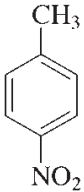


4-Nitrotoluol

MAK-Wert	–
Spitzenbegrenzung	–
Hautresorption (2006)	H
Sensibilisierende Wirkung	–
Krebserzeugende Wirkung (2006)	3 B
Fruchtschädigende Wirkung	–
Keimzellmutagene Wirkung	–
BAT-Wert	–
Synonyma	p-Nitrotoluol 1-Methyl-4-nitrobenzol 1-Nitro-4-methylbenzol
Chemische Bezeichnung	4-Nitrotoluol
CAS-Nr.	99-99-0
Formel	 $C_7H_7NO_2$
Molmasse	137,13 g/mol
Schmelzpunkt	51,3°C (OECD 2005)
Siedepunkt bei 1013 hPa	238°C (OECD 2005)
Dampfdruck bei 20°C	13 Pa (OECD 2005)
Dichte bei 20°C	1,29 g/cm ³ (OECD 2005)
log K_{OW}	2,37 (OECD 2005)
Wasserlöslichkeit bei 20°C	0,345 g/l (OECD 2005)

Die vorliegende Begründung ist größtenteils auf der Bewertung von 4-Nitrotoluol im OECD-ICCA-Programm (OECD 2005) aufgebaut.

1 Allgemeiner Wirkungscharakter

Die chronische orale Gabe von 4-Nitrotoluol führt zu einer nicht dosisabhängig erhöhten Inzidenz von subkutanen Fibromen und Fibrosarkomen bei männlichen Ratten

2 4-Nitrotoluol

sowie Klitoristumoren bei weiblichen Ratten. Bei männlichen Mäusen führt 4-Nitrotoluol zu alveolären und bronchiolären Tumoren und in geringeren Konzentrationen bei männlichen und weiblichen Mäusen zu alveolärer Bronchialisierung und zu Hyperplasien in der Lunge, einer Vorstufe der Lungentumoren.

4-Nitrotoluol weist in den Untersuchungen zur Genotoxizität, wie für Nitroaromaten typisch, sowohl negative als auch positive Ergebnisse auf. In vitro zeigt 4-Nitrotoluol in Säugerzellkulturen eine genotoxische Wirkung, ist aber in Bakterien nicht mutagen. In vivo bindet 4-Nitrotoluol an Makromoleküle der Rattenleber, wirkt aber in UDS-Tests an der Rattenleber und im Mikrokerntest an der Ratte und der Maus nicht genotoxisch. Eine abschließende Aussage über die In-vivo-Genotoxizität ist nicht möglich. 4-Nitrotoluol ist ein Methämoglobinbildner. Bei der Ratte sind die Zielorgane nach wiederholter oraler Gabe Blut, Milz, Nieren, Hoden, Lunge und Leber.

An der Haut und am Auge von Kaninchen zeigt 4-Nitrotoluol keine Reizwirkung. Beim Meerschweinchen wirkt 4-Nitrotoluol nicht hautsensibilisierend.

Nach oraler Gabe an Ratten führt 4-Nitrotoluol im parentaltoxischen Dosisbereich zu einem erniedrigten Gestationsindex, erhöhten Pränatalverlusten und verringerten Jungtiergewichten.

4-Nitrotoluol wird über den Magen-Darm-Trakt, über den Atemtrakt und in geringerem Maße auch über die Haut resorbiert. Die Oxidation der Methylgruppe, gefolgt von einer Konjugation mit Glukuron- oder Schwefelsäure und anschließender Ausscheidung im Urin, stellt den wichtigsten Metabolismusweg dar. Bei der Ratte findet ein enterohepatischer Kreislauf statt. Dabei werden die mit der Gallenflüssigkeit sezernierten Metaboliten durch Darmbakterien an der Nitrogruppe reduziert, danach rückresorbiert und in der Leber zu reaktiven Metaboliten umgewandelt.

2 Wirkungsmechanismus

Hauptwirkung von 4-Nitrotoluol ist die tierexperimentell belegte Bildung von Methämoglobin mit Folgereaktionen, wie sie auch für andere Nitroaromaten bekannt sind. Als Mechanismus der Methämoglobinbildung wird vermutet, dass nach Aufnahme von 4-Nitrotoluol eine Reduktion der Nitroverbindung über die Nitrosoverbindung und das Hydroxylamin zum Amin abläuft. Zwischen dem Hydroxylamin und der Nitrosoverbindung kann ein Redoxzyklus ablaufen, der für die Kooxidation des zweiwertigen Eisens im Hämoglobin, also für die Methämoglobinbildung verantwortlich ist.

3 Toxikokinetik und Metabolismus

3.1 Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung

4-Nitrotoluol wird vollständig über den Gastrointestinaltrakt und die Lungen und zu einem geringeren Teil über die Haut aufgenommen, schnell im Organismus verteilt und vorwiegend mit dem Urin ausgeschieden (OECD 2005).

In einer in polnischer Sprache publizierten Studie, von der nur eine englische Zusammenfassung vorliegt, wurde bei Wistar-Ratten, die eine einmalige orale Gabe von 100 mg/kg KG erhalten hatten, der maximale 4-Nitrotoluol-Plasmaspiegel nach vier Stunden erreicht (Mlynarczyk und Sadowski 2001 a).

Experimentelle Daten zur dermalen Penetration von 4-Nitrotoluol liegen nicht vor. Ausgehend von einer gesättigten wässrigen Lösung berechnet sich mit dem Modell von Guy und Potts (1993) für 4-Nitrotoluol ein dermaler Flux von $0,005 \text{ mg/cm}^2$ und h und mit dem Modell von Wilschut et al. (1995) $0,004 \text{ mg/cm}^2$ und h. Das würde bei einer einstündigen Exposition von beiden Händen und Vorderarmen (ca. 2000 cm^2) einer Gesamtaufnahme von 9,3 mg bzw. 7,3 mg entsprechen.

Nach oraler Verabreichung von 200 mg ^{14}C -markiertem 4-Nitrotoluol/kg KG erfolgt die Ausscheidung innerhalb von 72 Stunden überwiegend mit dem Urin (76,7%) und nur in geringen Mengen mit den Faeces (6,1%); über die Ausatemluft findet keine Elimination statt (BUA 1990).

3.2 Metabolismus

Die Oxidation der Methylgruppe stellt den wichtigsten Metabolismusweg dar. Bei der Maus ist die Oxidation des Benzolrings ebenfalls von großer Bedeutung, die Hydroxylierung findet hier nur in ortho-Stellung zur Methylgruppe statt. Bei der Ratte spielt die Oxidation des Benzolrings nur eine untergeordnete Rolle, sie findet hier nur in ortho-Stellung zur Nitrogruppe statt. Bei der Ratte wurde ein enterohepatischer Kreislauf von 4-Nitrotoluol-Metaboliten, überwiegend 4-Nitrobenzylglukuronid, beobachtet. Hauptmetaboliten von 4-Nitrotoluol bei der Ratte sind 4-Nitrobenzoesäure, 4-Acetamidobenzoesäure und 4-Nitrohippursäure (Dunnick et al. 2003). Hauptmetaboliten bei der Maus sind die Konjugationsprodukte von 2-Methyl-5-nitrophenol (O-Sulfat bzw. O-Glukuronid) sowie 4-Nitrohippursäure. 4-Nitrobenzylmercaptursäure wurde nur bei Ratten in vergleichsweise geringen Mengen ($< 4\%$ der Dosis) nachgewiesen und ist ein potentiell reaktives Agens. Die Konzentration von 4-Nitrobenzoesäure und 4-Acetamidobenzoesäure im Urin korreliert bei der Ratte mit der oral aufgenommenen 4-Nitrotoluol-Dosis (OECD 2005).

4 Erfahrungen beim Menschen

Aufgrund der wenigen Berichte über akute Vergiftungsfälle mit 4-Nitrotoluol am Arbeitsplatz, bei denen es sich zudem meist um Expositionen gegen ein Isomeregemisch aus 2- und 4-Nitrotoluol („Rotöl“) handelt, lassen sich keine verlässlichen Aussagen über die Humantoxizität von 4-Nitrotoluol machen (BUA 1990).

4.1 Einmalige Exposition

In einer Übersicht aus dem Jahr 1898 wurden zehn Vergiftungsfälle durch „Rotöl“, einem Gemisch aus 2- und 4-Nitrotoluol, beschrieben. Dabei wurde 4-Nitrotoluol als vergleichsweise ungiftig charakterisiert (BUA 1990).

In einer Mitteilung aus dem Jahr 1930 wird über eine Vergiftung durch ein Gemisch aus Nitrotoluol und Nitrochlorbenzolen (ortho- und para-) berichtet; es kam dabei zu einer Zyanose mit Atemschwierigkeiten und erhöhter Herzfrequenz. Aufgrund der Mischexposition lassen sich die beobachteten Effekte nicht eindeutig auf 4-Nitrotoluol zurückführen (BUA 1990).

Bei der jährlichen arbeitsmedizinischen Untersuchung von Arbeitern, die Umgang mit 4-Nitrotoluol hatten, zeigten sich keine Effekte auf die Gesundheit der Exponierten; der Methämoglobinspiegel lag unterhalb von 5%. Angaben zur Expositionskonzentration liegen nicht vor, die Produktions- und Verarbeitungsprozesse erfolgten im geschlossenen System (OECD 2005).

In einer Übersichtsarbeit wird ein Geruchs- und ein Geschmacksschwellenwert von 10 mg/m^3 bzw. $0,003 \text{ mg/kg}$ für 4-Nitrotoluol im Trinkwasser angegeben (Wollin und Dieter 2005).

4.2 Wiederholte Exposition

Es wurde ein Kollektiv von 98 Arbeitern (69 Männer und 29 Frauen) aus einer Chemiefabrik in China untersucht, die in der 2,4- und 2,6-Dinitrotoluol- sowie 2,4,6-Trinitrotoluol-Herstellung gegen 2- und 4-Nitrotoluol exponiert waren. Als Kontrollkollektiv diente eine Gruppe von 72 nicht exponierten Arbeitern (59 Männer und 13 Frauen), die in der gleichen Firma beschäftigt waren. Von allen Studienteilnehmern wurden mittels Fragebogen folgende Daten erhoben: Allgemeinbefinden, Expositionsbeschreibung, Rauch- und Trinkgewohnheiten, letzter medizinischer Gesundheitsbericht und aktuelle Symptome. Bei den Studienteilnehmern wurden zudem folgende Untersuchungen vorgenommen: Herz-Kreislauf-System und Nervensystem (k.w.A.), Blutdruck, Pulsrate, Blut- und Urinuntersuchungen, Leberfunktionstests (Alanin-Aminotransferase, alkalische Phosphatase, Serum-Protein, -Albumin, -Bilirubin), EKG, Ultraschall-Untersuchung von Leber und Milz sowie Hepatitis-B-Antigen-Bestimmung. Es wurden 126 Urinproben untersucht, davon wurden 80 Proben am Ende der achtstündigen Arbeitsschicht, 35 vor Schichtbeginn und elf von nicht exponierten Kontrollpersonen genommen. Im Urin der exponierten Arbeiter wurden 4-Nitrobenzoesäure und 4-Nitrobenzylalkohol nach vorheriger enzymatischer Hydrolyse mit β -Glukuronidase nachgewiesen; unverändertes 4-Nitrotoluol wurde nicht im Urin gefunden. Während der Gehalt an 4-Nitrobenzylalkohol im Urin vor und nach der Schicht identisch war ($6,7 \text{ nmol/g}$ Kreatinin), betrug der Gehalt an 4-Nitrobenzoesäure im Urin bei Schichtende mit 76 nmol/g Kreatinin etwa das 9fache des Gehalts vor Schichtbeginn ($8,8 \text{ nmol/g}$ Kreatinin). Im Urin der Kontrollpersonen wurden keine Nitrotoluolmetaboliten nachgewiesen. Es bestand bei den Arbeitern keine Korrelation der Konzentration von 4-Nitrotoluol-Metaboliten im Urin zur Konzentration von 4-Nitrotoluol in der Luft am Arbeitsplatz. Diese betrug als mittlerer 8-Stunden-Schichtmittelwert $0,686 \text{ mg/m}^3$; der Messwertebereich lag von unterhalb der Nachweisgrenze bis $2,40 \text{ mg/m}^3$. Mit Ausnahme der berichteten Kopfschmerzen war bei den exponierten Arbeitern das Auftreten von Krankheitssymptomen wie Ermüdung, Übelkeit, Schlafstörungen, Benommenheit, Schwindel und Dermatitis signifikant höher (Jones et al. 2005 a).

In einer anderen Studie an dem gleichen Kollektiv wurden die Hämoglobinaddukte bei den exponierten Arbeitern untersucht. Es wurden Blutproben von 99 exponierten Arbeitern und 61 nicht exponierten Kontrollpersonen untersucht. 4-Methylanilin-Addukte, die eine Exposition gegen 4-Nitrotoluol anzeigen, wurden sowohl in den Proben nicht exponierter als auch in den Proben exponierter Personen nachgewiesen, wobei in letzteren der Adduktspiegel signifikant höher war und ca. $2 \text{ pmol Addukt/g Hb}$ betrug (Jones et al. 2005 b).

5 Tierexperimentelle Befunde und In-vitro-Untersuchungen

5.1 Akute Toxizität

5.1.1 Inhalative Aufnahme

Die einstündige Ganzkörperexposition gegen eine berechnete 4-Nitrotoluol-Dampfkonzentration von 4167 mg/m^3 wurde von männlichen Ratten und Mäusen symptomlos vertragen. Die Nachbeobachtungszeit betrug sieben Tage (OECD 2005).

Die vierstündige Ganzkörperexposition von Ratten und Mäusen gegen eine Dampfkonzentration von 152 ml/m^3 bzw. 228 ml/m^3 war für die Tiere weder während der Expositionszeit noch während der 14-tägigen Nachbeobachtungszeit letal. Bei der makroskopischen Untersuchung der am Ende des Versuchs getöteten Tiere konnten keine behandlungsbedingten Effekte festgestellt werden (OECD 2005).

In einer Kurzmitteilung werden LC_{50} -Werte von 975 mg/m^3 für die Ratte und von 419 mg/m^3 für die Maus ohne Angabe der Expositionszeit genannt (k. w. A.; Vasilenko et al. 1978).

5.1.2 Orale Aufnahme

Die LD_{50} für 4-Nitrotoluol in Polyethylenglykol 400 bei der Ratte wurde mit größer als 2250 mg/kg KG beschrieben. Nach Gabe in 1%iger wässriger Methylcellulose betrug die LD_{50} bei weiblichen Ratten 3200 mg/kg KG und bei männlichen Ratten 4700 mg/kg KG . Klinische Vergiftungssymptome waren eine schlechte Allgemeinerfassung, gesteigerte Atemfrequenz, Schläfrigkeit, Atonie, Krämpfe und pfeifende Atmung. Nach einer Woche Nachbeobachtungszeit waren die Symptome abgeklungen (OECD 2005).

In einer weiteren Studie an männlichen Ratten wurden eine LD_{50} von 2144 mg/kg KG und zyanotische Effekte ab 3400 mg/kg KG angegeben (OECD 2005).

In einer Kurzmitteilung werden orale LD_{50} -Werte von 1960 mg/kg KG für die Ratte und von 1280 mg/kg KG für die Maus berichtet (k. w. A.; Vasilenko et al. 1978).

Bei weiblichen Wistar-Ratten wurde 24 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von $0,5 \text{ mmol 4-Nitrotoluol/kg KG}$ ($68,5 \text{ mg/kg KG}$) der Hämoglobinbindungsindex bestimmt. Er lag bei $0,43 \pm 0,11$ ($\text{mmol 4-Nitrotoluol/mol Hb}$) / ($\text{mmol 4-Nitrotoluol/kg KG}$) (Sabbioni 1994).

In einer in polnischer Sprache publizierten Studie, von der nur eine englische Zusammenfassung vorliegt, wurde ein maximaler Methämoglobingehalt von 12,1% vier Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 100 mg/kg KG an Wistar-Ratten berichtet (Mlynarczyk und Sadowski 2001 b).

5.1.3 Dermale Aufnahme

Kaninchen erhielten für die Dauer von 24 Stunden eine dermale okklusive Applikation von bis zu 20000 mg unverdünntem 4-Nitrotoluol/kg KG. Weder während der Behandlungszeit noch innerhalb der 14-tägigen Nachbeobachtungszeit traten lokale Wirkungen, systemisch-toxische Effekte oder Todesfälle auf (OECD 2005).

Die 24-stündige dermale Applikation von $750 \text{ mg 4-Nitrotoluol/kg KG}$ als 30%ige Emulsion in Polyethylenglykol 400 war für Ratten innerhalb der siebentägigen Nach-

beobachtungszeit nicht letal, führte aber zu einem schlechten Allgemeinbefinden, das 18 Stunden nach der Applikation einsetzte und bis zum vierten Tag nach der Behandlung anhielt (OECD 2005).

In einer nur unzureichend beschriebenen Studie an Ratten führte die dermale Applikation von bis zu 16 000 mg/kg KG zu einem Methämoglobinspiegel von maximal 25% innerhalb von 72 Stunden. Die Methämoglobinämie war reversibel; die Behandlung wirkte nicht letal (OECD 2005).

5.1.4 Intraperitoneale Aufnahme

Es liegen Untersuchungen zur Methämoglobinbildung bei Ratten und Katzen nach intraperitonealer Applikation vor.

Jeweils sechs Ratten pro Dosisgruppe erhielten eine einmalige intraperitoneale Injektion von 280, 420, 621, 939, 1400 oder 2110 mg 4-Nitrotoluol/kg KG. Nach drei Stunden wurde der Methämoglobinspiegel im Blut bestimmt und betrug 6,5; 6,9; 21,7; 23,6; 16,0 bzw. 27,1%. Dosierungen von 939 mg/kg KG und größer waren innerhalb von 24–48 Stunden nach der Injektion letal für die Tiere (BUA 1990).

Katzen erhielten einmalige intraperitoneale Injektionen von 30 mg/kg KG (Anzahl der Tiere: n = 1), 80 (n = 2), 200 (n = 1), 300 (n = 1), 500 (n = 6) bzw. 5000 mg/kg KG (n = 1). Nur bei einem von sechs Tieren der 500-mg-Gruppe konnte der Methämoglobinspiegel im Blut gemessen werden, er betrug 26%; bei den anderen Tieren war die Messung durch Trübungen im Blut behindert. Bis zu einer Dosis von 300 mg/kg KG wurde 4-Nitrotoluol symptomlos vertragen. Bei allen Tieren der 500-mg-Gruppe traten als Vergiftungssymptome verstärkte Diurese, Speichelfluss und geweitete Pupillen sowie bei einigen Tieren Krämpfe, Zittern, Rigor der Muskulatur, Lähmung der hinteren Extremitäten und ataktischer Gang auf. Bei vier von sechs Tieren kam es zu einer deutlichen Bildung von Heinzschen Innenkörperchen und bei zwei Tieren trat ein nar-koseähnlicher Zustand auf. Fünf Tiere der 500-mg-Gruppe starben nach zwei bis drei Tagen. Die intraperitoneale Injektion von 5000 mg/kg KG führte innerhalb von sechs Stunden zum Tod; bei der Sektion wurde eine große Menge an nicht resorbiertem 4-Nitrotoluol in der Bauchhöhle vorgefunden; eine erhöhte Methämoglobinbildung wurde bei diesem Tier nicht beobachtet. Bei der Sektion der übrigen mit 4-Nitrotoluol behandelten Tiere wurde keine nicht resorbierte Substanz vorgefunden; die Lebern hatten stecknadelkopf- bis linsengroße rotbraune Flecken und periphere Verfettungen (BUA 1990).

5.2 Subakute, subchronische und chronische Toxizität

5.2.1 Inhalative Aufnahme

Hierzu liegen keine Angaben vor.

5.2.2 Orale Aufnahme

Die Studien mit wiederholter oraler Verabreichung von 4-Nitrotoluol sind in Tabelle 1 zusammengestellt. In einer validen Studie zeigten sich nach 13-wöchiger oraler Gabe von 4-Nitrotoluol an Ratten ab der niedrigsten getesteten Dosis von 42–44 mg/kg KG

Tab. 1. Wirkung von 4-Nitrotoluol nach wiederholter oraler Verabreichung

Spezies, Stamm, Anzahl, Geschlecht/Gruppe	Exposition, Zeit, Dosierung	Befunde	Literatur
Ratte, F344/N, je 5 ♂/♀	14 Tage, 0, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 mg/kg Futter (ca. 0, 94, 188, 375, 750, 1500 mg/kg KG und Tag)	188 mg/kg KG: NOAEL; ab 375 mg/kg KG: KG-Zunahme ↓; ab 750 mg/kg KG: Milz: Kongestion, extramedulläre Hämatopoese; 1500 mg/kg KG: KG ↓	OECD 2005
Ratte, Wistar, je 10 ♂/♀	28 Tage, 0, 500, 1000 mg/kg KG und Tag; Gavage in Olivenöl; 5 d/w	bis 1000 mg/kg KG: keine Todesfälle; histologische und pathologisch-anatomische Untersuchungen nicht durchgeführt	BUA 1990; OECD 2005
Ratte, Wistar, je 12 ♂/♀	≥ 36 Tage, 0, 25, 100, 400 mg/kg KG und Tag; Gavage in Polyethylenglykol 400 ♂: 2 w vor Paarung bis 36. Tag; ♀: 2 w vor Paarung bis 4. oder 5. Tag nach dem Werfen (siehe auch Abschnitt 5.5.1 und 5.5.2)	25 mg/kg KG: NOAEL ♂; LOAEL für laktierende ♀; Befunde: laktierende ♀: Futteraufnahme u. KG-Zunahme ↓; bei 100 mg/kg KG: ♂: abs. u. rel. Lebergewicht ↑, Milz: Hämatopoese ↑, Kongestion, Hämosiderose; bei 400 mg/kg KG: Mortalität ↑, gesträubtes Fell, Atmungsgeräusche, KG-Zunahme ↓, Trinkwasseraufnahme ↑, Futteraufnahme ↓, Häufigkeit des Urinierens ↑, Kot ↓, abs. u. rel. Milzgewicht ↑, makroskopische Veränderungen in Magen-Darm-Trakt u. Milz, Eisenpigmentablagerung u. variabler Glykogegehalt in der Leber; ♀: Hypoaktivität, veränderte Gangart, Stuhl weich u. hellgefärbt; Nierentubuli: Lipofuchsin-Pigmentablagerung u. Vakuolisierung; ♂: Einzelzellnekrosen im Nierentubuliepithel; Zelltrümmer in den Nebenhoden und bei 1 Tier Ablösung von Spermatozoiden	OECD 2005
Ratte, F344/N, je 10 ♂/♀	13 Wochen, 0, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 mg/kg Futter (♂: 42, 82, 165, 342, 723 mg/kg KG und Tag; ♂: 44, 82, 164, 335, 680 mg/kg KG und Tag)	ab 42–44 mg/kg KG: LOAEL; Milz: Hämatopoese ↑, Kongestion, Hämosiderinablagerung; ♂: α-2u-Globulin-Nephropathie; ab 335–342 mg/kg KG: ♂: rel. Lebergewicht ↑, rel. Nierengewicht ↑, abs. Hodengew. ↓; bei 680–723 mg/kg KG: KG ↓, Gallensäuregehalt ↑, MetHb ↑ (8,1–9%); ♀: rel. Nierengewicht ↑, rel. Lebergewicht ↑; verlängerter Östruszyklus; ♂: Hodengeneration, Spermienanzahl ↓	NTP 1992; OECD 2005

Tab. 1. Fortsetzung

Spezies, Stamm, Anzahl, Geschlecht/Gruppe	Exposition, Zeit, Dosierung	Befunde	Literatur
Ratte, F344/N, je 10 ♂/♀	13 Wochen, 0, 90, 180, 360 mg/kg KG und Tag; Gavage in Maisöl; k. w. A.	180 mg/kg KG: NOAEL ♂; bei 360 mg/kg KG: ♀: NOAEL; ♂: KG ↓, abs. u. rel. Hodengewicht ↓; Spermiennparameter u. Östruszyklus unverändert	OECD 2005
Ratte, Wistar, je 10 ♂/♀	6 Monate, 0, 400 mg/kg KG und Tag; Gavage in 1% Methylcellulose; 5 d/w, Verpaarung nach 3 Monaten	400 mg/kg KG: LOAEL; MetHb-Gehalt 48 h nach der Applikation: 0,8%; Serum-Cholinesterase ↑; ♂: Milz: vergrößert, Hämosiderose, Erythroblastenproliferation; Hodenatrophie, teils Samenleiternekrosen; ♀: Haarausfall; Gesamthämoglobingehalt 10% ↓	BUA 1990; OECD 2005
Ratte, F344/N, je 50 ♂/♀	2 Jahre, 0, 1250, 2500, 5000 mg/kg Futter (♂: 0, 55, 110, 240 mg/kg KG und Tag; ♀: 0, 60, 125, 265 mg/kg KG und Tag)	55–60 mg/kg KG: LOAEL; Sekret aus Nase u. Augen, Milz: Hämatopoese ↑, Kongestion, Hämosiderin- ablagerung; ♀: KG ↓; ♂: α-2u-Globulin-Nephropathie; ab 110–125 mg/kg KG: Leber ♂: basophile u. klare Foci ↑; Leber ♀: eosinophile Foci ↑; 240–265 mg/kg KG: ♂: KG ↓, Hodendegeneration u. Zwischenzell- adenome ↓; eosinophile Foci ↑; ♀: onkozytische Nierentubulihyperplasien; Tumorbefunde siehe Abschnitt 5.7.2	Dunnick et al. 2003; NTP 2002
Maus, B6C3F1, je 5 ♂/♀	14 Tage, 0, 675, 1250, 2500, 5000, 10000 mg/kg Futter (101, 187, 375, 750, 1500 mg/kg KG und Tag)	101 mg/kg KG: NOAEL ♀; ♂: rel. Lebergewicht ↑; ab 187 mg/kg KG: ♀: rel. Lebergewicht ↑; 1500 mg/kg KG: KG-Zunahme ↓	OECD 2005
Maus, B6C3F1, je 52–56 ♀	14 Tage, 0, 200, 400, 600 mg/kg KG und Tag; Gavage in Maisöl; k. w. A.	200 mg/kg KG: LOAEL; Immunantwort auf Schaf-Erythrozyten ↓, CD4+ T-Zellen in der Milz ↓, verzögerte Antigen-Reaktion; 400 mg/kg KG: vergrößerte Hepatozyten im Bereich der Zentralvene, eosinophile Zellen i. d. Leber ↑, Makrophagenaktivität ↑	OECD 2005

Tab. 1. Fortsetzung

Spezies, Stamm, Anzahl, Geschlecht/Gruppe	Exposition, Zeit, Dosierung	Befunde	Literatur
Maus, B6C3F1, je 52–56 ♀	14 Tage, 0, 5000 mg/kg KG Futter (ca. 660 mg/kg KG und Tag)	660 mg/kg KG: LOAEL; Leber: Genexpression von Egr1 (Transkriptionsfaktor Early Growth Response 1) und Junb (Jun-B Onkogen) ↑	Iida et al. 2005
Maus, B6C3F1, je 10 ♂/♀	13 Wochen, 0, 625, 1250, 2500, 5000, 10000 mg/kg Futter (♂: 0, 131, 212, 439, 813, 1491 mg/kg KG und Tag; ♀: 0, 164, 320, 625, 1075, 1634 mg/kg KG und Tag)	439 mg/kg KG: NOAEL ♂; 1075 mg/kg KG: NOAEL ♀; ab 813 mg/kg KG: ♂: KG-Zunahme ↓; 1634 mg/kg KG: ♀: KG-Zunahme ↓	OECD 2005
Maus, B6C3F1, je 10 ♂/♀	13 Wochen, 0, 40, 80, 160 mg/kg KG und Tag; Gavage in Maisöl; k. w. A.	160 mg/kg KG: NOAEL; ohne Effekt auf Reproduktionsorgane, Spermienparameter u. Östruszyklus	OECD 2005
Maus, B6C3F1, je 50 ♂/♀	2 Jahre, 0, 1250, 2500, 5000 mg/kg Futter (♂: 0, 170, 345, 690 mg/kg KG und Tag; ♀: 0, 155, 315, 660 mg/kg KG und Tag)	155–177 mg/kg KG: LOAEL; alveoläre Bronchioliserung ↑; ♂: synzytische Veränderungen der Hepatozyten; ab 345 mg/kg KG: ♂: KG-Zunahme ↓; 660 mg/kg KG: ♀: KG-Zunahme ↓; Tumorbefunde siehe Abschnitt 5.7.2	Dunnick et al. 2003; NTP 2002

und Tag die für Methämoglobinbildner typischen Effekte an der Milz wie Hämopoese und Hämosiderinablagerungen. Bei höheren Dosierungen wurde eine Abnahme des Körpergewichtes und eine Zunahme des relativen Leber- und Nierengewichtes beobachtet. Am Ende der Studie wurde bei Tieren der höchsten Dosisgruppe von 680–723 mg/kg KG und Tag ein Anstieg des Methämoglobingehalts festgestellt. Bei hohen, bereits anderweitig systemisch-toxischen Dosierungen kam es bei der Ratte zu Hodendegenerationen und zu einer Verlängerung des Östruszyklus. Bei männlichen Ratten kam es ab 42 mg/kg KG und Tag zu einer α -2u-Globulin-Nephropathie, die als spezies- und geschlechtsspezifischer Effekt für den Menschen ohne Relevanz ist. Ein NOAEL kann aus den 13-Wochen-Studien nicht abgeleitet werden. Die gleichen Effekte traten in der Zwei-Jahre-Fütterungsstudie (siehe auch Abschnitt 5.7.2) an Ratten ab der niedrigsten Dosis von 55–60 mg/kg KG auf. Bei höheren Dosierungen wurden zusätzlich basophile, klare und eosinophile Foci in der Leber, onkozytische Nierentubulihyperplasien sowie Hodendegenerationen beobachtet (Dunnick et al. 2003; NTP 2002; OECD 2005).

Bei Mäusen war die Toxizität von 4-Nitrotoluol weniger stark ausgeprägt. In einer validen 13-Wochen-Studie betrug der NOAEL 131–164 mg/kg KG und Tag. Bei höheren Dosierungen wurde ein reduziertes Körpergewicht beobachtet. Spezifische systemische Effekte traten nicht auf. In der Zwei-Jahre-Fütterungsstudie an Mäusen (siehe auch Abschnitt 5.7.2) wurde ab der niedrigsten Dosis von ca. 155–170 mg/kg KG und Tag eine alveoläre Bronchiolisierung und bei den männlichen Mäusen zusätzlich mehrkernige, vergrößerte Hepatozyten beobachtet. In einer Untersuchung an Mäusen wurden Effekte auf das Immunsystem beobachtet, deren biologische Relevanz nicht klar ist (Dunnick et al. 2003; NTP 2002; OECD 2005).

5.2.3 Dermale Aufnahme

Hierzu liegen keine Angaben vor.

5.3 Wirkung auf Haut und Schleimhäute

5.3.1 Haut

4-Nitrotoluol war in einer Untersuchung nach OECD-Prüfrichtlinie 404 an der Haut von Kaninchen nicht reizend (OECD 2005).

5.3.2 Auge

4-Nitrotoluol war in einer Untersuchung nach OECD-Prüfrichtlinie 405 am Kaninchenaugenauge nicht reizend (OECD 2005).

5.4 Allergene Wirkung

4-Nitrotoluol hat sich im Buehler-Test nach OECD-Prüfrichtlinie 406 an 20 Meer-schweinchen als nicht sensibilisierend erwiesen. Die Induktion erfolgte durch eine dermale Applikation einer 50%igen Lösung in Aceton; zur Provokation erhielten die Tiere

12 4-Nitrotoluol

eine dermale Applikation einer 10%igen Lösung in Aceton. Die behandelten Tiere und die Kontrolltiere wiesen nach 24 und 48 Stunden im gleichen Maß leichte Erytheme auf (OECD 2005).

Im „Single Injection Adjuvant Test“ (SIAT) an zehn Meerschweinchen war 4-Nitrotoluol ebenfalls inaktiv. Die Tiere erhielten zur Induktion einmalig eine intradermale Injektion von 0,001 µg/ml in komplettem Freundschens Adjuvans in die Nackenhaut. Nach 13 Tagen wurde die Provokation mit einer sechsstündigen okklusiven Applikation von 0,0026 µg 4-Nitrotoluol/ml auf die Flankenhaut durchgeführt. Die Befunderhebung erfolgte 18 und 42 Stunden nach der Abnahme des Verbandes; Einzelbefunde wurden nicht berichtet (OECD 2005).

5.5 Reproduktionstoxizität

5.5.1 Fertilität

Im Rahmen einer Screeningstudie zur Reproduktions- und Entwicklungstoxikologie nach OECD-Prüfrichtlinie 421 erhielten je zwölf männliche und weibliche Wistar-Ratten tägliche orale Gaben von 0, 25, 100 bzw. 400 mg 4-Nitrotoluol/kg KG (gelöst in Polyethylenglykol 400) mittels Schlundsonde, beginnend zwei Wochen vor der Verpaarung. Die männlichen Tiere wurden bis zum 36. Versuchstag, die weiblichen Tiere bis zum 4. oder 5. Tag nach dem Werfen behandelt. Ab 25 mg/kg KG und Tag war bei den weiblichen Tieren das Körpergewicht reduziert und es wurden klinische Vergiftungssymptome wie Bauchlage, reduzierte Aktivität, gestelzter Gang und gesträubtes Fell beobachtet. In der hohen Dosisgruppe wurden bei weiblichen und männlichen Tieren starke Toxizität in Form von Bauchlage, gesträubtem Fell, Atemgeräuschen, vermehrter Wasseraufnahme, eingefallenen Flanken, reduzierter Ausscheidung von Faeces, bei den weiblichen Tieren zusätzlich reduzierte Aktivität und Fellveränderungen beobachtet. Bei den männlichen Tieren waren bei 100 mg/kg KG und Tag das absolute und relative Lebergewicht erhöht; histopathologische Befunde in der Milz waren ein Anstieg von Eisenpigmenten, Hämatopoese und Blutstauung (siehe auch Abschnitt 5.2.2, Tab. 1). Nach Gabe von 400 mg/kg KG und Tag war der Trächtigkeitsindex auf 85,7% des Kontrollwertes gesunken. Dies resultierte aus einem Wurf ohne lebende Jungtiere sowie der erhöhten pränatalen Verlustrate (3,17% gegenüber 0,89% in der Kontrolle) bei den restlichen Würfen in dieser Dosisgruppe (OECD 2005). Der NOAEL bezüglich der Fertilität betrug für die männlichen und weiblichen Tiere 100 mg/kg KG und Tag.

In einer Zweigenerationenstudie mit 4-Nitrotoluol an Sprague-Dawley-Ratten, die nur als Zusammenfassung vorliegt, erhielten die Tiere 0, 40, 80, 160 mg/kg KG und Tag mit der Schlundsonde. Ein möglicher endokriner Effekt der Substanz wurde anhand der Parameter Reproduktionsleistung sowie Wachstum und Entwicklung der Nachkommen untersucht. Bei den Elterntieren der F₀- und der F₁-Generation wurden ab 80 mg/kg KG und Tag erhöhte Organengewichte von Leber und Nieren bzw. nur der Leber beobachtet. Die F₁-Tiere wiesen ein verringertes Körpergewicht und eine verminderte Futteraufnahme auf, und bei 160 mg/kg KG und Tag kam es bei den Muttertieren der F₀- und F₁-Generation in der perinatalen Phase zu klinischen Vergiftungssymptomen und zu Todesfällen. Ebenfalls bei 160 mg/kg KG und Tag war bei den F₁-Muttertieren die Vaginalöffnung verzögert. Keine abnormen Veränderungen wurden an den endo-

krinen Organen oder Reproduktionsorganen oder bei den Hormonspiegeln im Serum beobachtet. Bei den F₁- und F₂-Jungtieren war bei 160 mg/kg KG und Tag im Vergleich zur Kontrolle die Körpergewichtszunahme verzögert und das Gehirngewicht (k. w. A.) verringert. Die Überlebensrate bei den Jungtieren beider Generationen war reduziert. Insgesamt schätzen die Autoren die Wahrscheinlichkeit einer endokrinen Wirksamkeit von 4-Nitrotoluol als gering ein (k. w. A.; Aso et al. 2004). Der NOAEL der Studie betrug für allgemeine Toxizität und Reproduktionstoxizität 40 mg/kg KG und Tag.

Im Rahmen einer Eingenerationenstudie zur vergleichenden chronischen Toxizität und Reproduktionstoxizität mit sechsmonatiger Behandlung von Ratten mit 400 mg/kg KG und Tag mittels Schlundsonde kam es bei den männlichen Tieren zu Hodenatrophien und Nekrosen der Samenleiter, die Reproduktionsparameter blieben jedoch unbeeinträchtigt. Der NOAEL für die weiblichen Tiere war 400 mg/kg KG und Tag. Ein NOAEL bezüglich der Effekte auf Reproduktionsorgane für männliche Tiere ließ sich aus der Studie nicht ableiten (OECD 2005).

Im Rahmen der 13-Wochen-Fütterungsstudien an F344/N-Ratten und an B6C3F1-Mäusen wurden die Organgewichte der männlichen Reproduktionsorgane, Anzahl, Morphologie und Motilität der Spermien sowie die Östruszykluslänge untersucht. Bei der Ratte kam es ab 342 mg/kg KG und Tag zu einem verminderten absoluten Hodengewicht und ab 723 mg/kg KG und Tag zu Hodendegenerationen sowie zu einer Abnahme der Anzahl und Motilität der Spermien. Bei den weiblichen Ratten war ab 680 mg/kg KG und Tag der Anteil der Tiere im Diöstrus erhöht. Der NOAEL bezüglich der Effekte auf die Reproduktionsorgane betrug bei den männlichen Tieren 165 mg/kg KG und Tag und bei den weiblichen Tieren 335 mg/kg KG und Tag; der LOAEL für die systemische Toxizität betrug 42 mg/kg KG und Tag (siehe auch Abschnitt 5.2.2). Bei den Mäusen ergaben sich bis zur höchsten geprüften Dosis von 1491–1634 mg/kg KG und Tag keine Effekte auf die Reproduktionsorgane (OECD 2005).

Die 13-wöchige Behandlung von Ratten mit bis zu 360 mg/kg KG und Tag mit der Schlundsonde führte zu verringerten absoluten Organgewichten von Nebenhodenschwanz, Nebenhoden und Hoden sowie zu verringertem relativen Nebenhodengewicht; die Spermienparameter sowie die Östruszykluslänge blieben unverändert. Der NOAEL bezüglich der systemischen Effekte und der Reproduktionsorgane für die männlichen Tiere betrug 180 mg/kg KG und Tag. Bei den weiblichen Tieren wurden bis 360 mg/kg KG und Tag keine Effekte beobachtet (OECD 2005).

Die 13-wöchige Behandlung von Mäusen mit bis zu 160 mg/kg KG und Tag mit der Schlundsonde blieb ohne systemische Effekte und ohne Effekte auf die Reproduktionsorgane (OECD 2005).

5.5.2 Entwicklungstoxizität

In einer Screeningstudie zur Reproduktions- und Entwicklungstoxizität nach OECD-Prüfrichtlinie 421 an Ratten (siehe auch Abschnitt 5.2.2, Tab. 1 und Abschnitt 5.5.1) war bei den weiblichen Tieren ab der niedrigsten getesteten Dosierung von 25 mg/kg KG und Tag das Körpergewicht reduziert. Bei 400 mg/kg KG und Tag zeigten die Tiere starke klinische Vergiftungssymptome und einen Anstieg des Milzgewichtes. Bei den Nachkommen war ab 100 mg/kg KG und Tag das Geburtsgewicht dosisabhängig reduziert. Vier Tage nach der Geburt waren die Körpergewichte nur noch leicht reduziert, signifikant nur in der höchsten Dosisgruppe. In der höchsten Dosisgruppe wurden eine

14 4-Nitrotoluol

reduzierte Überlebensrate und Hämatome in verschiedenen Geweben beobachtet. Im Magen der Jungtiere war keine oder nur wenig Milch zu erkennen. Der NOAEL für entwicklungstoxische Wirkungen war 25 mg/kg KG und Tag, für die maternale Toxizität konnte kein NOAEL abgeleitet werden (OECD 2005).

Im Rahmen einer Eingenerationenstudie zur vergleichenden chronischen Toxizität und Reproduktionstoxizität an Ratten (siehe auch 5.2.2, Tab. 1 und Abschnitt 5.5.1), mit dreimonatiger oraler Gabe von 400 mg/kg KG und Tag jeweils vor und nach der Verpaarung, wurden bei der Untersuchung der Nachkommen keine Organveränderungen festgestellt (OECD 2005).

5.6 Genotoxizität

5.6.1 In vitro

Im Test auf differenzielle Abtötung mit *Bacillus subtilis* „Rec-Assay“ war 4-Nitrotoluol ohne Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems in einer Konzentration von 5000 µg/Platte mutagen (k. w. A.; BUA 1990).

4-Nitrotoluol wirkte in validen Mutagenitätstests mit *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* in An- und Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems an verschiedenen Stämmen nicht mutagen. Hingegen zeigten ältere, nicht standardisierte Untersuchungen teilweise eine mutagene Wirkung am *Salmonella typhimurium*-Stamm TA100 (BUA 1990; OECD 2005).

Ein UDS-Test an primären Rattenhepatozyten und an Rattenspermatozyten mit 10–100 µM 4-Nitrotoluol (1,37 bis 13,7 µg/ml) verlief negativ; die Konzentration von 1000 µM (137 µg/ml) wirkte zytotoxisch (OECD 2005).

4-Nitrotoluol induzierte in CHO-Zellen in An- und Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems begleitet von einer Verzögerung des Zellzyklus in Konzentrationen von 50–700 µg/ml Schwesterchromatidaustausch und in zytotoxischen Konzentrationen ab 550–600 µg/ml nur in Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems Chromosomenaberrationen (OECD 2005).

In CHL-Zellen induzierten 250 µg 4-Nitrotoluol/ml ohne den Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems keine erhöhte Inzidenz von Chromosomenaberrationen, führte aber zu einem signifikanten Anstieg polyploider Zellen (BUA 1990; OECD 2005). Zur Zytotoxizität wurden keine Angaben gemacht.

Ebenfalls ohne den Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems wurde in isolierten humanen peripheren Lymphozyten nach Inkubation mit bis zu 1000 µM 4-Nitrotoluol (137 µg/ml) eine dosisabhängige Induktion von Chromosomenaberrationen beobachtet (OECD 2005). Zur Zytotoxizität wurden keine Angaben gemacht.

4-Nitrotoluol induzierte in Konzentrationen bis zu 50 µg/ml ohne Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems keine erhöhte Bildung von Mikronuklei in CHL-Zellen (Matsushima et al. 1999). Es geht aus den Ergebnissen der Studie nicht hervor, ob bis zur Zytotoxizität getestet wurde.

Im TK^{+/-}-Test war 4-Nitrotoluol in nicht zytotoxischen Konzentrationen ab 50 µg/ml genotoxisch in Anwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems; zwischen kleinen und großen Kolonien wurde nicht unterschieden, so dass nicht zwischen mutagenen oder klastogenen Effekten differenziert werden konnte. Zytotoxizität trat erst ab 500 µg/ml auf (OECD 2005).

Die einstündige Inkubation einer Kokultur aus frisch isolierten Sertoli-Zellen und Keimzellen von Kunming-Ratten mit 4-Nitrotoluol in Konzentrationen von 0,032–20 μM (0,004–2,74 $\mu\text{g/ml}$) führte zu DNA-Schädigungen in den Keimzellen, die mit Hilfe des Comet-Assays nachgewiesen wurden. Die mitgeprüften Substanzen 2,4- und 2,6-Dinitrotoluol waren stärker wirksam (Yang et al. 2005). Angaben zu den pH-Werten bei den verwendeten Puffersystemen fehlen in der Publikation, und das Testsystem als solches ist bisher nicht validiert.

5.6.2 In vivo

Somazellen

Bis 96 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 200 mg ^{14}C -markiertem 4-Nitrotoluol an Ratten ist eine kovalente Bindung an Makromoleküle in der Leber zu beobachten. Die maximale Bindung wurde nach etwa zwölf Stunden erreicht. Die intraperitoneale Gabe der Sulfotransferase-Inhibitoren 2,6-Dichlor-4-nitrophenol oder Pentachlorphenol vor der oralen Verabreichung von 150 mg ^{14}C -markiertem 4-Nitrotoluol hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß der kovalenten Bindung an Makromoleküle (BUA 1990). Ratten erhielten eine einmalige orale Gabe von 1 ml einer 0,5 M 4-Nitrotoluollösung/kg KG (68,5 mg/kg KG), und nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet und die Bindung von 4-Nitrotoluol-Metaboliten an die Leber-DNA sowie an Hämoglobin untersucht. Es konnte ein DNA-Addukt mit einem relativen Adduktlevel von $2,6 \times 10^{-8}$ isoliert werden, das jedoch als Artefakt bewertet wurde. Die Bindung an Hämoglobin betrug 3,3 pmol/mg Hb (Jones und Sabbioni 2003).

4-Nitrotoluol war in mehreren validen UDS-Tests ex vivo an Ratten inaktiv. Dazu erhielten die Tiere eine einmalige Gabe von maximal 1000 mg/kg KG mit der Schlundsonde. Zwölf Stunden nach der Behandlung wurden die Tiere getötet und die Hepatozyten isoliert (OECD 2005).

In als valide bewerteten Mikronukleustests an Ratten und Mäusen mit jeweils dreimaliger intraperitonealer Applikation von je maximal 600 mg/kg KG erwies sich 4-Nitrotoluol als nicht klastogen (OECD 2005). Toxische Symptome bei den behandelten Tieren sowie das Verhältnis von normochromatischen zu polychromatischen Erythrozyten wurden nicht berichtet, jedoch wurden Vorstudien zur Dosisfindung durchgeführt, die Untersuchungen zur Löslichkeit, Toxizität und zu Verzögerungen im Zellzyklus beinhalteten und auf eine valide Studiendurchführung schließen lassen.

Keimzellen

Hierzu liegen keine Angaben vor.

5.7 Kanzerogenität

5.7.1 Kurzzeitstudien

In einer Initiations-Promotionsstudie wurden 50, 250 oder 400 mg 4-Nitrotoluol/kg KG einmalig dermal in Aceton auf die Haut von Sencar-Mäusen gegeben. Als Tumorpromotor wurde TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/kg}$ KG und Tag 30 Tage lang appliziert. 4-Nitrotoluol hatte keine tumorinitiierende Wirkung (OECD 2005).

16 4-Nitrotoluol

5.7.2 Langzeitstudien

Es liegen je eine NTP-Zwei-Jahre-Fütterungsstudie an F344/N-Ratten und an B6C3F1-Mäusen vor (siehe auch Abschnitt 5.2.2 und Tabelle 2).

Jeweils 50 Ratten pro Geschlecht und Dosisgruppe erhielten über einen Zeitraum von zwei Jahren Futter mit einem 4-Nitrotoluol-Gehalt von 0, 1250, 2500 bzw. 5000 mg/kg. Dies entspricht bei den männlichen Tieren einer Aufnahme von ca. 0, 55, 110, 240 mg/kg KG und Tag und bei den weiblichen Tieren von ca. 0, 60, 125, 265 mg/kg KG und Tag). Es wurden keine Zwischensektionen und keine hämatologischen oder klinisch-chemischen Untersuchungen durchgeführt. Die 4-Nitrotoluol-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Mortalität. Es traten in allen Dosisgruppen Nasen- und Augensekret auf. Das mittlere terminale Körpergewicht war bei allen weiblichen Ratten bis zu 28,6% und bei den männlichen Ratten der hohen Dosisgruppe um 9% gegenüber der Kontrolle reduziert. Bei allen behandelten Tieren war die Hämato-poese in der Milz erhöht und die Milz wies Hämosiderinablagerungen auf. In der mitt-

Tab. 2. Studien zur Kanzerogenität von 4-Nitrotoluol

Autor:	NTP (2002)				
Stoff:	4-Nitrotoluol (99% rein)				
Spezies:	Ratte, F344/N, je 50 ♂, ♀				
Applikation:	Futter				
Dosis	0, 1250, 2500, 5000 mg/kg Futter; ca. 0, 55, 110, 240 mg/kg KG und Tag bei den männlichen Ratten; ca. 0, 60, 125, 265 mg/kg KG und Tag bei den weiblichen Ratten				
Dauer:	2 Jahre				
Toxizität:	LOAEL 55–60 mg/kg KG (Milz; siehe auch Abschnitt 5.2.2); Mortalität in allen Gruppen 10–20%; außer männliche Kontrolltiere: 38%				
Tumoren:					
		Dosis (mg/kg Futter)			
		0	1250	2500	5000
Klitorisdrüse ^{a)}	♀	8/50 (16%)	12/50 (24%)	20/50 (40%)**	8/49 (16%) ^{b)}
Adenome + Karzinome					
Haut					
subkutane Fibrome	♂	1/50 (2%)	2/50 (4%)*	9/50 (18%)*	1/50 (2%) ^{c)}
oder Fibrosarkome	♀	1/50 (2%) ^{d)}	1/50 (2%)	0/50 (0%)	2/49 (4%)
* p < 0,05; **p < 0,01					
^{a)} 4-Nitrobenzoesäure, ein Metabolit von 4-Nitrotoluol zeigt den gleichen Tumortyp					
^{b)} nicht signifikant; nach Angaben der Autoren eventuell aufgrund des verminderten Körperge-wichtes (71% der Kontrolle)					
^{c)} nicht signifikant; nach Angaben der Autoren “uncertain finding”, da nicht bekannt ist, ob subku-tane Tumoren vom KG abhängig sind					
^{d)} zusätzlich je 1 Tier mit subkutanem Lipom bzw. mit nicht näher spezifiziertem subkutanen Sar-kom					

Tab. 2. Fortsetzung

Autor:	NTP (2002)				
Stoff:	4-Nitrotoluol (99% rein)				
Spezies:	Maus, B6C3F1, je 50 ♂, ♀				
Applikation:	Futter				
Dosis	0, 1250, 2500, 5000 mg/kg Futter; ca. 0, 170, 345, 690 mg/kg KG und Tag bei den männlichen Ratten; ca. 0, 155, 315, 660 mg/kg KG und Tag bei den weiblichen Ratten				
Dauer:	2 Jahre				
Toxizität:	LOAEL 155–170 mg/kg KG (KG ↓, alveolär-bronchioläre Epithelisierung ↑, (keine Zeichen einer Infektion; siehe auch Abschnitt 5.2.2); Mortalität in allen Gruppen 10–20%				
Tumoren:					
		Dosis (mg/kg Futter)			
		0	1250	2500	5000
Lunge					
alveoläre/bronchioläre	♂	8/50 (16%)	14/50 (28%)	12/50 (24%)	19/50 (38%)*
Adenome oder	♀	6/50 (12%)	2/50 (4%)	4/50 (8%)	8/50 (16%)
Karzinome					

* p < 0,05

leren Dosisgruppe war die Inzidenz an Foci mit veränderten Zellen in der Leber erhöht, in der hohen Dosisgruppe kam es zu einer Atrophie des Keimepithels der Hoden. Jeweils in der mittleren, jedoch nicht der hohen Dosisgruppe, war die Inzidenz subkutaner Tumoren bei den männlichen Tieren und die Inzidenz der Klitorisdrüsentumoren bei den weiblichen Tieren statistisch signifikant erhöht (siehe Tabelle 2). Klitorisdrüsentumoren waren bei einer Studie mit 4-Nitrobenzoesäure, einem Metaboliten von 4-Nitrotoluol, ebenfalls vermehrt aufgetreten. Insgesamt bewerten die Autoren der Studie 4-Nitrotoluol als fraglich kanzerogen („equivocal evidence“) bei männlichen Ratten und als möglicherweise kanzerogen („some evidence“) bei weiblichen Ratten (Dunnick et al. 2003; NTP 2002).

Gruppen von je 50 Mäusen pro Geschlecht und Dosis erhielten über einen Zeitraum von zwei Jahren Futter mit einem 4-Nitrotoluol-Gehalt von 0, 1250, 2500 bzw. 5000 mg/kg. Dies entspricht bei den männlichen Tieren einer Aufnahme von ca. 0, 170, 345, 690 mg/kg KG und Tag und bei den weiblichen Tieren ca. 0, 155, 315, 660 mg/kg KG und Tag. Es wurden keine Zwischensektionen durchgeführt. Die 4-Nitrotoluol-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Mortalität und führte zu keinen klinischen Vergiftungssymptomen. Bei allen mit 4-Nitrotoluol behandelten männlichen Mäusen war die Inzidenz synzytischer Veränderungen von Hepatozyten erhöht (siehe Tabelle 3), die von den Autoren als präneoplastisch bewertet wurden. Bei den männlichen Mäusen der hohen Dosisgruppe war die Inzidenz an alveolären/bronchiolären Adenomen und Karzinomen gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant erhöht (siehe Tabelle 2). Die Inzidenz lag mit 39% zwar noch innerhalb des Inzidenzbereichs der

18 4-Nitrotoluol

Tab. 3. Histopathologische Veränderungen in der Zwei-Jahre-Studie mit Mäusen (NTP 2002)

		Konzentration (mg/kg Futter)			
		0	1250	2500	5000
synzytisch veränderte Hepatozyten	♂	2/50 (4%)	13/50 (26%)*	17/50 (34%)**	33/50 (66%)**
	♀	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)	0/50 (0%)
alveoläre Bronchiolisation	♂	0/50	20/50 (40%)** Gr. 1,1	30/50 (60%)** Gr. 1,2	33/50 (66%)** Gr. 1,4
	♀	0/50	33/50 (66%)** Gr. 1,0	41/50 (82%)** Gr. 1,3	49/50 (98%)** Gr. 1,5
alveoläre Hyperplasien	♂	1/50 (2%)	1/50 (2%)	4/50 (8%)	6/50 (12%)
	♀	2/50 (4%)	1/50 (2%)	2/50 (4%)	1/50 (2%)

* p < 0,005; **p < 0,001 Fischer Exact Test, einseitig;
Gr. = Schweregrad der Schädigung; Skala von 1 bis 4

historischen Kontrollen auf Basis der aktuellen NTP-2002-Standard-Diät (12–44%), lag aber oberhalb des Inzidenzbereichs der umfangreicheren historischen Kontrollen auf Basis der früher verwendeten NIH-07-Diät (12–36%). Von den Autoren der Studie wurde dies als eine fragliche kanzerogene Wirkung („equivocal evidence“) von 4-Nitrotoluol bei männlichen Mäusen gewertet. Bei den weiblichen Mäusen zeigte 4-Nitrotoluol keine kanzerogenen Effekte. Nach Angaben der Autoren stellt die bereits ab der niedrigsten Dosierung sowohl bei männlichen als auch weiblichen Mäusen beobachtete alveoläre Bronchiolisation keine präkanzerogene Noxe dar, da bei den weiblichen Tieren die Inzidenz dieses Effekts noch höher ist als bei den männlichen Tieren, während die Lungentumoren jedoch nur bei den männlichen Tieren vermehrt auftreten (Dunnick et al. 2003; NTP 2002). Die Bewertung der Autoren hinsichtlich der alveolären Bronchiolisation kann nicht nachvollzogen werden. Die schon bei niedriger Konzentration beobachtete erhöhte Inzidenz alveolärer Bronchiolisation und Hyperplasien (siehe Tabelle 3) ist aus Sicht der Kommission als eine Vorstufe der Lungentumoren zu sehen, die bei den männlichen und weiblichen Mäusen auftritt.

In einer weiteren Untersuchung, die allerdings methodische Mängel aufweist, erhielten jeweils 30 männliche A/Jax-Mäuse intraperitoneal 0, 1800, 4500 oder 9000 mg 4-Nitrotoluol/kg KG und Tag. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der Inzidenz von Lungentumoren von 16, 12, 14 und 24% in der 0-, 1800-, 4500- bzw. 9000-mg/kg-Gruppe. 4-Nitrotoluol wurde nur 18 Wochen lang, drei Tage pro Woche verabreicht, und die Tiere wurden 16 Wochen nachbeobachtet (Slaga et al. 1985). Zusammenfassend gibt es Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung von 4-Nitrotoluol an der Ratte und an der Maus, wobei die beobachteten geschlechts- und speziesspezifischen Unterschiede bisher nicht geklärt sind.

5.8 Sonstige Wirkungen

5.8.1 In vitro

4-Nitrotoluol weist in vitro eine schwache Bindungskapazität an den humanen Östrogenrezeptor auf; die entsprechende 4-Nitrotoluol-Konzentration war mit $>0,1 \mu\text{g/ml}$ allerdings ca. 120000fach höher als die der Positiv-Kontrollen 17 β -Östradiol und Diethylstilböstrol (OECD 2005).

Die Inkubation von Erythrozyten des Schafs mit 2,5–10,0 mM (0,34–1,37 mg/ml) 4-Nitrotoluol in vitro führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme an Methämoglobin mit einem Maximum von $8,7 \pm 0,7\%$ bei 10 mM; der Kontrollwert betrug 1,9%. Der Zusatz von NADP zum Inkubationsmedium führte mit einem Maximum von $10,1 \pm 1\%$ bei 10 mM zu keiner weiteren statistisch signifikanten Erhöhung der Methämoglobinbildung; der Kontrollwert betrug 2,2%. Damit ist 4-Nitrotoluol in diesem Testsystem schwächer wirksam als Anilin mit 10,3% MetHb bei 7,5 mM, jedoch stärker wirksam als 3-Nitrotoluol mit 6,4% MetHb bei 10 mM und 2-Nitrotoluol mit 8,4% MetHb bei 40 mM, jeweils nach Zugabe von NADP (French et al. 1995).

5.8.2 In vivo

In keiner der Studien zur Toxizität bei wiederholter Verabreichung ergaben sich Anhaltspunkte für eine endokrine Wirksamkeit von 4-Nitrotoluol (OECD 2005).

Nach einmaliger Injektion von ca. 10 μg 4-Nitrotoluol in das Gehirn (intrazisternale Applikation) bei Ratten im Alter von zehn Tagen wurden die Tiere im Alter von 4–5 Wochen bezüglich ihrer Aktivität und DNA-Expressionsmuster untersucht. Die Tiere waren aktiver als die Kontrolltiere und wiesen einen Anstieg in der Genexpression der Dopamintransporter des Mesencephalons auf (Ishido et al. 2004).

6 Bewertung

Die vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen an der Ratte und an der Maus geben Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung von 4-Nitrotoluol.

Bei männlichen Ratten werden subkutane Tumoren, bei der weiblichen Ratte Klitorisdrüsen-Tumoren beobachtet; die Inzidenzen für beide Tumortypen sind nur in der mittleren Dosisgruppe statistisch signifikant erhöht. Subkutane Tumoren treten jedoch auch bei anderen Nitroaromaten auf, z. B. bei 2-Nitrotoluol. Klitorisdrüsentumoren werden auch durch den Metaboliten 4-Nitrobenzoesäure induziert. Bei männlichen Mäusen führt die höchste Konzentration von 4-Nitrotoluol zu alveolären bzw. bronchiolären Tumoren, geringere Konzentrationen verursachen bei männlichen und weiblichen Ratten alveoläre Bronchiolisation und Hyperplasie in der Lunge, das heißt Vorstufen der Lungentumoren.

Die Rolle der Genotoxizität sowie der Geschlechts- und Speziesunterschiede ist für die Kanzerogenität der Nitroaromaten bisher nicht geklärt, aber die Datenlage bei 4-Nitrotoluol ist nicht untypisch und es liegen allenfalls quantitative Unterschiede in der Substanzgruppe der Nitroaromaten vor. Die genotoxische Wirkung ist in dieser Gruppe von Substanzen oft gering ausgeprägt oder uneinheitlich oder wird in Standardtestsystemen nicht erfasst (siehe Begründung „Monozyklische aromatische Amino- und Nitroverbindungen“ 2003). In den Untersuchungen zur Genotoxizität von

20 4-Nitrotoluol

4-Nitrotoluol liegen in vitro sowohl negative als auch positive und in vivo nur negative Ergebnisse vor. Eine abschließende Aussage über die In-vivo-Genotoxizität ist aufgrund dieser Studien aber nicht möglich. Zudem ist 4-Nitrotoluol ein Methämoglobinbildner, das heißt, dass das entsprechende aromatische Hydroxylamin gebildet wird und eine Entstehung reaktiver Metaboliten (z. B. des Nitreniumions) potentiell möglich ist. 4-Nitrotoluol wird daher in die Kanzerogenitäts-Kategorie 3B eingestuft.

Die vorliegenden tierexperimentellen Daten weisen nicht auf eine hautsensibilisierende Wirkung des 4-Nitrotoluol hin. Zur immunologischen Wirkung an den Atemwegen liegen keine Informationen vor. Es erfolgt daher keine Markierung mit „Sh“ oder „Sa“. Wegen der relativ geringen akuten Toxizität von 4-Nitrotoluol ist die fehlende Letalität nach dermalen Applikation nur eingeschränkt für die Bewertung der Hautpenetration heranzuziehen. Die dermale Exposition führt jedoch zu erhöhten Methämoglobinwerten, so dass eine Resorption über die Haut belegt ist. Dagegen weisen die Modellrechnungen auf eine geringe dermale Resorption hin. Da für 4-Nitrotoluol aufgrund des Verdachts einer kanzerogenen Wirkung derzeit kein MAK-Wert angegeben werden kann, muss bei den hier berechneten Resorptionsmengen und der nachgewiesenen dermalen Penetration in vivo von einem zusätzlichen kanzerogenen Risiko ausgegangen werden. Deshalb bleibt 4-Nitrotoluol mit „H“ markiert.

Aufgrund der negativen Daten zur Genotoxizität in vivo wird 4-Nitrotoluol nicht in eine der Kategorien für Keimzellmutagene eingestuft.

7 Literatur

- Aso S, Miyata K, Ehara H, Hoshuyama S, Shiraiishi K, Umamo T, Minobe Y (2004) A two-generation reproductive toxicity study in rats with 4-nitrotoluene. Abstract No. P-25. Congenit Anom Kyoto A47–A48
- BUA (Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker) (1990) Nitrotoluole (Methylnitrobenzole) BUA-Bericht 41, VCH, Weinheim
- Chism JP, Turner Jr MJ, Rickert DE (1984) The metabolism and excretion of mononitrotoluenes by Fischer 344 rats. *Drug Metab Dispos* 12: 596–602
- Dunnick JK, Burka LT, Mahler J, Sills R (2003) Carcinogenic potential of o-nitrotoluene and p-nitrotoluene. *Toxicology* 183: 221–234
- French CL, Yaun SS, Baldwin LA, Leonard DA, Zhao XQ, Calabrese EJ (1995) Potency ranking of methemoglobin-forming agents. *J Appl Toxicol* 15: 167–174
- Guy RH, Potts RO (1993) Penetration of industrial chemicals across the skin: a predictive model. *Am J Ind Med* 23: 711–719
- Iida M, Anna CA, Holliday WM, Collins JB, Cunningham ML, Sills RC, Devereux TR (2005) Unique patterns of gene expression changes in liver after treatment of mice for 2 weeks with different known carcinogens and non-carcinogens. *Carcinogenesis* 26: 689–699
- Ishido M, Masuo Y, Oka S, Niki E, Morita M (2004) p-Nitrotoluene causes hyperactivity in the rat. *Neurosci Lett* 366: 1–5
- Jones CR, Sabbioni G (2003) Identification of DNA adducts using HPLC/MS/MS following in vitro and in vivo experiments with arylamines and nitroarenes. *Chem Res Toxicol* 16: 1251–1263
- Jones CR, Sepai O, Liu YY, Yan H, Sabbioni G (2005 a) Urinary metabolites of workers exposed to nitrotoluenes. *Biomarkers* 10: 10–28
- Jones CR, Liu YY, Sepai O, Yan H, Sabbioni G (2005 b) Hemoglobin adducts in workers exposed to nitrotoluenes. *Carcinogenesis* 26: 133–143
- Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate Jr M, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K, Sofuni T (1999) Validation study on the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14: 569–580

- Mlynarczyk W, Sadowski C (2001 a) Toxicometric indices of mononitrotoluenes Part IV. Toxicokinetics (poln). *Bromatol Chem Toksykol* 34: 315–320
- Mlynarczyk W, Sadowski C (2001 b) Toxicometric indices of mononitrotoluenes Part V. Methemoglobinemics (poln). *Bromatol Chem Toksykol* 34: 321–324
- NTP (National Toxicology Program) (1992) NTP Technical Report on toxicity studies of o-, m-, and p-nitrotoluene, administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. NTP Toxicity Report Series Number 23, NIH Publication No. 93-3346. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
- NTP (National Toxicology Program) (2002) Toxicological and carcinogenesis studies of p-nitrotoluene in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). NTP Technical Report 498, NIH Publication No. 02-4432. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2005) SIDS initial assessment report, 4-nitrotoluene, OECD, Paris, <http://cs3-hq.oecd.org/scripts/hpv/>
- Sabbioni G (1994) Hemoglobin binding of nitroarenes and quantitative structure-activity relationships. *Chem Res Toxicol* 7: 267–274
- Slaga TJ, Triplett LL, Smith LH, Wischi HP (1985) Carcinogenesis of nitrated toluenes and benzenes, skin and lung tumor assays in mice. Oak Ridge National Laboratory Report No AD-A155723, ORNL/TM 9645, unveröffentlicht
- Vasilenko NM, Kovalenko II, Baturina TS (1978) Experimentelle Bestimmung hygienischer Normierung von Mononitrotoluol-Isomeren in der Luft der Arbeitszone. *Gig Tr Prof Zabol* 22: 52
- Wilschut A, ten Berge WF, Robinson PJ, McKone TE (1995) Estimating skin permeation. The validation of five mathematical skin permeation models. *Chemosphere* 30: 1275–1296
- Wollin KM, Dieter HH (2005) Neue Trinkwasser-Leitwerte für monocyclische Nitroverbindungen. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 48: 1289–1295
- Yang L, Xu J, Zhen L, Sun Z, Shi L, Jin M, Liu X (2005) DNA damage of germ cell of rat induced by nitrotoluene chemicals. *J Environ Sci (China)* 17: 84–90

abgeschlossen am 22.06.2006