci* 56 (2000), 405-413
- King, E.J.; Maguire B.A.; Nagelschmidt, G.: Further studies of the dust in lungs of coal-miners. *Br. J. Industr. Med.* 13 (1956), 9-23
- Klingenbergs, H.; Schürmann, D.; Lies K.-H.: Dieselmotorabgas - Entstehung und Messung. In: Krebszeugende Stoffe in der Umwelt - Herkunft, Messung, Risiko, Minimierung. VDI-Berichte 888. -Düsseldorf: VDI-Verl. 1991, 119-131
- Klosterkötter, W., Einbrodt HJ.: Quantitative tierexperimentelle Untersuchungen über den Abtransport von Staub aus den Lungen in die regionalen Lymphknoten. *Arch Hyg Bakteriol.* 149 (1965), 367-84
- Klosterkötter, W.: Erzeugung einer Silikose durch Inhalation amorpher Lichtbogen-Kieselsäure im Tierexperiment, *Arch. Hyg.* 150 (1966), 542-557
- Klosterkötter, W.: Gewerbehygienisch-toxikologische Untersuchungen mit hydrophoben amorphen Kieselsäuren, I. *Aerosol-R.* 972, *Arch. Hyg. Bd.* 149 (1965), 577-598
- Klosterkötter, W.: Gewerbehygienisch-toxikologische Untersuchungen mit hydrophoben amorphen Kieselsäuren. II. *Fällungs-Kieselsäure D500*, *Arch. Hyg.* 152 (1968), 7-22
- Klosterkötter, W.; Leiteritz, H.: Tierexperimentelle Untersuchungen über die Gewebswirkungen von Quarz, Quarzit und Glimmer. In: Der Minister für Wirtschaft, Mittelstand und Verkehr des Landes Nordrhein-Westfalen (Hrsg.): Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau, Arbeitsgemeinschaft Staub- und Silikosebekämpfung, Band 7. Detmold: Buchdruckerei und Verlag Hermann Bösmann GmbH 1969, 39-43
- LAI Länderausschuß für Immissionsschutz: Krebsrisiko durch Luftverunreinigungen. Entwicklung von „Beurteilungsmaßstäben für kanzerogene Luftverunreinigungen“ im Auftrage der Umweltministerkonferenz. Hrsg.: Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen. 1992
- LAI Länderausschuß für Immissionsschutz: Krebsrisiko durch Luftverunreinigungen – Materialienband I und II. Hrsg.: Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen. 1993
- Mehnert, W.H., M. Smans, C.S. Muir, M. Möhner, D. Schön, P. Bernstein, W. Staneczek, L. Beckmann: Atlas der Krebsinzidenz in der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik 1978-1982. Atlas of cancer incidence in the former German Democratic Republic 1978-1982. IARC Sci. Publ. No. 106. BGA-Schriften 4/1992.- München: MMV Medizin Verl., Oxford, New York, N.Y.: Oxford University Press 1992
- Mohn, G.: Die Reaktion von Organen der Ratte auf kolloidale Kieselsäure in Gegenwart von Polyvinylpyridin-N-oxyd und Polyvinylpyrrolidon, *Beitr. Silikose-Forsch.* H. 88 (1965), S. 1-43
- Mohn, G.: Histopathologische Veränderung von Rattenorganen bei protrahierter intravenöser Verabreichung von kolloidaler Kieselsäure und ihre Beeinflussung durch Polyvinylpyrrolidon, *Silikose-Forsch. S-Bd Grundfragen Silikoseforsch.* Bd. 5 (1963) 133-151

- Müller, K.-M.; Reichel, B.: Heterogenität der Lungentumoren: Wie sinnvoll ist das Grading? Verh.Dt.Ges.Innere Med., 96 (1990), 220-228
- Müller, K.-M.; Wiethege Th.: Quarz und Lungentumoren – Daten und Fakten des Pathologen. Pneumologie, 54 (2000), 24-31
- Neumann, H.G.; Thielmann H.W.; Gelbke, H.-P.; Greim, H.; Kappus, H.; Norpoth, K.H.; Reuter, U.; Vamvakas, S.; Wardenbach, P.; Wichmann, H.-E. (1997): Vorschläge zur Änderung der Einstufung krebserzeugender Arbeitsstoffe. Arbeitsmed. Sozialmed.Umweldmed. 32, 298-304
- Nolan, R.P.; Langer, A.M.; Herson, G.B.: Physicochemical properties and membranolytic activities of the titanium dioxide polymorphs compared with those of quartz. In: Wehner, A.P.; Felton, D.L. (Hrsg.): Biological interaction of inhaled mineral fibers and cigarette smoke. Columbus, Ohio: Battelle Memorial Institute, 1989, 391-419
- Oberdörster, G., Yu, C.P.: The carcinogenic potential of inhaled diesel exhaust, a particle effect? J Aerosol Sci, 21, suppl.1 (1990), S397-S401
- Oberdörster, G.: Lung particle overload: Implications for occupational exposures to particles. Reg. Toxicol. Pharmacol. 27 (1995), 123-135
- Oberdörster, G.: Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response relationships of inhaled particles. Inhal. Toxicol. 8 (1996) Suppl., 73-89
- Oberdörster, G.: Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. Int Arch Occup Environ Health 74 (2001), 1-8
- Oberdörster G. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous Particles. Inhal Toxicol 2002; 14: 29-56.
- OSHA (Occupational Safety and Health Administration) Occupational exposure to methylene chloride. OSHA Federal Register # 62:1494-1619. FR Doc. 97-198 Filed 1-9-97.
http://www.osha-slc.gov/FedReg_osha_data/FED19970110.html (1997)
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G.D.: Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. J Am Med Assoc 287 (2002), 1132-1141
- Pott, F.: Experimente über die Wirkung von Poly-2-vinylpyridin-N-oxid (PVNO) auf die Lungensilikose der Ratte. Eine Zusammenstellung von Versuchsergebnissen aus den Jahren 1968/69 im Rahmen des Projekts FV 203 61 215. Manuskript 14 S. Leverkusen, August 2004.
- Pott, F., D.L. Dungworth, U. Heinrich, H. Muhle, K. Kamino, P.G. Germann, M. Roller, R.M. Rippe, U. Mohr:Lung tumours in rats after intratracheal instillation of dusts. Ann.Occup.Hyg., 38 Suppl. 1 (1994), 357-363.(Inhaled Particles VII)
- Pott, F., Dehnen, W., Brockhaus, A.: Der Abbau von Kollagen bei der experimentellen Silikose nach Behandlung mit Polyvinylpyridin-N-oxid in Abhängigkeit von der Dosis. Beitr.Klin.Tuberk., 141 (1970), 259-267
- Pott, F; Roller, M.: Beschreibung und Auswertung einer Kanzerogenitätsstudie mit 19 Stäuben an Ratten. Schlussbericht über das Projekt F1843 der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Dortmund (2002)
- Pott, F., Roller, M.: Untersuchungen zur Kanzerogenität granulärer Stäube an Ratten – Ergebnisse und Interpretationen. Kurzbericht über das Projekt F1843 der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, veröffentlicht am 28.08.2003 im Internet unter <http://www.baua.de/fors/f1843.htm>
- Pott, F.; Roller M.: Carcinogenicity of poorly soluble particles in rats – in man too?

- In: Heinrich, U.; Mohr U. (eds): Relationships between acute and chronic effects of air pollution. ILSI Monographs. Washington D.C.: ILSI-Press (2000), 235-253
- Pott, F.; Roller M.; Althoff, G.-H.; Rittinghausen, S.; Ernst, H.; Mohr, U.: Lung tumors in rats after repeated intratracheal instillation of coal dusts. In: Heinrich, U.; Mohr, U. (eds): Relationships between acute and chronic effects of air pollution. ILSI Monographs. Washington DC: ILSI Press (2000), 409-413
- Pott, F.; Roller, M.: Relevance of non-physiologic exposure routes for carcinogenicity studies of solid particles. In: U. Mohr *et al.* (Eds) Toxic and Carcinogenic Effects of Solid Particles in the Respiratory Tract.- ILSI-Monographs. Washington, D.C.: ILSI-Press (1994), 109-125
- Pott, F., Ziem, U., Reiffer, F.-J., Huth, F., Ernst. H., Mohr, U.: Carcinogenicity studies on fibres, metal compounds, and some other dusts in rats. *Exp.Pathol.*32, (1987), 129-152
- Robock, K.: Standard quartz DQ12 < 5 µm for experimental pneumoconiosis research projects in the Federal Republic of Germany. *Ann.occup.Hyg.* 16, (1973), 63-66
- Roller M. Risikobetrachtungen bei der Übertragung tierexperimenteller Daten zur Kanzerogenität und Fibrogenität durch Quarz auf den Menschen. In Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA, Ed.) Quarz - Einstufung, Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Workshop vom 07./08. März 2002 in Berlin. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. Tb131. Bremerhaven: Wirtschaftsverlag NW. 2003; 174-95.
- Roller, M.: Die Risikoabschätzungen des LAI vor dem Hintergrund der Feinstaubdiskussion im Jahre 2005. Gefahrstoffe, Reinhaltung der Luft (2005); 425-434
- Roller, M.: Dose-response relationships of granular bio-durable dusts in rat lungs: does a cancer threshold exist? *Eur.J.Onc.*, 8 (2003), 277-293.
- Roller, M.; Pott, F.: Lung tumour risk estimates from rat studies with not specific toxic granular dusts. Framing the future in light of the past: Living in a chemical world. 3rd International Scientific Conference Bologna – Italy, Sept. 18-21, 2005. Submitted for publication in Annals of the New York Academy of Sciences.
- Saber A.T.; Bornholdt J.; Dybdahl M., et al.: Tumornerosis factor is not required for particle-induced genotoxicity and pulmonary inflammation. *Arch Toxicol* 2005; 79: 177-182.
- Säverin R.; Bräunlich A.; Enderlein G.; Heuchert G.: Kohortenstudie zum Einfluß von Dieselmotorenemissionen auf die Lungenkrebsmortalität im Kalibergbau (Abschlussbericht). Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Forschung FB 805. Wirtschaftsverl. NW, Verl. f. neue Wissenschaft, Bremerhaven (1998)
- Schlüter, G.: Stellungnahme des Beraterkreises Toxikologie des AGS zur Frage der Einstufung von kristallinem Siliciumdioxid (Quarz [14808-60-7] und Cristobalit [14464-46-1]) in Form von alveolengängigen Stäuben. In: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA, Ed.) Quarz - Einstufung, Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Workshop vom 07./08. März 2002 in Berlin. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. Tb131. Bremerhaven: Wirtschaftsverlag NW. 2003. S. 109-133
- Simons, J.W.I.M.: Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis. *Critical Rev. in Oncogenesis* 6 (1995), 261-273
- Tran, C.L.; Buchanan, R.T.; Cullen R.T.; Searl, A.; Jones, A.D.; Donaldson, K.: Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance. *Inhal. Toxicol.* 12 (2000), 1113-1126
- US EPA (United States Environmental Protection Agency): Guidelines for Carcinogenis Risk Assessment. Risk Assessment Forum. Washington, DC. EPA/630/P-03/001F. March 2005.
- UBA Umweltbundesamt (Hrsg.): Durchführung eines Risikovergleichs zwischen Dieselmotorenemissionen und Ottomotorenemissionen hinsichtlich ihrer kanzerogenen und nicht-

kanzerogenen Wirkungen. Berichte 2/99 - Forschungsbericht 297 61 001/01. Red.
Fachgebiet II 1.4. Durchführende Inst.: Fraunhofer Institut für Toxikologie und
Aerosolforschung. Bearb.: Mangelsdorf, I. (Koordination); Aufderheide, M.; Boehncke, A.;
Melber, C.; Rosner, G.; Heinrich, U.; Höpfner, U.; Borken, J.; Patyk, A.; Pott, F.; Roller, M.;
Schneider, K.; Voß, J.-U.. Report Nr. UBA FB 99-033. Erich Schmidt Verlag, Berlin (1999)

Warheit, D.B.: Inhaled amorphous silica particulates: what do we know about their toxicological
profiles? J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2001;20 Suppl 1:133-41

Weller, W.: Anthrakosilikose - Tierexperimentelle Forschung. Bergbau-Berufsgenossenschaft,
Silikose-Forschungsinstitut Bochum. Hamm: Griebsch Druck 1977

Wichmann, H.-E.: Positive gesundheitliche Auswirkungen des Einsatzes von Partikelfiltern bei
Dieselfahrzeugen – Risikoabschätzung für die Mortalität in Deutschland 9 (2004), 85-99

Woitowitz, H.-J.: Die Rolle der Arbeitsmedizin und Epidemiologie bei der Festlegung
risikobasierter Grenzwerte. Symposium Prävention am Scheideweg – risikobasierte
Grenzwerte und ihre Folgen, Gießen, 17. November 2004. Vortrag

6. Anhang Text

6.1 Welches Dosismaß ist für einen Vergleich der kanzerogenen Wirkungsstärken verschiedener GBS der geeignetste? (F. Pott)

In Abbildung 3 wird gezeigt, in welchem Verhältnis die verabreichte Partikelmasse in jeder Gruppe zu den Maßzahlen steht, die sich bei Anwendung der Dosismaße Partikelvolumen und Partikeloberfläche ergeben. Die Ergebnisse des Projekts führen daher auch zu der Frage nach dem bestmöglichen Maßstab für die kanzerogene Dosis von GBS (= Abkürzung für die Neun-Worte-Definition „alveolengängige *biobeständige granuläre Stäube ohne bekannte signifikante spezifische Toxizität*“). Gut begründete Antworten lassen sich jedoch nicht aus den wenigen Versuchsgruppen dieses Projekts ableiten, sondern nur vor dem Hintergrund eines breiteren Kenntnisstandes aus anderen Untersuchungen.

Im Prinzip ist klar: Vergleiche von Wirkungsstärken verschiedener Stäube erfordern einen geeigneten Maßstab für die Dosis. Eine Dosis wird primär gravimetrisch angegeben. Aufgrund der Erfahrung mit Stäuben, die mit der Definition der GBS zusammengefasst werden, ist ihre chemische Struktur für ihre Wirkungsweise nicht relevant, sondern physikalische Charakteristika entscheiden über Unterschiede ihrer Wirkungsstärke. Infolgedessen kann das Dosismaß *Partikelmasse* beim Vergleich von Stäuben mit deutlich unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften nicht optimal sein. Unter rein wissenschaftlichem Aspekt lassen sich Wirkungsanteile an der Toxizität durch chemische Vorgänge nicht ausschließen; sie werden durch die in der Definition enthaltenen Worte *ohne bekannte signifikante Toxizität* aufgefangen; denn Korrekturen eines Grenzwertes werden nicht eingeführt, wenn neue Erkenntnisse eine Änderung der Wirkungsstärke um z.B. 20 % ergeben. Als mögliche Dosismaße für GBS sind daher primär folgende Parameter zu betrachten: Partikelmasse, Volumen (abhängig von Masse und Dichte), Oberfläche (Bestimmung mit dem Verfahren nach Brunauer, Emmet und Teller [„BET“]), Anzahl der Partikel. Die große Bedeutung einer weiteren Maßzahl für die Wirkung ist unbestritten: Die kanzerogene Wirkungsstärke alveolengängiger Partikel in einer bestimmten Masse nimmt mit abnehmender Partikelgröße zu. Diese Aufzählung schließt die Beteiligung anderer physikalischer Eigenschaften nicht aus.

Von den tierexperimentell arbeitenden Autoren hat sich die weitaus überwiegende Zahl für die BET-Oberfläche als den optimalen Maßstab ausgesprochen (Oberdörster und Yu, 1990; Oberdörster, 1996; 2001; 2002; Driscoll, 1996; Tran et al. 2000; Greim et al. 2001; Borm et al. 2004). Die Ansichten wurden an anderer Stelle eingehend diskutiert (Pott & Roller, 2003; Roller, 2003). Unabhängig von einzelnen experimentellen Ergebnissen besteht jedoch aus biologischer Sicht ein grundsätzlicher Einwand gegen das Dosismaß *Oberfläche*. Er ist darin begründet, dass kleine und große Staubteilchen gleich behandelt werden; die Unterschiede in der Wanderungsfähigkeit der Partikel und ihrer Lokalisation in der Lunge bleiben unberücksichtigt. Offenbar sind die Befürworter des Oberflächenmaßstabs der Ansicht, dass die stärkere Wirkung kleiner Partikel pro Masseneinheit durch die größere spezifische Oberfläche der kleineren Partikel zutreffend erfasst wird. Es kann jedoch nicht zutreffen, dass die Aufnahme und der Verbleib von Staubteilchen an den verschiedenartigen extra- und intrazellulären Orten in der Lunge und ihre großenabhängige Abwanderung aus der Lunge für ihre biologische Wirkungsstärke gleichgültig sind (Pott und Roller, 2003). Die statistische Ableitung von Driscoll (1996), nach der die Partikeloberfläche das optimale Dosismaß darstellt, ist durch die Zusammenfassung heterogener Experimente und die angewandte Methode fragwürdig;

außerdem wurde das Kriterium *Staubvolumen* nicht in die Analyse eingeschlossen.

Wenn die BET-Oberfläche das kanzerogene Agens für den Vergleich der Wirkungsstärken hinreichend repräsentieren würde, wären auch die beiden in diesem Bericht beschriebenen Versuchsgruppen mit Ruß-UF und Kohlenstaub mit ihren Oberflächendosen zu vergleichen. Demnach wäre die verabreichte Rußdosis 37-mal so hoch wie die des Kohlenstaubs (**Abbildung 3**), ganz abgesehen davon, dass von dem Kohlenstaub nur etwa ein Drittel der Massendosis als alveolengängig angesehen werden kann. Insofern wäre die Frage nach der in diesem Experiment nicht nachgewiesenen Kanzerogenität von Kohlenstaub mit der zu geringen Oberflächendosis und unter Berücksichtigung des statistischen Streubereichs voll geklärt. Andererseits wurde die angewandte Dosis nicht unter dem Aspekt der Oberflächendosis gewählt, sondern mit Blick auf das eindeutig positive Ergebnis aus zwei Versuchsgruppen nach Instillationen von insgesamt 66 bzw. 120 mg des gleichen Staubes, die Tumorhäufigkeiten von 57 % bzw. 65 % zur Folge hatten (Pott et al., 2000). Bei der Bewertung ist unter anderem die große Streuung durch die kleinen Tierzahlen zu berücksichtigen. Statistisch gesehen ist ein Risiko von 1 % viel wahrscheinlicher als ein kleineres Risiko, weil in dem neuen Experiment nur 17 Ratten untersucht wurden, diese allerdings mit 60 Schnitten pro Lunge. Falls das Versuchsergebnis jedoch als Hinweis auf eine tatsächlich vorliegende Wirkungsschwelle interpretiert wird, die im Bereich einer mit Routinemethoden bereits deutlich nachweisbaren Entzündung liegt, dann wäre in den Versuchsgruppen Quarz+PVNO und Ruß-UF umso mehr mit einer direkten toxischen Wirkung der viel kleineren Partikel auf die Epithelzellen als eigentliche Ursache der Tumorentstehung zu rechnen, als das bisher geschehen ist. Der Anteil der sekundär-gentoxischen Wirkung an der gesamten kanzerogenen Wirkung wäre dann nebenschließlich.

Eine neue experimentelle Datengrundlage für die Ermittlung des optimalen Maßstabs für die kanzerogene Wirkungsstärke ergibt sich aus der nunmehr im ITEM vervollständigten histopathologischen Tumordiagnostik aller relevanten Versuchsgruppen der Kanzerogenitätsstudie mit 19 Stäuben, von denen aufgrund der Ergebnisse 16 den GBS zugerechnet wurden. Die statistische Analyse ergab für das Dosismaß *Staubvolumen in Kombination mit der mittleren Partikelgröße* die mit Abstand beste Korrelation (Roller & Pott, 2005). Aus diesem Ergebnis der statistischen Analyse lässt sich jedoch nicht schließen, dass das Volumen auch das eigentliche kanzerogene Agens darstellt; denn die Vorstellungen über einen vom Volumen abhängigen Wirkungsmechanismus sind bisher eher spekulativ. Plausibler ist die Vorstellung, dass sich die pathophysiologischen Abläufe zwar auf der Partikeloberfläche abspielen, aber eben *nicht*, wie die Hypothese über die Oberflächenwirkung beinhaltet, *proportional der Oberflächenausdehnung*, und *unabhängig von der Partikelgröße*. Bisher wurden auch keine spezifischen Oberflächen-eigenschaften genannt, die – wie die Silanolgruppen auf der Quarzoberfläche – auf chemisch unterschiedlichen Oberflächen gleich sein müssten und als Wirkungsursache angesehen werden könnten. Das von Oberdörster (2001) als typisch vorgestellte Beispiel, in dem die Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen Titandioxid *ultrafein* und *fein* mit dem Anstieg der polymorpdkernigen Zellen (PMN) in der Lungenspülflüssigkeit nur mit dem Maßstab Oberfläche auf einer Ausgleichskurve liegen und nicht mit dem Maßstab Partikelmasse, ist einer der Fälle, in denen die Dichte der Partikel gleich ist. Die unterschiedliche Wirkungsstärke wird zwar durch die unterschiedlichen Oberflächen in diesem Fall zutreffend beschrieben, aber ohne den Nachweis eines ursächlichen Zusammenhangs, sondern sie ergibt sich dadurch, dass Partikelgröße und spezifische Oberfläche physikalisch in einer festen Beziehung zueinander stehen. Die Ursache des

unterschiedlichen PMN-Anteils an den Zellen in der Lungenspülflüssigkeit in dem Beispiel von Oberdörster ist – wie bei der Kanzerogenität – nicht in der größeren spezifischen Oberfläche der ultrafeinen Staubteilchen zu sehen, sondern in dem großenabhangigen Wanderungsverhalten und der unterschiedlichen Verteilung kleiner und größerer Staubteilchen auf verschiedene Zell- und Gewebearten der Lunge; bei subchronischen und chronischen Wirkungen ist auch die Elimination oder Aufenthaltsdauer in der Lunge von Bedeutung.

In **Abbildung 3** wurde gezeigt, dass Kohlenstaubteilchen mit ihrem großen mittleren Durchmesser von 4 µm zu einem Anstieg der PMN, des histologisch bestimmten Entzündungsgrads und der bildanalytisch gemessenen Fibrose geführt haben, die im gleichen Verhältnis zueinander stehen wie beim Quarz und etwa 30 % des Quarzwertes erreichen. (Bei Abweichungen von mikroskopischer und bildanalytischer Fibrosebestimmung ist der bildanalytische Wert entscheidend.) Dennoch wurde kein Tumor diagnostiziert. Aus diesem Befund lässt sich zwar kein tolerables Krebsrisiko in Höhe von weniger als 1 : 1.000 bei Einhaltung des MAK-Wertes für Feinstaub ableiten, aber in Anbetracht der in 4.2 angesprochenen Partikelaufnahme in Lungenepithelzellen liegt nahe, dass ein solcher Vorgang mit großen Staubteilchen viel seltener stattfindet, oder dass darauf anders reagiert wird als auf kleine.

6.2 Vergleich von epidemiologisch mit tierexperimentell gestützten Krebsrisiken durch Feinstäube (F. Pott)

In den letzten 20 Jahren wurden zahlreiche epidemiologische und experimentelle Kanzerogenitätsstudien mit Feinstäuben veröffentlicht, aus denen Lungenkrebsrisiken abgeschätzt wurden. Im Falle von Quarzstaub lagen die Schätzwerte, die für eine äquivalente Exposition ermittelt wurden, relativ nahe beieinander (Schlüter, 2001; Roller 2001). Unter äquivalenter Exposition wird die gleiche Exposition pro Woche über den gleichen Anteil der Lebenszeit verstanden.

Für nicht spezifisch toxische Feinstäube (GBS, Definition s. 6.1) erscheinen die sog. Dieselstudien für einen Vergleich zwischen Mensch und Ratte am besten geeignet, weil hierüber die meisten Untersuchungen vorliegen. Zwar enthält nativer Dieselruß zwischen 10 und 50 % organische Stoffe mit krebserzeugenden PAH, aber die PAH-Konzentrationen sind so gering, dass sich damit aufgrund von Inhalationsversuchen mit PAH-reichem Pechpyrolyseabgas (Heinrich et al. 1986a) und Dieselmotorabgas (Heinrich et al., 1986b) auf der Basis von Benzo[a]pyren als Referenzsubstanz bei dem minimalen PAH-Gehalt des Dieselrusses ein Wirkungsanteil von deutlich weniger als 0,1 % errechnen lässt (UBA, 1999). Selbst dann, wenn man einen höheren PAH-Gehalt des Dieselrusses als in den Inhalationsversuchen annimmt, andere PAH-Profile mit stärkerer Wirkung in Relation zum Benzo[a]pyren unterstellt und mögliche Kombinationswirkungen einschließt, lässt sich ein Wirkungsanteil von nicht wesentlich mehr als 1 % für die PAH am nativen Dieselruß schätzen. Auch wenn ein Wirkungsanteil der PAH von wenigen Prozent gegeben wäre, läge der einstufungsrelevante Anteil der Dieselrußwirkung immer noch weitestgehend bei dem biobeständigen Rußkern (= elementarer Kohlenstoff, EC); infolgedessen ist die Einordnung von Dieselruß in die Gruppe der GBS gerechtfertigt. Zu dieser Beurteilung kamen auch andere Autoren (ILSI, 2000; Oberdörster, 2002).

Epidemiologische Dieselstudien

Die aus mehreren epidemiologischen Dieselstudien gepoolten relativen Lungenkrebsrisiken liegen zwischen 1,33 und 1,47 (Hoffmann & Jöckel, 2005). Ein konsistenter Anstieg des Risikos über verschiedene Beschäftigungen und Studientypen hinweg weist nach Ansicht der Autoren auf einen ursächlichen Zusammenhang hin. Unter der Annahme einer moderaten mittleren Lungenkrebshäufigkeit der Männer ohne berufliche Belastung von 6 % und einem erhöhten relativen Risiko von 1,4 ergibt sich ein Exzess-Risiko von 2,4 % als Folge einer langfristigen beruflichen Exposition gegenüber Dieselruß. Die im deutschen Kalibergbau gemessene mittlere Exposition *der am höchsten exponierten Gruppe* lag bei 0,42 mg/m³, davon 63 % elementarer Kohlenstoff (Säverin et al., 1998). Daraus errechnet sich eine Konzentration von rund 0,25 mg GBS/m³. Wenn man diese hohe Exposition mit dem genannten Exzess-Risiko von 2,4 % in Beziehung setzt, würden bei linearem Verlauf der Dosis-Häufigkeitsbeziehungen

0,1 mg EC/m³ ein Lungenkrebsrisiko von 1 % verursachen.

Unter der Annahme einer weniger hohen mittleren Exposition für alle Dieselstudien, die eher zutreffen könnte, ergäbe sich eine noch höhere Wirkungsstärke.

Studien an Ratten mit Dieselruß und anderen GBS

Im Vergleich mit diesem Ergebnis scheint die Ratte gegenüber der Kanzerogenität von Dieselruß, und damit gegenüber GBS überhaupt, wesentlich weniger empfindlich zu sein als der Mensch. Eine Risikoabschätzung aufgrund von Kanzerogenitätsstudien an Ratten für GBS mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 0,09 µm bis 0,2 µm, in die sich auch der Dieselruß einordnen lässt, führte zu einem wesentlich geringeren Risiko (Roller & Pott, 2005). Die Ableitung basiert zunächst auf einer Instillationsstudie mit 19 Stäuben, von denen 16 als GBS eingeordnet wurden. Diese 16 GBS wurden nach Ihrer mittleren Größe in drei Gruppen eingeteilt, zwischen denen sich deutliche Unterschiede in der kanzerogenen Wirkungsstärke ergeben hatten:

- 8 Feinstäube „groß“ (mittl. Durchm. 1,8 – 4 µm) Wirksamkeit Faktor 1
- 4 Feinstäube „klein“ (mittl. Durchm. 0,09 – 0,2 µm) Wirksamkeit Faktor 2
(hierzu zählen auch die zu mehr oder weniger großen Aggregaten verwachsenen Primärpartikeln aus den elementaren Kohlenstoffkernen von Dieselruß)
- 4 Ultrafeine Stäube (mittl. Durchm. 0,01 – 0,03 µm) Wirksamkeit Faktor 5

Die Endergebnisse wurden mit Ergebnissen aus mehreren chronischen Inhalationsversuchen in Beziehung gesetzt, die nicht unter Bedingungen von Umweltexpositionen über 24 h/Tag und 7 Tage/Woche ablaufen, sondern meist an 5 Tagen pro Woche über eine bestimmte Stundenzahl. Daraus ergab sich eine im Mittel rund fünffach höhere Wirkungsstärke der GBS im Instillationstest im Vergleich zum Inhalationstest, wenn die Lungenstaubdosen am Ende des ersten Versuchsjahres mit den Tumorhäufigkeiten in Beziehung gesetzt wurden. Die stärkere Staubwirkung im Instillationstest erklärt sich daraus, dass etwa zwei Drittel der instillierten Dosis bereits ab einem jugendlichen Alter auf die Lunge einwirken und dann eine lange Zeit für die Induktion von Tumoren zur Verfügung stehen; im Unterschied dazu baut sich im Inhalationsexperiment eine Lungenstaubdosis erst langsam auf. Auf dieser Grundlage wurde das Exzess-Risiko für Lungentumoren für die Ratte nach einer chronischen inhalativen GBS-Exposition über

40 Std/Woche berechnet:

3,0 mg/m ³ GBS-F „groß“	Risiko 1 %
0,3 mg/m ³ GBS-F „klein“	Risiko 0,2 % (gilt unter anderen für Dieselruß)
0,3 mg/m ³ GBS-UF	Risiko 0,5 %

Diese Schätzergebnisse gelten für Stäube mit einer Dichte im Bereich von 2 – 2,5 g/mL.

Vergleich zwischen den Krebsrisiken aus epidemiologischen und tierexperimentellen Studien

Wenn das Tumorrisiko durch Dieselruß bei der Ratte mit dem oben berechneten Exzess-Risiko aus den epidemiologischen Studien verglichen wird, dann reagiert die Ratte bei linearer Umrechnung um mehr als den Faktor zehn schwächer als der Mensch (rechnerisch 1 : 15). Bereits früher wurde auf einer zum Teil anderen Datengrundlage ein ähnlich hoher Unterschied zwischen Ratte und Mensch von 1 zu mehr als 5 festgestellt (UBA, 1999). Die Ursachen der großen Diskrepanz zwischen tierexperimentell und epidemiologisch abgeleiteten Risiko bedürfen dringend einer Klärung.

Eine der Ursachen ist darin zu sehen, dass das im Vergleich zur Ratte hohe Exzess-Risiko, das sich aus den epidemiologischen Dieselstudien ergibt, von den Autoren weitgehend dem Dieselruß zugeschrieben worden ist und zum Teil möglichen Confoundern, allerdings ohne die GBS zu erwähnen. Andererseits dürften die Feinstaubkonzentrationen (Grenzwert früher 6 mg/m³, jetzt 3 mg/m³) an den Diesel-Arbeitsplätzen in der Regel deutlich höher als die Dieselruß-Konzentrationen gewesen sein (Grenzwert 0,3 mg). Sie würden die scheinbar viel höhere Empfindlichkeit des Menschen gegenüber Dieselruß im Vergleich zur Ratte zumindest zum Teil plausibel erklären; dabei wäre auch das Faktum zu berücksichtigen, dass Dieselruß durch seine im Mittel kleineren Partikeldurchmesser („kleine feine GBS“) eine stärkere Wirkung aufweist als die größeren Partikel im Gesamtfeinstaub, die in der Regel den überwiegenden Massenanteil besetzen. Die epidemiologischen Dieselstudien sollten daher unter Berücksichtigung der tierexperimentellen Ergebnisse neu bewertet werden. Die bisherige Vernachlässigung der GBS ist einerseits verständlich, weil sie außer Dieselruß bisher von keinem Gremium als im Tierversuch krebszeugend anerkannt wurden, und weil beim Dieselruß den am Kohlenstoffkern adsorbierten anorganischen Stoffen häufig ein relevanter Wirkungsanteil zugesprochen wurde. Diese Ansichten werden jedoch dem Kenntnisstand nicht gerecht.

Epidemiologische Studien über andere nicht als spezifisch toxisch geltende Stäube können hier nicht diskutiert werden. Es sei nur darauf hingewiesen, dass Daten über die Kanzerogenität von Kohlengrubenstaub weniger konsistent sind als die Dieselstudien, aber einzelne Studien zeigen ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko von Kohlengrubenbergleuten, wobei eine Quarzwirkung beteiligt sein kann (Hoffmann & Jöckel, 2005). In Fall-Kontrollstudien wurde ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko durchgängig beobachtet; dieser Untersuchungstyp wird weniger durch Selektionseffekte verfälscht als die retrospektiven Kohortenstudien.

Die Diskussion über das Krebsrisiko durch Feinstäube in deutschen Städten, die nach Einführung des EU-Grenzwerts und der Grenzwertüberschreitungen im Frühjahr 2005 stattfand, zeigte erneut die Diskrepanz zwischen dem hohen epidemiologisch und dem deutlich niedrigeren, toxikologisch abgeleiteten Lungenkrebsrisiko durch Dieselruß oder

$\text{PM}_{2,5}$. Wichmann (2004) errechnete aufgrund der ganz ungewöhnlich umfangreichen epidemiologischen Studie von Pope et al. (2002), in der Daten von etwa 500.000 erwachsenen Personen mit Luftverunreinigungen in Beziehung gesetzt wurden, dass durch die Einführung von Dieselrußfiltern und eine dadurch verursachte Senkung der Konzentration von $\text{PM}_{2,5}$ um $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ langfristig ein Vermeidungspotential von 1.680 Lungenkrebsfällen pro Jahr in Deutschland erreicht werden kann. Wichmann setzt dabei Dieselruß gleich mit $\text{PM}_{2,5}$.

Daraufhin berechnete Roller (2005) das Lungenkrebsrisiko durch Luftverunreinigungen unter Bezug auf Luftkonzentrationen an Messstellen des Landes Nordrhein-Westfalen im Jahre 2003, und zwar großenteils auf der Grundlage von Risikoabschätzungen, die in einer Arbeitsgruppe des Länderausschusses für Immissionsschutz durchgeführt wurden (LAI, 1992, 1993). Die Abschätzungen erfolgten über die sog. *Unit risks* 1. Daraus ergab sich, dass die Summe der acht „klassischen“ kanzerogenen Stoffe, die (außer Benzol) mit der Messung von $\text{PM}_{2,5}$ erfasst werden, nicht annähernd zu einer Risikohöhe von 1.680 Lungenkrebstodesfällen pro Jahr führen, die aufgrund der epidemiologischen Daten aus den USA von Wichmann für die Konzentration von $3 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{ PM}_{2,5}$ berechnet wurde. Die folgende Abbildung und die daran anschließenden Erläuterungen veranschaulichen die Verhältnisse beispielhaft an einem Szenario, das mit den Luftkonzentrationen an einer relativ hoch belasteten Messstation entwickelt wurde.

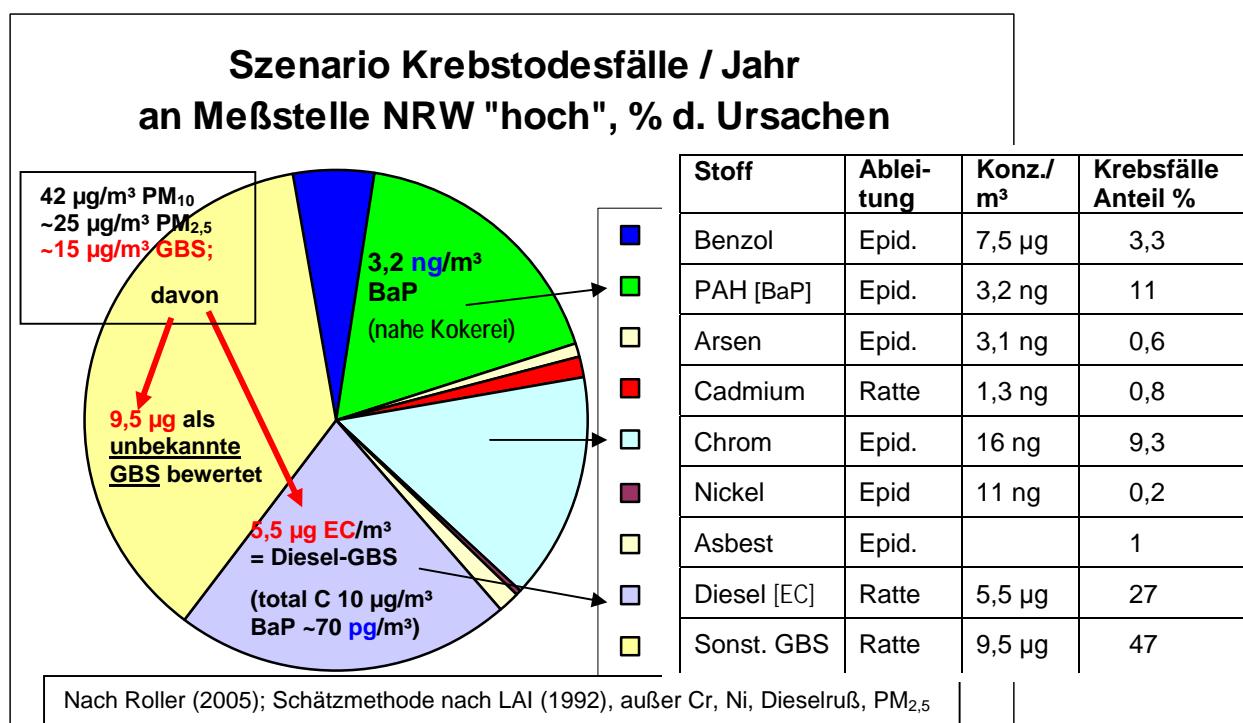


Abbildung 5: Szenario über den prozentualen Anteil der einzelnen kanzerogenen Stoffe in der Außenluft an der aus den Unit risks berechneten Gesamtzahl der Krebstodesfälle nach

1 Das Unit risk ist die aus epidemiologischen oder tierexperimentellen Studienergebnissen berechnete Anzahl der Krebsfälle nach dem Szenario einer über Jahrzehnte (fiktiv lebenslang) permanent erfolgter Exposition gegenüber einem Mittelwert von $1 \mu\text{g}$ des betreffenden Stoffes pro m^3 Luft. Ein Unit risk von 1×10^{-5} bedeutet 1 Krebsfall von 100.000 in gleicher Weise Exponierten.

lebenslanger Exposition. Beispiel für eine Messstelle in NRW mit hoher Schadstoffbelastung, die 2003 gemessen wurde.

Datenbasis und Vorgehensweise bei den Berechnungen für das Diagramm:

1. Schätzung des Krebsrisikos nach Roller (2005) für fünf „LAI-Kanzerogene“ (Benzol, PAH, Arsen, Cadmium, Asbest) sowie für Chrom und Nickel aufgrund epidemiologischer Daten, außer für Cadmium. Abweichend von LAI (1992) wurde Dieselruß jetzt mit einem Unit risk von 5×10^{-5} pro $\mu\text{g}/\text{m}^3$ etwas schwächer bewertet als 1992 mit 7×10^{-5} pro $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Die Änderung hat zwei Ursachen, die sich in gegensätzliche Richtungen auswirken: Da der biobeständige Anteil des Dieselrusses praktisch allein die Ursache der kanzerogenen Wirkung in der Rattenlunge darstellt, wurde das Unit risk allein auf den elementaren Kohlenstoffkern der Dieselrusspartikeln (EC) bezogen; damit entfiel der variable Kohlenstoffanteil aus organischen Verbindungen, und das Unit risk stieg auf 10×10^{-5} (Pott et al. in LAI, 1993). Inzwischen hat sich jedoch in Inhalations- und Instillationsexperimenten gezeigt, dass Dieselruß im Vergleich mit ultrafeinem Industrieruß etwa um den Faktor zwei schwächer kanzerogen war. Durch die wahrscheinlich großenteils – zumindest in der Lebenszeit der Ratte – beständige Verbindung der kugelförmigen Primärpartikeln von etwa 0,01 bis 0,05 μm Durchmesser zu Ketten mit räumlichen Verzweigungen (Klingenbergs et al., 1991) ist nativer Dieselruß nicht mehr als Ultrafeinstaub anzusehen, sondern schwerpunktmäßig in die Größenklasse der „kleinen feinen GBS“ einzuordnen (Pott & Roller, 2003; Roller & Pott, 2005). Damit wurde bei der Risikoschätzung für Dieselruß in dem Kreisdiagramm – im Unterschied zu Roller (2005) – *ein Unit risk von 5×10^{-5}* zugrunde gelegt. Die Konzentrationen von 6 der 8 kanzerogenen Stoffe (ohne Benzol u. Dieselruß) liegen unter $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, sie sind also gravimetrisch ohne Bedeutung. Bemerkenswert ist auch der im Verhältnis zur gesamten Konzentration an Benzo[a]pyren (BaP) minimale Anteil, der im nativen Dieselruß zu erwarten ist; dabei wurde ein BaP-Gehalt von 12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Dieselruß eingesetzt; das ist dreimal so viel wie in den Inhalationsversuchen gemessen wurde.
2. Für $\text{PM}_{2,5}$ wurde aufgrund des Messwerts von $42 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{PM}_{10}$ von folgenden Annahmen ausgegangen:
 - $42 \mu\text{g PM}_{10}/\text{m}^3$ enthalten $25 \mu\text{g PM}_{2,5}/\text{m}^3$, davon $15 \mu\text{g}$ schwerlöslich; sie sind in dem Diagramm als GBS „klein fein“ bewertet und weiter unterteilt in:
 - $5,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ als EC gemessen und Dieselruß zugeordnet;
 - $9,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ als nicht identifizierte GBS der Größe „klein fein“ bewertet. Damit ist das Risiko in den Fällen überschätzt, in denen die schwächere kanzerogene Potenz des Anteils an „großen feinen“ GBS in $\text{PM}_{2,5}$ nicht durch die stärkere Potenz der darin enthaltenen GBS-UF aufgewogen wird.
3. Insgesamt ergeben sich aus dem angenommenen Szenario *128 Krebstodesfälle pro Jahr von 100.000 Todesfällen*, die lebenslang wie an der Messstelle „hoch“ exponiert waren, das sind 1,3 von 1.000.

Für einen Vergleich dieses Ergebnisses mit dem von Wichmann (2004) lassen sich die Lungenkrebstodesfälle nach einer lebenslangen Exposition gegenüber $25 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{PM}_{2,5}$ (von Wichmann mit Dieselruß gleich gesetzt) folgendermaßen errechnen: Von 80 Mio. wurden 1.680 Fälle je $3 \mu\text{g PM}_{2,5}/\text{m}^3$ und Jahr angegeben; das ergibt bei $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 14.000 pro Jahr, in 80 Jahren 1.120.000 Fälle von 80 Mio. Das sind 1.400 von 100.000

oder 14 von 1.000.

Drei unterschiedliche Positionen der Risikobeurteilung, Risikoakzeptanzproblematik

Demnach lassen sich bezüglich der Beurteilung des Lungenkrebsrisikos durch GBS gegenwärtig drei Positionen unterscheiden, die erheblich voneinander abweichen:

1. Aufgrund umfangreicher epidemiologischer Studien an einer besonders hohen Personenzahl besteht ein durch PM_{2,5} oder Dieselruß verursachtes Lungenkrebsrisiko in der Allgemeinbevölkerung wie durch Wichmann berechnet.
2. Auf der Basis von Versuchen an Ratten mit Extrapolation zum Nullpunkt ohne Wirkungsschwelle besteht für Dieselruß (elementarer Kohlenstoffkern „EC“ = GBS) ein um den Faktor von rund 10 niedrigeres Risiko für die Allgemeinbevölkerung als von Wichmann berechnet.
3. Bei Einhaltung des MAK-Wertes für nicht spezifisch toxischen Feinstaub (gilt nicht für Ultrafeinstaub) besteht für die Beschäftigten bisher kein als nennenswert erkannter Beitrag zum Krebsrisiko außer durch Dieselmotoremissionen, die seit 1987 als im Tierversuch *eindeutig krebserzeugend* eingestuft sind.

Aufgrund des Kenntnisstandes über die Wirkungsmechanismen zur Tumorentstehung durch GBS lässt sich gegenwärtig nicht nachweisen, dass das Krebsrisiko für Ratten bei Einhaltung des Allgemeinen Staubgrenzwertes erheblich weniger als 1 % betragen würde. Bereits der sich aus dem neuen Experiment ergebende Hinweis auf einen zusätzlichen Faktor als Tumorursache neben der chronischen Entzündung spricht gegen die Vermutung einer Wirkungsschwelle im arbeitsmedizinisch relevanten Bereich. Ein Berufskrebsrisiko von 1 % wäre ohnehin nicht zumutbar, denn als tolerables Berufskrebsrisiko wird in Deutschland eine Häufigkeit von maximal 1 zu 1.000 diskutiert (Arndt 2004; Woitowitz 2004). In den USA ist dieser Wert etabliert, denn für die amerikanische Arbeitsschutzbehörde (OSHA, 1997) ist nach einer Begründung des Obersten Gerichtshofs (Supreme Court) ein Risiko von 1 : 1000 *clearly significant*. "The Supreme Court has noted that a reasonable person would consider a fatality risk of 1/1000 to be a significant risk, and would consider a risk of one in one billion to be insignificant. So a risk of 1/1000 (10(-3)) represents the uppermost end of a million-fold range suggested by the Supreme Court, somewhere below which the boundary of acceptable versus unacceptable risk must fall." Der fehlende Beweis einer tumorerzeugenden Wirkung in der mit Kohlenstaub behandelten Versuchsgruppe des in diesem Bericht beschriebenen Projekts ist daher noch weit entfernt vom Nachweis der Unterschreitung eines Krebsrisikos von 1 : 1.000.

Neumann et al. (1997) bezeichneten ein Berufskrebsrisiko durch Styrol mit gentoxischem Wirkungsmechanismus von kleiner als 1 : 10.000 als „sehr gering“. Diese Formulierung entspricht den Gebrauchsinformationen für die Anwendung von Arzneimitteln in den letzten Jahren, in denen die Häufigkeiten unerwünschter Nebenwirkungen mit „sehr selten“ angegeben werden, wenn sie bei weniger als 1 von 10.000 Behandelten auftreten. Diese Häufigkeit ist aber immerhin noch „nennenswert“. In der gleichen Veröffentlichung wird vorgeschlagen, für kanzerogene Stoffe Grenzwerte für die Expositionen einzuführen, bei deren Einhaltung diese Stoffe „keinen nennenswerten Beitrag zum Krebsrisiko beim Menschen leisten“. Das angegebene Beispiel Styrol mit

einem verbleibenden Krebsrisiko von weniger als 1 zu 10.000 müsste folgerichtig die Definition für einen „nicht nennenswerten Beitrag zum Krebsrisiko“ bedeuten. Bezuglich des Wirkungsmechanismus wird zwar zwischen gentoxischen und nicht gentoxischen Stoffen unterschieden. Dies dürfte aber keinen Einfluss auf die Definition des von der DFG-Kommission als „nicht nennenswert“ bezeichneten Krebsrisikos haben. Das bedeutet, auch bei der Vermutung einer Wirkungsschwelle muss zunächst einmal nachgewiesen werden können, dass diese Schwelle ein höheres Risiko als 1 zu 10.000 oder zumindest höher als 1 zu 1.000 unwahrscheinlich macht. Das bedeutet weiterhin, dass die Entscheidungskriterien für einen *nicht beobachtbaren Effekt* auch eine entsprechende Genauigkeit aufweisen müssen, denn ein *statistisch nicht nachgewiesener Effekt* kann bei epidemiologischen oder tierexperimentellen Kanzerogenitätsstudien bei der üblichen geringen statistischen Power bis zu etwa 10 % betragen. Solange es keine zuverlässigen Wirkungskriterien gibt, die um den Faktor 100 empfindlicher sind als die genannten Studien, sollte linear extrapoliert werden. Diese Feststellung ist für Abschätzungen von Krebsrisiken im Umweltbereich von großer Bedeutung. Bei histopathologisch nicht nachweisbaren Reaktionen der Lunge auf eine GBS-Exposition, die weit unterhalb eines Krankheitswertes liegen, lässt sich nicht schließen, dass ein Lungentumor durch eine chronische Wirkung dieser Abläufe seltener auftritt als bei einem von 1.000 solcher Fälle.

Notwendige Voraussetzung für ähnliche Krebsrisiken von Mensch und Ratte: Erhebliche Unterschiede zwischen den Wirkungsmechanismen

Im übrigen ist im Hinblick auf einen Vergleich von Krebsrisiken von Ratte und Mensch festzuhalten, dass es kein Naturgesetz gibt, nach dem bei der Ratte nach äquivalenter Exposition pro Woche gegenüber einem krebserzeugenden Stoff in der kurzen mittleren Lebenszeit von weniger als 2½ Jahren ungefähr die gleiche Tumorhäufigkeit zu erwarten ist wie beim Menschen. Die Vorstellung, man könne Dosis-Wirkungsbeziehungen von der Ratte durch Kenntnisse des Wirkungsmechanismus zuverlässig auf den Menschen übertragen, ist eine Illusion, weil die komplexen Zusammenhänge durch die vielen an der Krebsentstehung genetisch festgelegten Faktoren bei weitem nicht bekannt sind (Simons, 1995). Dieses entscheidende Hemmnis wird bei den verständlicherweise immer wieder erfolgten Bemühungen um solche quantitativen Extrapolationen in der Regel ausgeblendet. *Zwingend notwendige Voraussetzung für ähnliche Krebsrisiken sind quantitativ erhebliche Unterschiede zwischen den Wirkungsmechanismen von Mensch und Ratte.* Durch die erheblich größere Zellzahl in der Menschenlunge und die längere Überlebenszeit wäre ein um Zehnerpotenzen größeres Mutationsrisiko zu erwarten, wenn es nicht „irgendwie“ ausgeglichen würde. *Nur auf diese Weise ist ein ähnliches Krebsrisiko in den unterschiedlichen Lebenszeiten von Ratte und Mensch erkläbar.* Um mit dem Krebsrisiko der jeweils anderen Spezies nach äquivalenter Exposition gleich ziehen zu können, muss es bei der Ratte im Verhältnis zu den Abläufen beim Menschen „Kanzerogenitätsbeschleuniger“ und beim Menschen im Verhältnis zur Ratte „Kanzerogenitätsbremsen“ geben, wie immer diese im einzelnen auch aussehen mögen.

Krebsrisiken durch GBS im Umweltbereich aufgrund der Studien an Ratten, umgerechnet auf inhalative Exposition – Kurzfassung

Da keine zuverlässige Ableitung für eine Wirkungsschwelle aufgrund von Kenntnissen des Wirkungsmechanismus vorliegt oder eine Konzentration nicht anderweitig

zuverlässig abgeschätzt werden kann, bei der ein sozialpolitisch tolerables Risiko unterschritten wird, wird – unabhängig von den zitierten epidemiologischen Daten – das Risiko für die Umweltexposition durch GBS, wie bereits für **Abbildung 5** angewendet, durch lineare Interpolation berechnet. (Bei der Übertragung von Lungentumorhäufigkeiten der Rattenlunge auf den Menschen ist es üblich, beim Menschen von Krebstodesfällen auszugehen, obwohl Ratten in der Regel nur in den hohen Dosisgruppen an ihrem Lungentumor sterben). Nach Csiscaky et al. (1993) ergibt sich folgende Beziehung zwischen dem Unit risk in der Umwelt und dem spezifischen Risiko unter den Bedingungen einer Exposition am Arbeitsplatz: *Spezifisches Arbeitsplatzrisiko x 6 = Unit risk.*

Mit dieser Formel lassen sich die Lungenkrebsrisiken nach einer permanenten Exposition gegenüber z.B. 10 µg GBS/m³ Luft für die verschiedenen Partikelgrößen im Umweltbereich berechnen. Daraus ergeben sich

- 2 Krebsfälle pro 10.000 Exponierte durch die großen feinen GBS,
- 5 Krebsfälle pro 10.000 Exponierte durch die kleinen feinen GBS,
- 10 Krebsfälle pro 10.000 Exponierte durch die ultrafeinen GBS.

Repräsentative Messdaten über die Partikelgrößenverteilung an den verschiedenen Messstellen liegen nicht vor.

7. Anhang Tabellen

Tabelle 7.1: Kenndaten^a des Kohlen- und Quarzstaubs (aus Pott und Roller, 2002)

Stoff, Bezeichnung	Herkunft, Liefertermin	Korngröße ^b [µm]			Part.zahl / mg ^c x 10 ⁹	Dichte [g/mL]	Spez. Oberfl. (BET) [m ² /g]	Quarz [%]	Asche [%]
		10 % <	50 % <	90 % <					
Kohle, gemahlene Magerkohle	Niederrhein.Berg werks-AG ^d	1,6	4,0	7,6	0,27	1,4	4,1 ^e 1,50 ^f	< 0,1	5,1
Quarz, Dörentrup Mahl. Nr. 12	Hauptstelle ^g 1966/67	0,6	1,1	2,3	3,6	2,6	8,8 ^e 3,10 ^f	99,1	

^a Staubkenndaten 1998 von Herrn Dr. Armbruster, Deutsche Montan Technologie GmbH, Geschäftsbereich Pro Tec, Essen.

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

^c Durch Rückrechnung aus der Korngrößenverteilung ermittelt, keine direkten Messdaten.

^d Über Dr. Weller, Silikose-Forschungsinstitut der Bergbau-BG, Bochum; ca. 1970; Staub auch im Intraperitonealtest an Ratten und in Inhalationsversuchen an Rhesus-Affen angewendet (Weller, 1977).

^e Mitteilung von K.-P. Eickhoff, Gesellschaft für Oberflächen- und Festkörperuntersuchung mbH (o.f.u.), Hamburg, an die BAuA, Mai 2001. Dieser Wert wurde für weitere Berechnungen verwendet.

^f Spezifische Oberfläche, berechnet aus dem Partikelvolumen, das sich aus der Partikelgrößenverteilung ergibt, und zwar unter der Annahme einer Kugeloberfläche (s. Fußnote^b).

^g Hauptstelle für Staub- und Silikosebekämpfung des Steinkohlenbergbauvereins, Essen, Weitere Informationen zu der verwendeten Quarzstaubprobe (Pott und Roller, 2002):

Quarzstaub wurde mit der Kurzbezeichnung DQ 12 in zahlreichen Tier- und Zellversuchen auf seine biologischen Wirkungen geprüft. Im Folgenden werden zusätzlich zu den Angaben in der **Tabelle 7.1** weitere physikalisch-chemische Eigenschaften beschrieben. Über die Herkunft von den Dörentruper Sand- und Tonwerken GmbH in Dörentrup, Westfalen, und über die Aufbereitung berichtet Robock (1973). Die offizielle Kurzbezeichnung ist DQ 12 < 5 µm. Details werden jedoch nicht beschrieben. Offenbar gab es zahlreiche Säcke mit Quarz aus der nicht näher bekannten Mahlung Nr. 12 mit Korngrößen < 60 µm. Daraus wurde durch Windsichtung mit einem Gerät der Walther-Staubtechnik, Köln, eine Fraktion < 5 µm hergestellt.

Insofern ist anzunehmen, dass es mehrere Chargen gab bzw. gibt, die sich insbesondere in ihrer Größenverteilung etwas unterscheiden. Die in den Experimenten Pott im Medizinischen Institut für Umwelthygiene Düsseldorf verwendete DQ 12-Probe stammt aus einem Vorrat, der Ende 1966 oder Anfang 1967 von Herrn Dr. Leiteritz, Hauptstelle für Staub- und Silikosebekämpfung des Steinkohlenbergbauvereins, Essen, aus dem Sack Nr. 17 zur Verfügung gestellt wurde. Sie wurde als 6. Lieferung Nr. 6 genannt und in Veröffentlichungen mitunter so bezeichnet.

Dieser Quarzstaub Nr. 6 wurde von Nolan et al. (1989) unter anderem elektronenmikroskopisch hinsichtlich seiner Partikelgrößenverteilung untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte: 76,3 % < 1 µm, 23,4 % 1,1-3,0 µm, 0,2 % 3,1-5,0 µm, 0,1 % 5,1-10,0 µm. Diese Daten passen zu der Partikelgrößenverteilung, die von Robock (1973) generell für DQ 12 durch eine Kurve angegeben wurde, deren relatives Maximum bei 0,8 µm liegt. Für die spezifische Oberfläche wurden mit der BET-Methode folgende Ergebnisse ermittelt: 7,4 m²/g (Robock, 1973); 7,9 m²/g für eine Charge von 1961 (Leiteritz, pers. Mitteilung an F. Pott, 1970); unsere Probe 9,4 m²/g (Messergebnis im Fraunhofer-Institut für Toxikologie, Hannover, s. Pott et al., 1994b) und 8,8 m²/g (Eickhoff, 2001). Im Unterschied zur BET-Oberfläche berechnete Armbruster eine Oberfläche von 3,1 m²/g aus dem Partikelvolumen, das sich aus der Partikelgrößenverteilung unter der Annahme einer Kugeloberfläche ergibt (**Tabelle 7.1**). Klosterkötter und Leiteritz (1969) geben für Dörentruper Quarz außerdem an: Kristalliner SiO₂-Anteil 84 Gew.-% (röntgenographisch), 89 Gew.-% (ultraspektroskopisch), Al₂O₃ 0,004 %, TiO₂ 0,05 %, Na₂O 0,006 %, S 0,08 %; Gewichtsverlust bei 800 °C 0,73 %. Nach Robock (1973) liegt der kristalline Anteil bei 87 % (Methode nicht angegeben), der Rest besteht aus amorpher SiO₂ mit geringer Kontamination von Kaolinit.

Tabelle 7.2: Kenndaten des geprüften Rußes und des amorphen SiO₂.

Stoff, Bezeichnung	Mittlere Größe ^a der Primärteilchen [µm]	Dichte [g/mL]	Spezif. Oberfl. (BET) [m ² /g]	Hersteller	Literatur
Ruß-UF, Furnaceruß Printex®-90 ^b	0,014 „Struktur“ mittel ^c	1,8 - 1,9 (MW 1,85)	300 ^d	Degussa	Degussa, 1983(a), 1991, 1994
Amorphes SiO ₂ , hochdisperse pyrogene Kieselsäure; fumed silica; AEROSIL® 150 („AEROSIL“ = Verfahren, kein Stoff)	0,014	2,2 Oberfläche kugelförmig, glatt und porenlös	150 ± 14	Degussa	Degussa, 1983(b), 1984, 1985

^aBei Degussa-Stäuben Berechnung des arithmetischen Mittelwerts nach Bestimmung der Durchmesser von 3.000 – 6.000 Teilchen über elektronenmikroskopische Aufnahmen (Degussa, 1983); zum Teil abweichende Angaben in verschiedenen Veröffentlichungen.

^bAnwendung: Gut dispergierbares Pigment für tiefschwarze Einfärbung von Kunststoffen.

^cDBP-Adsorption 95 mL/100 g. Morphologisch machen die Aggregate die sog. Struktur aus. Bei den gebräuchlichen Meßmethoden beeinflussen aber auch die Agglomerate und die Oberflächeneigenschaften das Ergebnis.

^dAndere Ergebnisse: 230 m²/g (Heinrich et al., 1994), 270 m²/g (Pott et al., 1994), 337 m²/g (Eickhoff, 2001).

Tabelle 7.3: Idealstäube und untersuchte Stäube mit einigen ihrer physikalischen Kenndaten:

Links: Daten von fünf *Idealstäuben* (einheitliche Partikelgröße, kugelförmig, glatt, Dichte 1 g/mL) mit Teilchendurchmessern absteigend von 2 bis 0,02 µm und den daraus berechneten Partikelzahlen pro mg und spezifischen Partiktoberflächen.

Rechts: Die untersuchten vier Stäube

„Ideal“ Stäube ^a			Die untersuchten Stäube						
Part.-durch-mess. [µm]	Spezif. Partikelzahl [10 ⁹ /mg]	Spezif. Oberfläche [m ² /g]	Staub	Spezif. Part.-zahl [10 ⁹ /mg]	Mittl. Part. durchm. [µm]	Spezif. Oberfl. (BET) [m ² /g]	Dichte [g/mL]	Spezif. Vol. [µL/mg]	
<i>Durchmesser von Feinstäuben</i>									
2	0,24	3,0	Magerkohle →	0,27	4,0		4,1	1,4	0,71
1	1,9	6,0	Quarz →	3,6	1,1		8,8	2,6	0,38
0,2	240	30							
<i>Durchmesser von Ultrafeinstäuben^b</i>									
0,1	1.900	60							
0,02	240.000	300	Furnaceruß Pr. 90	0,014	300	1,85	0,54		
			Amorphes SiO ₂	0,014	150	2,2	0,45		

^a Für einen *Idealstaub*, der aus Kugeln mit glatter Oberfläche und gleicher Größe mit der Dichte 1 besteht, kann das Verhältnis zwischen Durchmesser, spezifischer Oberfläche und Anzahl der Kugeln pro Masseneinheit folgendermaßen allgemein beschrieben werden: Wenn der Durchmesser um den Faktor 2 kleiner wird, vergrößert sich die Oberfläche mit dem Faktor 2, und die Teilchenzahl steigt mit dem Faktor 2³.

^b Formale Definition: Durchmesser < 0,1 µm; für die biologische Wirkung gibt es keine Schwelle.

Tabelle 7.4: Behandlungsgruppen 9-Monatsversuch (ITEM Prüfung 05N99524)

Gruppe	Behandlung intratracheale Instillation PVNO s.c.	Dosierung (Anzahl Instill. x mg), Zeit zwischen den Behandlungen	Tiere/Gruppe	Tiernummern
A02	Kontrolle, Trägerflüssigkeit i.tr.*	10 x 0,3 ml, 28-tägig	28 (+13)	020001-020041
B04	Quarz DQ 12 i.tr.	1 x 3 mg	28 (+13)	040001-040041
C06	Quarz DQ 12 i.tr. + PVNO (Brockhaus) s.c.	1 x 3 mg/ 3 x 20 mg** im Abst. von 4 Monaten	28 (+ 13)	060001-060041
D08	Aerosil® 150 (0,014 µm) i.tr.	20 x 0,5 mg 14 tägig	28 (+ 13)	080001-080041
E10	Printex®-90-Ruß i.tr.	10 x 0,5 mg wöchentlich	28 (+ 13)	100001-100041
F12	Kohlenstaub i.tr.	10 x 1 mg, wöchentlich	28 (+ 13)	120001-120041

Tabelle 7.5: Behandlungsgruppen 30 Monatsversuch (ITEM Prüfung 05N99525)

Gruppe	Behandlung intratracheale Instillation PVNO s.c.	Dosierung (Anzahl Instill. x mg), Zeit zwischen den Behandlungen	Tiere/ Gruppe	Tiernummern
A02	Kontrolle, Trägerflüssigkeit i.tr.*	10 x 0,3 ml, 7 Tage	64	020001-020064
B04	Quarz DQ 12 i.tr.	1 x 3 mg	64	040001-040064
C06	Quarz DQ 12 i.tr. + PVNO (Brockhaus) s.c.**	1 x 3 mg Quarz 7 * 20 mg PVNO 4 Monate.	64	060001-060064
D08	amorphes SiO ₂ (Aerosil® 150) (0,014 µm) i.tr.	30 x 0,5 mg 14 Tage	64	080001-080064
E10	Printex®-90 Ruß i.tr. (0,014 µm)	10 x 0,5 mg 7 Tage	64	100001-100064
F12	Kohlenstaub i.tr. (1-2 µm)	10 x 1 mg, 7 Tage	64	120001-120064

* 0,9 % NaCl-Lösung, bei Ruß und Kohlenstaub Zusatz von 0,5 % Tween® 80 als Detergens

** als 2 %-ige PVNO-Lösung in 0,9 % NaCl-Lösung*, Quarz und Aerosil® ohne Detergens
 Reservetiere in Klammern

Tabelle 7.6: Lebenszeiten der Einzeltiere im Versuch

Gruppe A	Tier-Nr.	+: gest. -: getö- tet	Vers.-zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>	Block- zahl / Lunge	Block- zahl Rest	Lunge einfach	Lungen- stufen	Sirius- rot	Leer- schnitt e
A02	0048	-	36		6	1	0	0	0	0
A02	0038	-	37		6	2	0	0	0	0
A02	0058		39							
A02	0004	+	52	1 56	6	1	0	0	0	0
A02	0040	-	78	2 55	6	1	0	0	0	0
A02	0009	-	79	3 54	6	2	0	0	0	0
A02	0002	-	82	4 53	6	1	0	0	0	0
A02	0008	-	82	5 52	6	1	0	0	0	0
A02	0012	-	82	6 51	6	2	0	0	0	0
A02	0024	-	82	7 50	6	2	0	0	0	0
A02	0056	-	82	8 49	6	1	0	0	0	0
A02	0006	-	83	9 48	6	1	0	0	0	0
A02	0047	-	84	10 47	6	2	0	0	0	0
A02	0062	-	84	11 46	6	1	0	0	0	0
A02	0028	-	87	12 45	6	2	0	0	0	0
A02	0043	-	88	13 44	6	1	0	0	0	0
A02	0053	-	88	14 43	6	1	0	0	0	0
A02	0061	-	89	15 42	6	1	0	0	0	0
A02	0063	-	89	16 41	6	2	0	0	0	0
A02	0035	-	90	17 40	6	2	0	0	0	0
A02	0027	-	92	18 39	6	1	0	0	0	0
A02	0044	-	92	19 38	6	2	0	0	0	0
A02	0064	-	93	20 37	6	1	0	0	0	0
A02	0039	-	95	21 36	6	2	0	0	0	0
A02	0003	-	97	22 35	6	2	0	0	0	0
A02	0025	-	97	23 34	6	2	0	0	0	0
A02	0046	-	100	24 33	6	3	0	0	0	0
A02	0052	-	100	25 32	6	2	0	0	0	0
A02	0030	+	103	26 31	6	2	0	0	0	0
A02	0034	-	104	27 30	6	2	0	0	0	0
A02	0050	-	105	28 29	6	1	0		0	
A02	0060	-	109	29 28	6	2	0	0	0	0
A02	0007	-	109	30 27	6	1	0	60	0	18
A02	0014	-	110	31 26	6	2	0	60	0	18
A02	0041	-	110	32 25	6	2	0		0	
A02	0029	-	113	33 24	6	2	0	60	0	18
A02	0026	-	115	34 23	6	2	0	60	0	18
A02	0057	-	115	35 22	6	2	0	0	0	0
A02	0054	-	115	36 21	6	1	0	80	0	0
A02	0010	-	118	37 20	6	2	0	60	0	18
A02	0018	-	120	38 19	6	2	7	0	2	1+5

Gruppe A	Tier-Nr.	+: -: gest. getö- tet	Vers.- zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>		Block- zahl / Lunge	Block- zahl Rest	Lunge einfach	Lungen- stufen	Sirius- rot	Leer- schnitt e
A02	0042	-	120	39	18	6	3	7	0	2	1+5
A02	0031	-	122	40	17	6	1	0		0	
A02	0055	-	122	41	16	6	3	0		0	
A02	0032	-	122	42	15	6	2	7	0	2	1+5
A02	0020	-	123	43	14	6	2	0	73	0	0
A02	0023	-	123	44	13	6	4	7	0	2	1+5
A02	0036	-	123	45	12	6	4	7	0	2	1+5
A02	0051	-	124	46	11	6	4	0		0	
A02	0037	-	124	47	10	6	2	7	0	2	1+5
A02	0045	-	124	48	9	6	2	6	0	2	1+5
A02	0049	-	124	49	8	6	2	6	0	2	1+5
A02	0001	-	125	50	7	6	2	6	0	2	1+5
A02	0011	-	125	51	6	6	1	0	60	0	0
A02	0013	-	125	52	5	6	1	0	81	0	0
A02	0015	-	125	53	4	6	1	0	79	0	0
A02	0016	-	125	54	3	6	2	0	77	0	0
A02	0033	-	125	55	2	6	1	6	0	2	1+5
A02	0059	-	127	56	1	6	2	0	72	0	0
A02	0005	-	64			1	0	1	0	0	0
A02	0017	-	64			1	0	1	0	0	0
A02	0019	-	64			1	0	1	0	0	0
A02	0021	-	64			1	0	1	0	0	0
A02	0022	-	64			1	0	1	0	0	0

Gruppe B	Tier-Nr.	+: gest. -: getöt.	Vers.zeit [Wo]	Ratten at risk	Blockzahl / Lunge	Blockzahl Rest	Lunge einfach	Lungenstufen	Sirius-rot	Leerschnitte
B04	0064									
B04	0049	-	8		3	4	0	0	0	0
B04	0051	-	8		3	4	0	0	0	0
B04	0007	+	40		6	1	0	0	0	0
B04	0035	-	48		6	1	0	0	0	0
B04	0016	-	52	1 54	6	1	0	0	0	0
B04	0013	-	64		0	0	0	0	0	0
B04	0025	-	64		0	0	0	0	0	0
B04	0037	-	64		0	0	0	0	0	0
B04	0042	-	64		0	0	0	0	0	0
B04	0043	-	64		0	0	0	0	0	0
B04	0039	-	65	2 53	6	2	0	0	0	0
B04	0018	-	66	3 52	6	1	0	0	0	0
B04	0044	+	66	4 51	6	1	0	0	0	0
B04	0050	-	67	5 50	6	2	0	0	0	0
B04	0052	-	67	6 49	5	1	0	0	0	0
B04	0055	-	67	7 48	6	3	0	0	0	0
B04	0034	-	71	8 47	6	1	0	0	0	0
B04	0010	-	73	9 46	6	1	0	0	0	0
B04	0041	-	74	10 45	6	1	0	0	0	0
B04	0027	-	81	11 44	6	2	0	0	0	0
B04	0004	-	83	12 43	6	1	0	0	0	0
B04	0021	-	83	13 42	6	1	0	0	0	0
B04	0019	-	87	14 41	6	1	0	0	0	0
B04	0059	-	88	15 40	6	2	0	0	0	0
B04	0061	-	88	16 39	6	2	0	0	0	0
B04	0045	-	89	17 38	6	2	0	0	0	0
B04	0058	-	90	18 37	6	1	0	0	0	0
B04	0057	-	91	19 36	6	2	0	0	0	0
B04	0023	-	92	20 35	6	2	0	0	0	0
B04	0029	-	92	21 34	6	2	0	0	0	0
B04	0014	-	96	22 33	6	2	0	0	0	0
B04	0046	-	96	23 32	6	2	0	0	0	0
B04	0017	-	97	24 31	6	2	0	0	0	0
B04	0056	-	103	25 30	6	2	0	0	0	0
B04	0024	-	104	26 29	6	3	0	0	0	0
B04	0028	-	104	27 28	6	3	0	0	0	0
B04	0001	-	105	28 27	6	2	0	0	0	0
B04	0047	-	108	29 26	6	2	0	0	0	0
B04	0048	-	109	30 25	6	2	0	0	0	0
B04	0036	-	111	31 24	6	1	0	0	0	0
B04	0020	-	113	32 23	6	2	0	0	0	0

Gruppe B	Tier-Nr.	+: gest. -: getöt.	Vers.-zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>	Blockzahl / Lunge	Blockzahl Rest	Lunge einfach	Lungen- stufen	Sirius- rot	Leer- schnitte
B04	0040	-	113	33 22	6	1	0	0	0	0
B04	0062	-	113	34 21	6	3	0	0	0	0
B04	0003	-	115	35 20	6	3	6	0	1	1
B04	0015	-	115	36 19	6	1	7	0	2	1
B04	0002	-	116	37 18	6	2	6	0	2	0
B04	0008	-	116	38 17	6	1	6	0	2	1
B04	0031	-	116	39 16	6	2	0	0	0	0
B04	0063	-	116	40 15	6	2	0	0	0	0
B04	0005	-	118	41 14	6	1	7	0	2	1
B04	0033	-	118	42 13	6	2	0	0	0	0
B04	0026	-	120	43 12	6	2	0	84	0	0
B04	0032	-	120	44 11	6	3	0	76	0	0
B04	0006	-	123	45 10	6	1	7	0	2	1
B04	0009	-	123	46 9	6	1	6	60	0	0
B04	0060	-	123	47 8	6	1	0	78	0	0
B04	0011	-	124	48 7	6	1	7	0	2	1
B04	0012	-	124	49 6	6	3	6	0	1	1
B04	0030	-	124	50 5	6	3	0	78	0	0
B04	0038	-	124	51 4	6	3	0	74	0	0
B04	0022	-	125	52 3	6	2	7	0	2	1
B04	0054	-	126	53 2	6	3	0	81	0	0
B04	0053	-	127	54 1	6	3	6	0	1	1

Gruppe C	Tier-Nr.	+: gest. -: get.	Vers.zeit [Wo]	Ratten at risk		Blockzahl / Lunge	Blockzahl Rest	Lunge einfach	Lungenstufen	Sirius rot	Leerschnitt e
C06	0064										
C06	0024	+	14			6	1	0	0	0	0
C06	0019	-	35			5	1	0	0	0	0
C06	0023	-	53	1	56	5	1	0	0	0	0
C06	0047	-	57	2	55	5	1	0	0	0	0
C06	0010	-	64	-	-	0	0	0	0	0	0
C06	0017	-	64	-	-	0	0	0	0	0	0
C06	0034	-	64	-	-	0	0	0	0	0	0
C06	0038	-	64	-	-	0	0	0	0	0	0
C06	0051	-	64	-	-	0	0	0	0	0	0
C06	0041	-	65	3	54	5	1	0	0	0	0
C06	0050	-	81	4	53	6	2	0	0	0	0
C06	0056	-	81	5	52	6	2	0	0	0	0
C06	0046	-	82	6	51	6	2	0	0	0	0
C06	0036	-	84	7	50	6	1	0	0	0	0
C06	0029	-	87	8	49	6	2	0	0	0	0
C06	0021	-	88	9	48	6	2	0	0	0	0
C06	0013	-	89	10	47	6	1	0	0	0	0
C06	0025	-	89	11	46	6	1	0	0	0	0
C06	0018	-	91	12	45	6	2	0	0	0	0
C06	0061	+	92	13	44	6	2	0	0	0	0
C06	0033	-	93	14	43	6	3	0	0	0	0
C06	0045	-	97	15	42	6	2	0	0	0	0
C06	0037	-	98	16	41	6	3	0	0	0	0
C06	0039	-	98	17	40	6	2	0	0	0	0
C06	0030	-	101	18	39	6	1	0	0	0	0
C06	0054	-	103	19	38	6	2	0	0	0	0
C06	0040	-	105	20	37	6	2	6	0	2	1
C06	0002	-	106	21	36	6	2	0	0	0	0
C06	0011	-	106	22	35	6	2	0	0	0	0
C06	0043	+	107	23	34	6	3	0	0	0	0
C06	0032	-	108	24	33	6	2	0	0	0	0
C06	0049	-	108	25	32	6	2	0	0	0	0
C06	0057	-	108	26	31	6	2	0	0	0	0
C06	0003	-	110	27	30	6	2	0	0	0	0
C06	0035	-	110	28	29	6	2	0	0	0	0
C06	0058	+	110	29	28	6	2	0	0	0	0
C06	0053	-	115	30	27	6	1	0	0	0	0
C06	0020	-	116	31	26	6	2	0	0	0	0
C06	0060	-	118	32	25	6	2	0	0	0	0
C06	0014	-	120	33	24	6	1	6	0	2	1
C06	0015	+	121	34	23	6	2	0	0	0	0
C06	0044	+	121	35	22	6	1	0	0	0	0

Gruppe C	Tier-Nr.	+: gest. -: get.	Vers.-zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>		Blockzahl / Lunge	Blockzahl Rest	Lunge einfach	Lungenstufen	Sirius rot	Leerschnitt e
C06	0004	-	123	36	21	6	1	6	0	2	1
C06	0007	-	123	37	20	6	2	6	0	2	1
C06	0009	-	123	38	19	6	1	0	67	0	0
C06	0016	-	123	39	18	6	1	6	0	2	1
C06	0001	-	124	40	17	6	4	0	78	0	0
C06	0008	-	124	41	16	6	2	0	78	0	0
C06	0022	-	124	42	15	6	1	0	0	0	0
C06	0026	-	124	43	14	6	1	6	0	2	1
C06	0031	-	124	44	13	6	4	6	0	2	0
C06	0048	-	124	45	12	6	2	0	0	0	0
C06	0005	-	125	46	11	6	2	6	0	2	1
C06	0006	-	125	47	10	6	2	0	78	0	0
C06	0012	-	125	48	9	6	1	0	78	0	0
C06	0027	-	125	49	8	6	2	6	0	2	1
C06	0028	-	125	50	7	6	1	0	77	0	0
C06	0042	-	125	51	6	6	4	6	0	2	0
C06	0052	-	125	52	5	6	4	0	0	0	0
C06	0062	-	125	53	4	6	3	0	74	0	0
C06	0059	-	127	54	3	6	5	0	0	0	0
C06	0063	-	127	55	2	6	4	0	0	0	0
C06	0055	-	128	56	1	6	1	0	0	0	0

Gruppe D	Tier-Nr.	+: gest. -: getöt.	Vers.-zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>	Block-zahl / Lunge	Block-zahl Rest	Lunge einfach	Lungen-stufen	Sirius rot	Leer-schnitte
D08	0062	-								
D08	0050	-	8		3	4	0	0	0	0
D08	0051	-	8		3	4	0	0	0	0
D08	0020	+	50		6	2	0	0	0	0
D08	0027	+	50		6	1	0	0	0	0
D08	0048	-	50		6	2	0	0	0	0
D08	0002	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
D08	0005	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
D08	0030	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
D08	0032	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
D08	0041	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
D08	0053	-	74	1 53	6	2	0	0	0	0
D08	0024	-	77	2 52	6	2	0	0	0	0
D08	0038	-	79	3 51	6	3	0	0	0	0
D08	0034	-	81	4 50	6	3	0	0	0	0
D08	0054	-	82	5 49	6	2	0	0	0	0
D08	0001	-	84	6 48	6	1	0	0	0	0
D08	0033	+	87	7 47	6	2	0	0	0	0
D08	0013	-	88	8 46	6	3	0	0	0	0
D08	0042	-	91	9 45	6	3	0	0	0	0
D08	0003	-	98	10 44	6	3	0	0	0	0
D08	0016	-	98	11 43	6	3	0	0	0	0
D08	0017	-	98	12 42	6	3	0	0	0	0
D08	0023	-	98	13 41	6	3	0	0	0	0
D08	0031	-	98	14 40	6	2	0	0	0	0
D08	0063	-	101	15 39	6	2	0	0	0	0
D08	0045	-	105	16 38	6	3	0	0	0	0
D08	0021	-	113	17 37	6	2	0	0	0	0
D08	0022	-	113	18 36	6	3	0	0	0	0
D08	0064	-	114	19 35	6	2	0	0	0	0
D08	0056	-	117	20 34	6	4	0	0	0	0
D08	0061	-	117	21 33	6	3	0	0	0	0
D08	0014	-	120	22 32	6	3	0	0	0	0
D08	0037	-	120	23 31	6	4	0	0	0	0
D08	0011	-	121	24 30	6	6	0	0	0	0
D08	0009	-	122	25 29	6	1	6	0	2	1+5
D08	0006	-	123	26 28	6	2	7	0	2	1+5
D08	0026	+	123	27 27	6	3	7	0	2	1+5
D08	0029	-	123	28 26	6	1	6	0	2	1+5
D08	0035	-	123	29 25	6	2	0	0	0	0
D08	0036	-	123	30 24	6	3	0	0	0	0
D08	0040	-	123	31 23	6	2	7	0	1	1+5

Gruppe D	Tier-Nr.	+: gest. -: getöt.	Vers.-zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>	Blockzahl / Lunge	Blockzahl Rest	Lunge einfach	Lungenstufen	Sirius rot	Leerschnitte
D08	0043	-	123	32 22	6	2	7	0	2	1+5
D08	0007	-	124	33 21	6	4	7	0	2	1+5
D08	0018	-	124	34 20	6	2	0	0	0	0
D08	0019	-	124	35 19	6	1	7	0	2	1+5
D08	0028	-	124	36 18	6	1	7	0	2	1+5
D08	0039	-	124	37 17	6	3	0	0	0	0
D08	0044	-	124	38 16	6	3	0	0	0	0
D08	0046	-	124	39 15	6	3	0	0	0	0
D08	0004	-	125	40 14	6	1	0	73	0	0
D08	0008	-	125	41 13	6	1	0	76	0	0
D08	0010	-	125	42 12	6	1	0	76	0	0
D08	0012	-	125	43 11	6	2	6	0	2	1+5
D08	0015	-	125	44 10	6	1	0	78	0	0
D08	0025	-	125	45 9	6	1	0	0	0	0
D08	0047	-	125	46 8	6	2	0	0	0	0
D08	0049	-	125	47 7	6	1	0	72	0	0
D08	0052	-	125	48 6	6	2	0	0	0	0
D08	0055	-	125	49 5	6	2	0	0	0	0
D08	0057	-	126	50 4	6	1	0	76	0	0
D08	0058	-	126	51 3	5	3	0	0	0	0
D08	0059	-	126	52 2	6	2	0	83	0	0
D08	0060	-	128	53 1	6	2	0	0	0	0

Gruppe E	Tier-Nr.	+: gest. -: getöt.	Vers.zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>	Block- zahl / Lunge	Block- zahl Rest	Lunge einfach	Lungen- stufen	Sirius- rot	Leer- schnitte
E10	0003	-	50		6	3	0	0	0	0
E10	0006	-	53	1 58	5	2	0	0	0	0
E10	0056	-	53	2 57	6	2	0	0	0	0
E10	0055	-	55	3 56	5	2	0	0	0	0
E10	0009	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
E10	0018	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
E10	0019	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
E10	0040	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
E10	0047	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
E10	0045	-	70	4 55	6	3	0	0	0	0
E10	0026	-	77	5 54	6	2	0	0	0	0
E10	0016	-	81	6 53	6	3	0	0	0	0
E10	0030	-	81	7 52	6	3	0	0	0	0
E10	0058	-	81	8 51	6	2	0	0	0	0
E10	0010	-	83	9 50	6	2	0	0	0	0
E10	0034	-	83	10 49	6	2	0	0	0	0
E10	0007	-	84	11 48	6	3	0	0	0	0
E10	0048	-	85	12 47	6	2	0	0	0	0
E10	0011	-	87	13 46	6	2	0	0	0	0
E10	0033	-	87	14 45	6	2	0	0	0	0
E10	0037	+	90	15 44	6	2	0	0	0	0
E10	0013	+	92	16 43	6	2	0	0	0	0
E10	0031	-	92	17 42	6	3	0	0	0	0
E10	0027	-	93	18 41	6	3	0	0	0	0
E10	0038	-	95	19 40	6	4	0	0	0	0
E10	0035	-	97	20 39	6	2	0	0	0	0
E10	0001	-	98	21 38	6	3	0	0	0	0
E10	0017	-	99	22 37	6	3	0	0	0	0
E10	0025	-	100	23 36	6	2	0	0	0	0
E10	0032	-	102	24 35	6	2	0	0	0	0
E10	0051	-	103	25 34	6	2	0	0	0	0
E10	0012	-	105	26 33	6	3	0	0	0	0
E10	0063	-	107	27 32	6	2	0	0	0	0
E10	0029	-	108	28 31	6	2	0	0	0	0
E10	0060	-	108	29 30	6	4	0	0	0	0
E10	0050	-	109	30 29	6	3	0	0	0	0
E10	0020	-	110	31 28	6	2	0	0	0	0
E10	0049	-	110	32 27	6	3	0	0	0	0
E10	0028	-	111	33 26	6	3	0	0	0	0
E10	0064	-	111	34 25	6	3	0	0	0	0
E10	0061	-	114	35 24	6	3	0	0	0	0
E10	0005	-	115	36 23	6	2	0	0	0	0

Gruppe E	Tier-Nr.	+: gest. -: getöt.	Vers. zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>	Block- zahl / Lunge	Block- zahl Rest	Lunge einfach	Lungen- stufen	Sirius- rot	Leer- schnitte
E10	0053	-	115	37 22	6	3	0	0	0	0
E10	0021	-	118	38 21	6	3	0	0	0	0
E10	0052	-	119	39 20	6	2	0	0	0	0
E10	0014	-	121	40 19	6	4	6	0	2	0
E10	0042	-	121	41 18	6	4	0	0	0	0
E10	0004	-	123	42 17	6	1	6	0	2	1
E10	0036	-	123	43 16	6	1	0	74	0	0
E10	0041	-	123	44 15	6	3	6	0	2	1
E10	0043	-	123	45 14	6	2	6	0	2	1
E10	0054	-	123	46 13	6	1	0	76	0	0
E10	0015	-	124	47 12	6	2	6	0	2	1
E10	0022	-	124	48 11	6	3	6	0	2	0
E10	0023	-	124	49 10	6	4	0	70	0	0
E10	0024	-	124	50 9	6	2	6	0	2	1
E10	0044	-	124	51 8	6	4	0	0	0	0
E10	0046	-	124	52 7	6	1	6	0	2	1
E10	0059	-	124	53 6	6	3	6	0	2	1
E10	0062	-	124	54 5	6	6	6	0	2	0
E10	0002	-	125	55 4	6	1	0	80	0	0
E10	0008	-	125	56 3	6	1	0	70	0	0
E10	0039	-	125	57 2	6	2	0	76	0	0
E10	0057	-	126	58 1	6	2	0	76	0	0

Gruppe F	Tier-Nr.	+:gest. -: getöt.	Vers.-zeit [Wo]	Ratten <i>at risk</i>	Block- zahl / Lunge	Block- zahl Rest	Lunge einfach	Lungen- stufen	Sirius- rot	Leer- schnitt e
F12	0063	-								
F12	0064	-								
F12	0049	-	8		3	4	0	0	0	0
F12	0050	-	8		3	4	0	0	0	0
F12	0051	-	8		3	4	0	0	0	0
F12	0025	-	34		5	2	0	0	0	0
F12	0011	-	43		6	2	0	0	0	0
F12	0010	-	48		6	2	0	0	0	0
F12	0021	-	57	1 51	5	2	0	0	0	0
F12	0013	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
F12	0018	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
F12	0029	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
F12	0031	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
F12	0045	-	64	- -	1	0	1	0	0	0
F12	0060	-	66	2 50	5	3	0	0	0	0
F12	0040	-	73	3 49	6	3	0	0	0	0
F12	0026	-	81	4 48	6	3	0	0	0	0
F12	0030	-	81	5 47	6	3	0	0	0	0
F12	0034	-	81	6 46	6	3	0	0	0	0
F12	0035	-	82	7 45	6	2	0	0	0	0
F12	0037	-	82	8 44	6	3	0	0	0	0
F12	0006	-	84	9 43	6	2	0	0	0	0
F12	0042	-	84	10 42	6	2	0	0	0	0
F12	0024	-	85	11 41	6	2	0	0	0	0
F12	0054	-	86	12 40	6	1	0	0	0	0
F12	0061	-	86	13 39	6	2	0	0	0	0
F12	0047	-	87	14 38	6	2	0	0	0	0
F12	0017	-	89	15 37	6	4	0	0	0	0
F12	0039	-	89	16 36	6	3	0	0	0	0
F12	0032	-	93	17 35	6	1	0	0	0	0
F12	0058	-	93	18 34	6	2	0	0	0	0
F12	0048	-	95	19 33	6	4	0	0	0	0
F12	0001	-	96	20 32	6	3	0	0	0	0
F12	0046	-	99	21 31	6	3	0	0	0	0
F12	0005	-	101	22 30	6	1	0	0	0	0
F12	0014	-	101	23 29	6	2	0	0	0	0
F12	0009	-	103	24 28	6	2	0	0	0	0
F12	0015	-	103	25 27	6	3	0	0	0	0
F12	0027	-	103	26 26	6	4	0	0	0	0
F12	0038	-	105	27 25	6	3	0	0	0	0
F12	0055	-	109	28 24	6	2	0	0	0	0
F12	0036	-	115	29 23	6	2	0	0	0	0
F12	0019	-	122	30 22	6	2	6	0	2	1+5

Gruppe F	Tier-Nr.	+:gest. -: getöt.	Vers.-zeit [Wo]	Ratten at risk	Blockzahl / Lunge	Blockzahl Rest	Lunge einfach	Lungenstufen	Sirius-rot	Leerschnitt e
F12	0004	-	123	31 21	6	2	6	0	2	1+5
F12	0007	-	123	32 20	6	2	6	0	2	1+5
F12	0008	-	123	33 19	6	4	0	0	0	0
F12	0012	-	123	34 18	6	1	6	0	2	1+5
F12	0016	-	123	35 17	6	2	6	0	2	1+5
F12	0020	-	123	36 16	6	2	0	78	0	0
F12	0023	-	124	37 15	6	1	0	72	0	0
F12	0028	-	124	38 14	6	2	6	0	2	1+5
F12	0041	-	124	39 13	6	2	0	71	0	0
F12	0043	-	124	40 12	6	2	6	0	2	1+5
F12	0044	-	124	41 11	6	4	0	0	0	0
F12	0002	-	125	42 10	6	3	0	0	0	0
F12	0003	-	125	43 9	6	3	0	31	0	0
F12	0022	-	125	44 8	6	2	0	72	0	0
F12	0033	-	125	45 7	6	3	6	0	2	1+5
F12	0056	-	125	46 6	6	1	0	65	0	0
F12	0052	-	126	47 5	6	2	0	66	0	0
F12	0053	-	127	48 4	6	2	6	0	2	1+5
F12	0062	-	127	49 3	6	1	6	0	2	1+5
F12	0057	-	128	50 2	6	3	0	0	0	0
F12	0059	-	128	51 1	6	2	0	0	0	0

Tabelle 7.7: Näherungsbestimmung der Volumina (mm³) aller Lungentumoren, die in 70 Lungen der vier Versuchsgruppen nach Auswertung von 60 Schnitten pro Lunge histopathologisch diagnostiziert wurden.

	1 x 3 mg Quarz						1 x 3 mg Quarz + 7 x 20 mg PVNO s.c.				
	B04/ 0009	B04/ 0030	B04/ 0032	B04/ 0038	B04/ 0054	B04/ 0060	C06/ 0008	C06/ 0009	C06/ 0012	C06/ 0028	C06/ 0062
Zahl der Tumoren/Lunge	14	7	3	13	3	4	1	1	1	3	4
Bronchiolo-alveolare Adenome	*0,1 0,2			15,8 0,1	1,0 0,1	0,02 18,3	0,2			4,9 3,3	0,2
Bronchiolo-alveolare Karzinome	1,1 237,4 21,9 13,4 3,5 2,8 17,6 0,1	0,9 1,3 10,2 475,0 3,6 4,3 0,6	0,8 1,1	8,4 4,6 1,4 0,8 3,6 19,2 1,1 0,1 0,1 1,4	27,8	0,5 0,4		11,1	1,6	0,3	0,9 0,2 2,6
Zystisch-keratinisierende Epitheliome	193,5 14,2 50,3 48,8		0,4	147,4							

*Jeder Wert steht für das Volumen eines Tumors in mm³

Staubinstillation	30 x 0,5 mg SiO ₂ amorph						10 x 0,5 mg Printex®-90			
	Tier-Nr.	D08/0004	D08/0007	D08/0010	D08/0015	D08/0028	D08/0057	E10/0023	E10/0039	E10/0057
Bronchiolo-alveoläres Adenom						1,3	0,03		0,3	0,3
Bronchiolo-alveoläres Karzinom		29,0		1,1	0,5			2,5 1,5	0,3 0,5	1,9 0,5 0,9 0,4
Plattenepithelkarzinom			1875							

Tabelle 7.8: 9-Monatsversuch (Prüfung 05N99524). Zusammenfassung der histopathologischen Lungenbefunde

Befunde	Anzahl betroffener Tiere Behandlung					
	10x0,3 ml NaCl	1x3mg Quarz	1x3mg Quarz + 7x20 mg PVNO	30x0,5mg Aerosil® 150	10x0,5mg Printex®-90	10x1mg Kohlenstaub
Anzahl untersuchter Lungen	10	10	10	10	10	10
Bronchiolo-alveolare Hyperplasien						
Grad 1	0	1 (10%)	0	2 (20%)	0	6 (60%)*
Grad 2	0	3 (30%)	6 (60%)*	7 (70%)**	7 (70%)**	4 (40%)
Grad 3	0	4 (40%)	4 (40%)	0	3 (30%)	0
Grad 4	0	2 (20%)	0	0	0	0
Becherzellhyperplasie						
Grad 2	0	1 (10%)	3 (30%)	2 (20%)	1 (10%)	0
Grad 3	0	4 (40%)	2 (20%)	0	0	0
Grad 4	0	1 (10%)	0	0	0	0
Alveolare Lipoproteinose						
Grad 1	0	0	4 (40%)	0	2 (20%)	0
Grad 2	0	0	1 (10%)	0	3 (30%)	0
Grad 3	0	3 (30%)	0	0	1 (10%)	0
Grad 4	0	7 (70%)**	0	0	0	0
Ansammlung partikelbeladener Makrophagen						
Grad 1	0	0	1 (10%)	1 (10%)	0	3 (30%)
Grad 2	0	0	5 (50%)*	8 (80%)**	1 (10%)	7 (70%)**
Grad 3	0	3 (30%)	4 (40%)	1 (10%)	7 (70%)**	0
Grad 4	0	6 (60%)*	0	0	2 (20)	0
Alveolare und interstitielle Entzündungszellinfiltrate						
Grad 1	1 (10%)	0	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	8 (80%)**
Grad 2	0	2 (20%)	6 (60%)*	9 (90%)**	9 (90%)**	2
Grad 3	0	8 (80%)**	3 (30%)	0	0	0
Interstitielle fibrotische Granulome						
Grad 2	0	0	0	7 (70%)**	0	0
Grad 3	0	1 (10%)	1 (10%)	3 (30%)	0	0

Befunde	Anzahl betroffener Tiere Behandlung					
	10x0,3 ml NaCl	1x3mg Quarz	1x3mg Quarz + 7x20 mg PVNO	30x0,5mg Aerosil® 150	10x0,5mg Printex®-90	10x1mg Kohlenstaub
Anzahl untersuchter Lungen	10	10	10	10	10	10
Cholesteringranulome						
Grad 1	0	0	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	0
Grad 2	0	1 (10%)	5 (50%)*	3 (30%)	0	0
Grad 3	0	6 (60%)*	2 (20%)	0	0	0
Grad 4	0	2 (20%)	0	0	0	0
Interstitielle Fibrose						
Grad 1	0	0	1 (10%)	0	3 (30%)	0
Grad 2	0	2 (20%)	6 (60%)*	10 (100%)**	4 (40%)	0
Grad 3	0	6 (60%)*	3 (30%)	0	0	0
Grad 4	0	2 (20%)	0	0	0	0
Pleurafibrose						
Grad 1	1 (10%)	0	0	0	2 (20%)	0
Grad 2	0	3 (30%)	1 (10%)	1 (10%)	0	0
Grad 3	0	0	1 (10%)	1 (10%)	0	0
Haemorrhagien						
Grad 1	0	0	1 (10%)	1 (10%)	0	0
Grad 2	0	3 (30%)	0	0	0	0
Grad 3	0	1 (10%)	0	0	0	0
Hyperplasie des BALT						
Grad 1	0	0	1 (10%)	0	0	1 (10%)
Grad 2	1 (10%)	2 (20%)	3 (30%)	3 (30%)	7 (70%)*	6 (60%)
Grad 3	1 (10%)	6 (60%)	2 (20%)	6 (60%)	2 (20%)	1 (10%)
Grad 4	0	1 (10%)	0	1 (10%)	0	0

Grad 0: keine Veränderung - Grad 1: sehr geringgradig – Grad 2: geringgradig – Grad 3: mittelgradig – Grad 4: hochgradig
 Signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe (paarweiser Fisher Test) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Tabelle 7.9: Häufigkeiten der histopathologisch diagnostizierten Lungentumoren und Präneoplasien bei weiblichen Wistar-Ratten durch Untersuchung von 6 und zum Teil von 60 Lungenschnitten nach intratrachealer Instillation von Stäuben mit unterschiedlicher kanzerogener Potenz. (Die Überlebenszeiten der 17 untersuchten Tiere sind in Tabelle 7.6 angegeben)

1		Instillationen																	
		10 x 0,3 mL NaCl-Lös. + Tween® 80	1 x 3 mg Quarz				1 x 3 mg Quarz +7 Inj. à 20 mg PVNO s.c. im Abstand von 4 Mon.				30 x 0,5 mg SiO ₂ amorph	10 x 0,5 mg Ruß-UF				10 x 1 mg Kohlen-staub			
2	Anzahl Ratten mit Vers.zeit ≥ 52 / ≥ 104 Wo.	56 / 30	54 / 29		56 / 37		53 / 38		58 / 33		51 / 25								
3	Bezeichn d. Spalten (Def. s. Fußn.)	a)	b)	a)	b)	c)	d)	a)	b)	c)	d)	a)	b)	a)	b)	a)	b)		
4	Zahl untersuchter Lungen	17	22	7	7	17	17	7	7	17	17	17	17	7	7	17	17		
5	Zahl untersuchter Schnitte pro Lunge	6	60	6	60	6 od. 60	6	6	60	6 od. 60	6	6	60	6	60	6 od. 60	6	60	
6	- Bronchiolo-alveoläres Adenom			2	8	10	4	3	4	4	3		2	1	2	2	1		
7	- Bronchiolo-alveoläres Karzinom			11	30	40	21	3	6	10	7	1	3	3	8	13	8		
8	- zystisch-keratinisierendes Epitheliom			4	6	6	4			1	1					1	1		
9	- Plattenepithelkarzinom					4	4			1	1	1	1						
10	Gesamtzahl der Tumoren			17	44	60	33	6	10	16	12	2	6	4	10	16	10		
11	Mittl. Tumorzahl pro Lunge			2,4	6,3	3,5	1,9	0,86	1,4	0,94	0,71	0,12	0,35	0,57	1,4	0,94	0,59		
12	Anzahl Tiere mit 1 oder > 1 Lungentumor			6	6	12	12	5	5	8	8	2	6	1	3	8	6		
13	Tiere mit Lu.Tumor(en) [%] von 7 bzw. 17 von R. at risk (Vers.z. ≥ 52 Wo.)	0,0 0,0	0,0 0,0	85,7 11,1	85,7 11,1	70,6 22,2	70,6 22,2	71,4 8,9	71,4 8,9	47,1 14,3	47,1 14,3	11,8 3,8	35,3 11,3	14,3 1,7	42,9 5,2	47,1 13,8	35,3 10,3	0,0 0,0	0,0 0,0
14	Anzahl Tiere mit 1 oder > 1 Präneoplasie *	1	1	7	7	16	16	3	7	6	6		7	1	2	4	4	3	

* Präneoplastische Läsionen: alle fokalen/multifokalen bronchiolo-alveolären Hyperplasien Grad 4 und Grad 5 sowie Plattenepithelmetaplasien Grad 4 und 5.

Definition der Spalten:

- a) Ergebnisse nach Auswertung von 6 Schnitten, und zwar der 3. Schnittebene von je 10 Schnitten der 6 Gewebsblöckchen jeder Lunge; es handelt sich um die gleichen Ratten wie unter b).
- b) Ergebnisse nach Auswertung von 60 Schnitten der gleichen Lungen wie a), also von 10 Schnitten der 6 Blöckchen; der Unterschied zu a) zeigt den zusätzlichen Erkenntnisgewinn.
- c) Ergebnisse nach Auswertung von 17 Lungen, davon 10 Lungen mit insgesamt nur 6 vorhandenen Schnitten und von 7 mit 60 Schnitten. d) Ergebnisse nach Auswertung der gleichen 17 Lungen wie c); im Unterschied dazu wurden von den 7 Lungen, von denen 60 Schnitte vorliegen, nur 6 Schnitte berücksichtigt wie bei a). **Fett umrandeten Bezirke:** Die Prozentsätze der Tiere mit ≥ 1 Lungentumor von den 17 untersuchten (Zeile 13, Mitte), die Zahl der Tumoren pro Lunge (Zeile 11) und die Anzahl der Tiere mit ≥ 1 Präneoplasie (Zeile 14) sind die Daten, die in **Abbildung 3** dargestellt sind, allerdings umgerechnet auf den Bezugspunkt Quarz = 100 %.

Tabelle 7.10: Wahrscheinlichkeit in % einen Tumor definierter Größe (bzw. Höhe) bei der angegebenen Anzahl Schnitte zu finden.

Tumor- höhe [mm]	3 Schnitte				7 Schnitte				12 Schnitte			
	Alle Tumoren	Karzinom	Adenom	Epitheliom	Alle Tumoren	Karzinom	Adenom	Epitheliom	Alle Tumoren	Karzinom	Adenom	Epitheliom
0.25	7	7	7	.	20	20	20	.	30	30	30	.
0.5	14	14	14	.	40	40	40	.	60	60	60	.
0.75	23	23	23	23	60	60	60	60	90	90	90	90
1	34	34	34	.	80	80	80	.	100	100	100	.
1.25	47	47	47	.	100	100	100	.	100	100	100	.
1.5	58	58	58	.	100	100	100	.	100	100	100	.
1.75	65	65	65	.	100	100	100	.	100	100	100	.
2	73	73	.	73	100	100	.	100	100	100	.	100
2.25	83	83	.	83	100	100	.	100	100	100	.	100
2.5	94	94	.	.	100	100	.	.	100	100	.	.
2.75	100	.	.	100	100	.	.	100	100	.	.	100
4	100	100	100	.	100	100	100	.	100	100	100	.
4.25	100	100	.	100	100	100	.	100	100	100	.	100
5	100	100	.	.	100	100	.	.	100	100	.	.
6.25	100	100	.	.	100	100	.	.	100	100	.	.
Mittel*	44	46	26	80	74	80	51	93	86	91	63	98

* Mittlere Wahrscheinlichkeit berechnet aus der Verteilung der Tumorenhöhe

3 Schnitte: Jeweils 1 Schnitt in beiden großen Lappen und 1 Schnitt mit den 3 kleinen Lappen (etwa in der Mitte des Lappens)

7 Schnitte: Jeweils 3 Schnitte in den beiden großen Lappen (Abstand etwa 1,25 mm) und 1 Schnitt mit den 3 kleinen Lappen (etwa in der Mitte des Lappens)

12 Schnitte: Jeweils 5 Schnitte in den beiden großen Lappen (Abstand etwa 0,85 mm) und 2 Schnitte mit den 3 kleinen Lappen (Abstand etwa 0,85 mm)

Tabelle 7.11: 30-Monatsversuch (Prüfung 05N99525). Zusammenfassung der nicht-neoplastischen histopathologischen Befunde der Lunge.

Befunde	Anzahl betroffener Tiere Behandlung											
	10x0,3ml NaCl		1x3mg Quarz		1x3mg Quarz +7x20mg PVNO		30x0,5mg Aerosil®		10x0,5mg Printex®-90		10x1mg Kohlenstaub	
Anzahl untersuchter Lungen	17 ^{a)}	22 ^{b)}	17	7	17	7	17	17	17	7	17	17
Bronchiolo-alveolare Hyperplasien												
Grad 1	10(59%)	14(64%)	0	0	1(6%)	0	3(18%)	2(12%)	0	0	9(53%)	10(59%)
Grad 2	0	0	0	0	1(6%)	0	8(47%)	7(41%)	4(24%)	1(14%)	7(41%)	4(24%)
Grad 3	0	0	3(18%)	0	10(59%)	4(57%)	5(29%)	4(24%)	10(59%)	6(86%)	0	1(6%)
Grad 4	0	0	12(71%)	7(100%)	4(24%)	2(29%)	0	1(6%)	2(12%)	0	1(6%)	2(12%)
Grad 5	0	0	2(12%)	0	1(6%)	1(14%)	0	2(12%)	0	0	0	0
Plattenepithelmetaplasie												
Grad 1	0	0	0	0	0	1(14%)	0	0	1(6%)	0	0	1(6%)
Grad 2	0	0	2(12%)	0	1(6%)	4(57%)	0	0	0	4(57%)	1(6%)	1(6%)
Grad 3	0	0	3(18%)	4(57%)	2(12%)	1(14%)	0	0	0	0	0	0
Grad 4	0	0	2(12%)	0	1(6%)	0	0	0	1(6%)	0	0	0
Grad 5	0	0	2(12%)	3(43%)	1(6%)	0	0	0	1(6%)	0	0	0
Becherzellhyperplasie												
Grad 1	0	1(5%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grad 2	0	0	0	0	3(18%)	0	1(6%)	1(6%)	4(24%)	3(43%)	1(6%)	0
Grad 3	1(6%)	1(5%)	7(41%)	1(14%)	8(47%)	2(29%)	0	0	6(35%)	3(43%)	1(6)	4(24%)
Grad 4	1(6%)	1(5%)	4(24%)	3(43%)	2(12%)	2(29%)	0	0	0	0	0	0
Becherzellmetaplasie												
Grad 1	1(6%)	1(5%)	0	1(6%)	0	4(24%)	1(14%)	1(6%)	3(18%)	0	0	1(6%)
Grad 2	0	0	11(65%)	3(43%)	10(59%)	5(71%)	0	3(18%)	5(29%)	10(59%)	5(71%)*	2(12%)
Grad 3	0	0	2(12%)	1(14%)	2(12%)	1(14%)	0	0	0	1(14%)	0	0
Grad 4	0	0								0	0	0

Alveoläre Lipoproteinose													
Grad 1	0	0	0	0	0	0	3(18%)	2(12%)	1(6%)	0	3(18%)	4(24%)	
Grad 2	0	0	0	0	7(41%)	3(43%)	4(24%)	5(29%)	3(18%)	2(29%)	1(6%)	1(6%)	
Grad 3	0	0	12(71%)	4(57%)	7(41%)	3(43%)	1(6%)	2(12%)	12(71%)	0	5(71%)*	0	
Grad 4	0	0	4(24%)	3(43%)	1(6%)	1(14%)	0	0	0	0	0	0	
Ansammlung partikelbeladener Makrophagen													
Grad 1	0	1(5%)	0	0	0	0	4(24%)	4(24%)	0	0	0	0	
Grad 2	0	0	0	0	0	0	9(53%)	9(53%)	3(18%)	1(14%)	17(100%)	17(100%)	
Grad 3	0	0	13(76%)	7	16(94%)	7	3(18%)	3(18%)	14(82%)	6(86%)	0	0	
Grad 4	0	0	4(24%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Alveolare und interstitielle Entzündungszellinfiltrate													
Grad 1	10(59%)	10(59%)	0	0	(6%)	0	5(29%)	4(24%)	0*	0	7(41%)	5(29%)	
Grad 2	3(18%)	0	0	0	0	0	11(65%)	12(71%)	5(29%)	2(29%)	8(47%)	11(65%)	
Grad 3	0	0	5(29%)	1(14%)	13(76%)	4(57%)	1(6%)	1(6%)	11(65%)	5(71%)*	1(6%)	1(6%)	
Grad 4	0	0	12(71%)	6(86%)	3(18%)	3(43%)	0	0	0	0	0	0	
Interstitielle fibrotische Granulome													
Grad 2	0	0	0	0	0	0	0	1(6%)	0	0	0	0	
Grad 3	0	0	0	0	5(29%)	2(29%)	0	0	0	0	0	0	
Grad 4	0	0	0	0	4(24%)	5(71%)	0	0	0	0	0	0	
Cholesteringranulome	0	0	17	7	16(94%)	7	5(29%)	9(53%)	16(94%)	7	1(6%)	4(24%)	
Fremdkörpergranulome													
Grad 1	1(6%)	7(32%)	0	0	0	0	2(12%)	1(6%)	0	0	0	0	
Grad 2	0	3(14%)	0	0	1(6%)	0	0	0	1(6%)	1(14%)	0	1(6%)	
Grad 3	0	0	1(6%)	1(14%)	0	0	0	0	0	0	0	0	
Grad 4	1(6%)	1(5%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mehrkernige Riesenzellen													
Grad 1	0	0	0	4(57%)	5(29%)	5(71%)	1(6%)	2(12%)	1(6%)	2(29%)	0	1(6%)	
Grad 2	0	0	6(35%)	0	1(6%)	1(14%)	0	0	1(6%)	1(14%)	0	0	
Grad 3	0	0	0	1(14%)	0	0	0	0	0	0	0	0	

Interstitialle Fibrose												
Grad 1	1(6%)	1(5%)	0	0	0	0	3(18%)	4(24%)	1(6%)	1(14%)	8(47%)	8(47%)
Grad 2	0	0	1(6%)	0	0	0	10(59%)	10(59%)	6(35%)	2(29%)	3(18%)	4(24%)
Grad 3	0	0	4(24%)	0	14(82%)	4(57%)	2(12%)	2(12%)	10(59%)	4(57%)	0	0
Grad 4	0	0	11(65%)	7	2(12%)	3(43%)	0	0	0	0	0	0
Grad 5	0	0	1(6%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pleurafibrose												
Grad 1	0	2(9%)	0	0	0	0	1(6%)	0	0	0	1(6%)	2(12%)
Grad 2	0	2(9%)	0	0	0	0	6(35%)	9(53%)	6(35%)	2(29%)	0	2(12%)
Grad 3	0	0	3(18%)	1(14%)	14(82%)	5(71%)*	3(18%)	4(24%)	6(35%)	5(71%)*	0	0
Grad 4	0	0	14(82%)	6(86%)**	1(6%)	1(14%)	0	0	0	0	0	0
Grad 5	0	0	0	0	1(6%)	1(14%)	0	0	0	0	0	0
Haemorrhagien												
Grad 1	0	1(5%)	0	0	0	0	2(12%)	4(24%)	0	0	1(6%)	5(29%)
Grad 2	1(6%)	2(9%)	1(6%)	1(14%)	10(59%)	6(86%)	4(24%)	5(29%)	9(53%)	5(71%)	3(18%)	4(24%)
Grad 3	0	0	15(88%)	5(71%)	4(24%)	1(14%)	2(12%)	2(12%)	3(18%)	1(14%)	0	0
Grad 4	0	0	1(6%)	1(14%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyperplasie des BALT												
Grad 1	0	4(24%)	0	0	1(6%)	0	1(6%)	0	0	0	0	0
Grad 2	12(71%)	13(86%)	0	0	0	0**	11(65%)	10(59%)	7(41%)	2(29%)	11(65%)	11(65%)
Grad 3	4(24%)	3(14%)	3(18%)	0	8(47%)	1(14%)	4(24%)	7(41%)	7(41%)	5(71%)	4(24%)	6(35%)
Grad 4	0	0	13(76%)	7	0	3(43%)	0	0	1(6%)	0	0	0
Grad 5	0	0	1(6%)	0	3(18%)	3(43%)	0	0	0	0	0	0
Aspirationspneumonie												
Grad 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(14%)	0	0

Definition der Spalten:

- a) Ergebnisse nach Auswertung von 6 Schnitten/Lunge, von je 7 Lungen der Quarz-, Quarz + PVNO-, Printex®-90 und von je 17 Lungen der Kontrolle, Aerosil®, Kohlenstaub-Gruppe lagen 60 Schnitte vor, von denen aber nur 6 Schnitte berücksichtigt (3. Schnittebene) wurden.
- b) Ergebnisse nach Auswertung von 60 Schnitten/Lunge (von der Kontrollgruppe wurden 22 Tiere untersucht)

Tabelle 7.12: 9-Monatsversuch (Prüfung 05N99524) und 30-Monatsversuch [inklusive der Ergebnisse der Serienschnitte] (Prüfung 05N99525)

Numerischer Mittelwert der Einzelbewertungen von 10 bzw. 17 Lungen/Gruppe, bei denen das Ausmaß der Veränderungen in Schweregrade von 0 – 5 eingeteilt wurde.

Mittlerer Schweregrad der erhobenen Befunde	Instillationen											
	10 x 0,3 ml NaCl		1 x 3 mg Quarz		1 x 3 mg Quarz + 7 x 20 mg PVNO		30 x 0,5 mg Aerosil®		10 x 0,5 mg Printex®-90		10 x 1 mg Kohlenstaub	
Anzahl untersuchter Lungen	10 9 Mo.	22 30 Mo.	10 9 Mo.	17 30 Mo.	10 9 Mo.	17 30 Mo.	10 9 Mo.	17 30 Mo.	10 9 Mo.	17 30 Mo.	10 9 Mo.	17 30 Mo.
Bronchiolo-alveolare Hyperplasien	0	0,6	2,7	3,8	2,4	3,2	1,6	2,5	2,3	2,6	1,4	1,7
Plattenepithelmetaplasie		0	0	2,5	0	1,6	0	0	0	1,1	0	0,2
Becherzellhyperplasie	0	0,5	1,8	2,4	1,2	2,4	0,4	0,1	0,2	1,6	0	0,7
Becherzellmetaplasie	0	0,05	0	2,8	0	2,7	0	0,8	0	2,1	0	0,4
Alveolare Lipoproteinose	0	0	3,7	3,3	0,6	2,3	0	1,1	1,2	2,5	0	0,4
Ansammlung partikelbeladener Makrophagen	0	0,06	3,3	3,2	2,3	2,8	2	1,8	3,1	2,8	1,7	2
Alveolare und interstitielle Entzündungszellinfiltrate	0,1	0,5	2,8	3,7	2,2	3	1,9	1,8	1,9	2,5	0,8	1,8
Interstitielle fibrotische Granulome	0	0	0,3	0	0,3	2,1	2,6	0,1	0	0	0	0
Interstitielle Fibrose	0	0,06	3	3,7	2,2	3	2	1,8	1,1	2,6	0	0,9
Zahl der Lungen mit Cholesteringranulomen	0	0	9	17	8	16	4	9	1	16	0	4

Tabelle 7.13: Schweregrad histologisch beurteilter und bildanalytisch gemessener nicht neoplastischer Lungenveränderungen 9 und 28 - 29 Monate nach intratrachealer Instillation von Stäuben (Mittelwerte)^a. Als weiterer Entzündungsparameter sind die Werte für die polymorphekernigen Granulozyten (PMN) in der Lungenspülflüssigkeit (Ergebnisse nach 9 Monaten) vorangestellt (Ernst et al., 2002).

	Instillationen										
	10 x 0,3 ml NaCl	1 x 3 mg Quarz	1x 3 mg Quarz + 7 x 20 mg PVNO s.c	0,5 mg amorph. SiO ₂ alle 2 Wochen, bis zu 30-mal	10 x 0,5 mg Ruß-UF	10 x 1 mg Kohlenstaub					
Versuchszeit [Monate]	9	~ 28	9	~28	9	~28	9	~28	9	~28	9
PMN [Wert gerundet x 1.000] Verhältnis zu Quarz (Quarz = 100 %)	1,6 0,8 %		190 100 %		100 53 %		315 166 %		150 79 %		65 34 %
Histologische Befunde:											
Anzahl untersuchter Lungen	10	22	10	17	10	17	10	17	10	17	10
Bronchiolo-alveoläre Hyperplasien	0,0	0,6	2,7	3,8	2,4	3,2	1,6	2,5	2,3	2,6	1,4
Plattenepithelmetaplasie	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	1,6	0,0	0,0	1,1	0,0	0,2
Becherzellhyperplasie	0,0	0,5	1,8	2,4	1,2	2,4	0,4	0,1	0,2	1,6	0,0
Becherzellmetaplasie	0,0	0,05	0,0	2,8	0,0	2,7	0,0	0,8	0,0	2,1	0,0
Alveoläre Lipoproteinose	0,0	0,0	3,7	3,3	0,6	2,3	0,0	1,1	1,2	2,5	0,0
Ansammel. partikelbelad. Makrophagen	0,0	0,06	3,3	3,2	2,3	2,8	2,0	1,8	3,1	2,8	1,7
Anzahl Lungen m. Cholest.granulomen	0	0	9	17	8	16	4	9	1	16	0
Alveoläre und interstitielle Entzünd.zell-infiltrate; Verh. zu Quarz (Q. = 100 %)	0,1 3,6 %	0,5 14 %	2,8 100 %	3,7 100 %	2,2 79 %	3,0 81 %	1,9 68 %	1,8 49 %	1,9 68 %	2,5 68 %	0,8 29 %
Interstitielle Fibrose Verhältnis zu Quarz (Quarz = 100 %)	0,0 0 %	0,06 1,6 %	3,0 100 %	3,7 100 %	2,2 73 %	3,0 81 %	2,0 67 %	1,8 49 %	1,1 37 %	2,6 70 %	0,0 0 %
Bildanalytische Befunde:											
Anzahl untersuchter Lungen	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Gesamtfläche Bindegewebe [mm ²] ^b auf mit Siriusrot angefärbten Schnitten	1,35	2,16	3,19	6,95	2,65	2,98	3,00	3,44	2,68	3,61	1,91
Standard-Abweichung	0,62	0,44	1,12	2,12	0,47	0,88	0,64	1,22	0,64	0,94	0,47
Anstieg über Kontrollwert hinaus [mm ²]	–	–	1,84	4,8	1,30	0,82	1,65	1,3	1,33	1,5	0,56
Verhältn. zu Quarz (Q.anstieg = 100 %)	0,0 %	0,0 %	100 %	100 %	71 %	17 %	90 %	27 %	72 %	31 %	30 %
											13 %

^a Die Beurteilung der Ausprägung der histopathologischen Lungenbefunde erfolgte semiquantitativ von „keine“ (= 0) über „sehr geringgradig“ (= 1)

bis „sehr hochgradig“ (= 5). Die semiquantitative Bewertung der interstitiellen Fibrose erfolgte mit Hilfe einer Graduierung, die neben histologischen Kriterien insbesondere die Ausbreitung berücksichtigt. Sie wurde ebenfalls nach folgendem Schema durchgeführt: 0 = keine, 1 = sehr geringgradig, 2 = geringgradig, 3 = mittelgradig, 4 = hochgradig, 5 = sehr hochgradig. Für die quantitative Bestimmung des Bindegewebsanteils der Lunge wurde von einem Lungenlappen die gesamte Fläche analysiert. Die unterschiedliche Bewertung des Ausmaßes der Fibrose nach semiquantitativer und quantitativer Bestimmung können methodisch erklärt werden.

- Bildanalytisch wurden nach 9 Monaten Versuchszeit die 3 kleinen Lungenlappen und nach 28 Monaten Versuchszeit der linke Lungenlappen untersucht. Die gesamte analysierte Fläche der Lungenlappen pro Tier war für die einzelnen Gruppen zwischen den beiden Terminen sehr ähnlich (im Mittel beim Termin 28 Monate um 15% kleiner). Nach 9 Monaten Versuchszeit wurde eine Varianzanalyse bezüglich der Streuung innerhalb der Lungenlappen (innerhalb der Einzeltiere) der jeweiligen Tiere und zwischen den einzelnen Tieren (zwischen den Einzeltieren) für die verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt. Die Varianzen (mittlere Quadrate) zwischen den Tieren waren in allen Fällen größer als innerhalb der Tiere. Bis auf die Gruppen DQ12/PVNO und Aerosil® war dieser Effekt statistisch signifikant ($P < 0.05$). In der Gruppe DQ12/PVNO war der Effekt nicht signifikant, weil die Streuung insgesamt sehr gering war.
- Für die histologische Gradeinteilung wurden die Befunde in allen Lungenlappen zugrunde gelegt, wobei sich Schweregrade in den einzelnen Lungenlappen erheblich unterscheiden können.
- Das verwendete Graduierungsschema bietet eine übersichtliche aber grobe Einteilung. Entscheidet man sich für einen Schweregrad bedeutet dies einen Unterschied von 20 %. Bei der Bildanalyse können sehr viel feinere Unterschiede bestimmt werden. Somit liegen für die Bestimmung der prozentualen Differenzen andere Zahlenbereiche zugrunde.

^b Statistik: Dunnett-Test mit logarithmierten Werten: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Tabelle 7.14: Häufigkeiten der histopathologisch diagnostizierten Lungentumoren und Präneoplasien bei weiblichen Wistar-Ratten durch Untersuchung von 6 und zum Teil von 60 Lungenschnitten nach intratrachealer Instillation von Stäuben mit unterschiedlicher kanzerogener Potenz. Gleiche Daten wie in Tabelle 7.9 aber in Tabelle 7.14 fehlen die Angaben über die Tumortypen in den Zeilen 6 bis 9; statt dessen sind die berechneten Prozentsätze von fünf Versuchsgruppen im Verhältnis zur Quarzgruppe angegeben, deren Werte zum leichteren Vergleich der Wirkungsstärken untereinander = 100 % gesetzt wurde. Dabei handelt es sich um die Zahl der Tiere mit Lungentumor(en) (Zeilen 12 und 13), die Anzahl der Tumoren pro Lunge (Zeilen 10 und 11) und die Zahl der Ratten mit Präneoplasie der Lunge (Zeile 14). Diese Prozentsätze sind die Datengrundlage für viele Diagramme des Berichts.

		Instillationen																	
1		10 x 0,3 ml NaCl-Lös. +Tween® 80	1 x 3 mg Quarz				1 x 3 mg Quarz + 7 Inj. à 20 mg PVNO s.c. im Abstand von 4 Mon.				30 x 0,5 mg SiO ₂ amorph	10 x 0,5 mg Ruß-UF				10 x 1 mg Kohlen-staub			
2	Anzahl Ratten mit Versuchszeit ≥ 52 / ≥ 104 Wo.	56 / 30	54 / 29				56 / 37				53 / 38	58 / 33				51 / 25			
3	Bezeichn d. Spalten (Def. s. Fußnote)	a)	b)	a)	b)	c)	d)	a)	b)	c)	d)	a)	b)	a)	b)	a)	b)		
4	Zahl untersuchter Lungen	17	22	7	7	17	17	7	7	17	17	17	7	7	17	17	17		
5	Zahl untersuchter Schnitte pro Lunge	6	60	6	60	6 od. 60	6	6	60	6 od. 60	6	60	6	60	6 od. 60	6	60		
10	Gesamtzahl der Tumoren	0 % 0	0 % 0	17	44	100 % 60	100 % 33	6	10	26,7 % 16	36,4 % 12	6,1 % 2	10 % 6	4	10	26,7 % 16	30,3 % 10	0 % 0	0 % 0
11	Mittlere Tumorzahl pro Lunge	0 % 0	0 % 0	2,4	6,3	100 % 3,5	100 % 1,9	0,86	1,4	26,7 % 0,94	36,4 % 0,71	6,1 % 0,12	10 % 0,35	0,57	1,4	26,9 % 0,94	30,3 % 0,59	0 % 0	0 % 0
12	Anzahl Tiere mit 1 oder > 1 Lungentumor	0 % 0	0 % 0	6	6	100 % 12	100 % 12	5	5	66,7 % 8	66,7 % 8	16,7 % 2	50 % 6	1	3	66,7 % 8	50 % 6	0 % 0	0 % 0
13	Tiere mit Lu.Tumor(en) [%] von 7 bzw. 17 von R. at risk (Vers.z. ≥ 52 Wo.)	0 % 0,0	0 % 0,0	85,7	85,7	100 % 70,6	100 % 70,6	71,4	71,4	66,7 % 47,1	66,7 % 47,1	16,7 % 11,8	50 % 35,3	14,3	42,9	66,7 % 47,1	50 % 35,3	0 % 0,0	0 % 0,0
14	Anzahl Tiere mit 1 oder > 1 Präneoplasie *	6,3 % 1	6,3 % 1	7	7	100 % 16	100 % 16	3	7	37,5 % 6	37,5 % 6	0 % 0	43,8 % 7	1	2	25 % 4	25 % 4	0 % 0	18,8 % 3

*Präneoplastische Läsionen: alle fokalen/multifokalen bronchiolo-alveolären Hyperplasien sowie Plattenepithelmetaplasien Grad 4 u. 5

Definition der Spalten:

- a) Ergebnisse nach Auswertung von 6 Schnitten, und zwar der 3. Schnittebene von je 10 Schnitten der 6 Gewebsblöckchen jeder Lunge; es handelt sich um die gleichen Ratten wie unter b).
- b) Ergebnisse nach Auswertung von 60 Schnitten der gleichen Lungen wie a), also von 10 Schnitten der 6 Blöckchen; der Unterschied zu a) zeigt den zusätzlichen Erkenntnisgewinn.
- c) Ergebnisse nach Auswertung von 17 Lungen, davon 10 Lungen mit insgesamt nur 6 vorhandenen Schnitten und von 7 mit 60 Schnitten.
- d) Ergebnisse nach Auswertung der gleichen 17 Lungen wie c); im Unterschied dazu wurden von den 7 Lungen, von denen 60 Schnitte vorliegen, nur 6 Schnitte berücksichtigt wie bei a).

Fett umrandeten Bezirke: Die Prozentsätze der Tiere mit ≥ 1 Lungentumor von den 17 untersuchten (Zeile 13, mitte), die Zahl der Tumoren pro Lunge (Zeile 11) und die Anzahl der Tiere mit ≥ 1 Präneoplasie (Zeile 14) sind die Ergebnisse, die in **Abbildung 3** dargestellt sind; dort sind Sie bezogen auf Quarz = 100 %.

Tabelle 7.15: Zwischenergebnisse des mittleren Entzündungs- und Fibrosegrades pro Versuchsgruppe.

	Instillationen					
	10 x 0,3 mL NaCl+Tween®	1 x 3 mg Quarz	1 x 3 mg Quarz + PVNO s.c.	30 x 0,5 mg SiO ₂ amorph	10 x 0,5 mg Ruß-UF	10 x 1 mg Kohle
PMN nach 9 Mon. [~x 1000] ^a	1,6	190	100	315	150	65
Verhältnis zu Quarz = 100 %	0,8 %	= 100 %	53 %	166 %	79 %	34 %
Entzündungsgrad ^b nach 9 Mon. (Mittel)	0,1	2,8	2,2	1,9	1,9	0,8
Verhältnis zu Quarz = 100 %	3,6 %	= 100 %	79 %	68 %	68 %	29 %
Entzündungsgrad ^c nach 28 Mon.(Mittel)	1,5	3,7	3,0	1,8	2,5	1,8
Verhältnis zu Quarz = 100 % abs. Anstieg bei Quarz = 100 %	41 % ± 0	= 100 % + 2,2 = 100 %	81 % + 1,5 = 68 %	49 % + 0,3 = 14 %	68 % + 1,0 = 45 %	49 % + 0,3 = 14 %
Interstitielle Fibrose nach 9 Mon. (Mittel)	0	3,0	2,2	2,0	1,1	0
Verhältnis zu Quarz = 100 %	0 %	= 100 %	73 %	67 %	37 %	0 %
Interstitielle Fibrose nach 28 Mon. (Mittel)	0,06	3,7	3,0	1,8	2,6	0,9
Verhältnis zu Quarz = 100 %	2,7 %	= 100 %	81 %	46 %	70 %	22 %
Fibrose (bildanalyt.) ^d [cm ²] nach 28 Mon. Verhältnis zu Quarz = 100 % abs. Anstieg bei Q . = 100 %	2,16 31 % ± 0 = 0 %	***6,95 ^e = 100 % + 4,8 = 100 %	2,98 43 % + 0,82 = 17 %	*3,44 49 % + 1,3 = 27 %	**3,61 52 % + 1,5 = 31 %	**2,78 40 % + 0,6 = 13 %)

a: Polymorphekernige neutrophile Granulozyten (PMN) in der bronchiolo-alveolären Spülflüssigkeit (BALF), veröffentlicht in ERNST et al., 2002.

b: Numerischer Mittelwert der Einzelbewertungen von 10 Lungen/Gruppe, bei denen das Ausmaß der Entzündung/Fibrose histologisch in Schweregrade von 0 – 5 eingeteilt wurde.

c: Numerischer Mittelwert der Einzelbewertungen von 17 Lungen/Gruppe, bei denen das Ausmaß der Entzündung/Fibrose histologisch in Schweregrade von 0 – 5 eingeteilt wurde.

d: Bildanalytische Fibrosemessung 10 Lungen/Gruppe.

e: Statistik: Dunnett-Test mit logarithmierten Werten: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Tabelle 7.16: Relative Häufigkeiten der Lungentumortypen bei Mensch und Ratte (aus: Pott und Roller, 2003)

Herkunft des Lungen-gewebes	n	Adenom	Adeno-karzinom	Epithe-liom	Platten-epithel-karzinom	Kleinzell-karzinom	Großzell-karzinom	Sonstige Karzi-nome
Biopsie	635 ^a		23 %		41 %	30 %	1 %	5 %
Operat.	163 ^a		40 %		45 %	10 %	5 %	< 1 %
Autopsie	107 ^a		18 %		31 %	36 %	7 %	8 %
Frauen	^b		36 %		25 %	23 %	9 %	16 %
Männer	^b		15 %		46 %	25 %	13 %	14 %
Ratten	368 ^c	12 %	32 %	27 % ^d	27 %			1,7 %

^a Ergebnisse aus der Klinik „Bergmannsheil“, Bochum 1989 (Müller und Reichel; 1990).

^b Krebsregister der DDR 1978 – 1982 (Mehnert *et al.*, 1992). Bei Frauen und Männern insgesamt rund 6870 Neuerkrankungen, davon ca. 70 % histologisch gesichert; Anteil der Frauen etwa 10 %.

^c Ergebnisse aus Teil 1 der 19-Stäube Studie (Pott *et al.*, 2000).

^d Diese 27 % gutartigen epithelialen Tumoren wurden nach der Klassifizierung von Boorman *et al.* (1996) in drei Typen unterteilt: Nicht keratinisierende 3,4 %, zystisch keratinisierende 15 %, keratinisierende 8 %.