

Beurteilung eines möglichen Krebsrisikos von Nanomaterialien und von aus Produkten freigesetzten Nanopartikeln

Stellungnahme Nr. 005/2011 des BfR und des UBA vom 15. April 2010

Nanomaterialien werden verstärkt in Industrie- und Verbraucherprodukten eingesetzt. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und das Umweltbundesamt (UBA) wurden vom Bundesministerium für Umwelt und Reaktorsicherheit gebeten, den Stand der Erkenntnis zum krebsauslösenden Potenzial verschiedener Nanomaterialien darzulegen.

BfR und UBA kommen zu dem Schluss, dass es in verschiedenen Studien mit Versuchstieren Hinweise auf eine möglicherweise krebsauslösende Wirkung einiger Nanomaterialien wie Kohlenstoff-Nanoröhren (CNTs) oder Titandioxid (TiO₂) nach der Aufnahme über die Atemluft (Inhalation) gibt. Jedoch reichen die derzeit vorliegenden Daten nicht aus, um diese Materialien als „potenziell krebserzeugend für den Menschen“ mit hinreichender Sicherheit einzustufen. Die Unsicherheit besteht vor allem darin, inwieweit sich die im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen und ob es sich hierbei um Effekte handelt, die spezifisch auf die Nanodimension zurückzuführen sind oder ob weitere stoffinhärente Eigenschaften wirksam sind.

Zur Freisetzung von Nanomaterialien aus Produkten und zur Exposition sind derzeit ebenfalls keine zuverlässigen Aussagen möglich. Informationen darüber, in welchen Produkten und Zubereitungen Nanomaterialien in welchem Umfang verwendet werden, sind nicht in ausreichendem Maße vorhanden. Es gibt zudem nur wenige Untersuchungen zur Freisetzung dieser Materialien aus Produkten. Zugleich ist eine verlässliche Messtechnik zum Nachweis von Nanomaterialien in verschiedenen Medien noch nicht verfügbar bzw. erst in der Entwicklung. Das gesundheitliche Risiko dieser Materialien für den Menschen lässt sich daher noch nicht mit genügender Sicherheit abschätzen.

BfR und UBA sind der Ansicht, dass trotz der noch bestehenden Unsicherheiten die Befunde zum krebsauslösenden Potenzial einiger Nanomaterialien ernst zu nehmen sind. Es sollte abgeschätzt werden, inwieweit Menschen heute im Alltag mit Nanomaterialien in Kontakt kommen können. Parallel sind aussagekräftige Methoden zur Prüfung der toxikologischen Eigenschaften nanostrukturierter Materialien zu entwickeln, die alle in Frage kommenden Expositionspfade (inhalativ, dermal, oral) berücksichtigen. Generell gilt in der derzeitigen Situation: Das krebsauslösende Gefährdungspotenzial kann nur stoffbezogen und im Einzelfall beurteilt werden. Eine differenzierte, materialspezifische Betrachtung ist daher auch für die Bewertung möglicher, von Nanomaterialien ausgehenden Gesundheitsgefahren zu berücksichtigen.

1 Zusammenfassung

Das karzinogene Gefährdungspotential durch Nanomaterialien kann nach kritischer Sichtung der verfügbaren Daten gegenwärtig nur stoffbezogen und im Einzelfall beurteilt werden. Für verschiedene Formen von Carbon Nanotubes (CNTs) und nanoskalierten TiO₂-Partikeln (nano-TiO₂) liegen Hinweise vor, wonach diese Materialien bei Aufnahme über die Atemluft (Inhalation) Tumoren in sensitiven Tiermodellen induzieren können. Dabei werden für asbest-ähnliche Fasern¹ (CNTs) bzw. für einatembare Fraktionen biobeständiger Feinstäube geringer Toxizität² (nano-TiO₂) Wirkmechanismen der inhalativen Toxizität auf der Basis von

¹ So genannte HARN (= high aspect ratio nanomaterials)

² So genannte PSPLT (= persistent solids of low toxicity)

chronisch-entzündlichen Prozessen angenommen. Epidemiologische Untersuchungen für die genannten, gezielt hergestellten Nanomaterialien sind bisher nicht hinreichend aussagekräftig.

Generell ist die Datenbasis zur Bewertung des von Nanomaterialien ausgehenden karzinogenen Potentials nicht ausreichend. Während einige Studien Hinweise auf ein nanospezifisches Tumorpotential zeigten, kamen andere Untersuchungen zu negativen Ergebnissen. Dies ist möglicherweise auf eine unzureichende Charakterisierung des Prüfmaterials, Unterschiede im experimentellen Design der Untersuchungen, die Verwendung verschiedener Tiermodelle und -spezies und/oder auf Unterschiede in der Dosimetrie (sowohl hinsichtlich des geeigneten Dosismaßes wie auch in der Abschätzung wirksamer Dosis Mengen) zurückzuführen.

Es bestehen daher zurzeit erhebliche Unsicherheiten im Hinblick auf die Abschätzung des karzinogenen Potentials und die Übertragbarkeit auf den Menschen. Auch lässt sich nicht abschließend die Nanospezifität der beobachteten karzinogenen Wirkungen beurteilen. Es wird vermutet, dass für Nanomaterialien spezifische karzinogene Wirkungen sowohl quantitativer als auch qualitativer Natur möglich sind. Im ersteren Falle sind die karzinogenen Effekte von Nanopartikeln nur stärker ausgeprägt als diejenigen des nicht nanoskaligen Vergleichsmaterials (z.B. aufgrund der wesentlich größeren Oberfläche und der höheren Partikelzahl bezogen auf die Massenkonzentration). Andererseits können bestimmte nanotypische Partikeleigenschaften (geringe Größe, Form und Reaktivität, unterschiedliche Verweildauer und Verteilung im Körper nach Überwindung biologischer Barrieren, mögliche molekulare Wechselwirkungen mit Biomolekülen) die Toxizität in qualitativer Hinsicht beeinflussen, so dass das karzinogene Potential von Nanomaterial und nicht nanoskaliger Vergleichssubstanz grundlegend verschieden sein können.

Aus dem Gesagten wird deutlich, dass der Forschungsbedarf in diesem Bereich sehr hoch ist und standardisierte Prüfmethode gegebenenfalls neu entwickelt oder zumindest angepasst werden müssen, um zu gesicherten Antworten bezüglich des karzinogenen Potentials von Nanomaterialien zu kommen. Die Produktion von Nanomaterialien dürfte in den kommenden Jahren weltweit stark zunehmen und weitere Materialien mit neuartigen Eigenschaften werden entwickelt, so dass auch von einer möglichen zunehmenden Belastung des Menschen ausgegangen werden kann.

Über die Exposition und Freisetzung von Nanopartikeln aus Produkten können derzeit ebenfalls keine verlässlichen Aussagen gemacht werden. Zum einen bestehen hinsichtlich der Verarbeitung von Nanomaterialien in Produkten und Zubereitungen erhebliche Informationsdefizite. Andererseits gibt es nur wenige Untersuchungen zur Freisetzung. Eine verlässliche Messtechnik und Überwachung von Nanomaterialien in unterschiedlichen Medien / Matrices ist noch in der Entwicklung.

Trotz der Unsicherheiten sind die bisherigen Befunde zum karzinogenen Potential von Nanomaterialien ernst zu nehmen, und Maßnahmen zur Expositionsminimierung sollten mit einer umfassenden und aussagekräftigen toxikologischen Methodenentwicklung und Prüfung nanostrukturierter Materialien unter Berücksichtigung aller in Frage kommender Expositionspfade Hand in Hand gehen.

Bezüglich einer möglichen Legaleinstufung von Nanomaterialien und der Übertragbarkeit von Einstufungen des entsprechenden Nicht-Nanomaterials ist es erforderlich, eine differenzierte Einstufung getrennt nach Nano- und Nicht-Nanoform vorzunehmen und Kriterien für die Bewertung nanospezifischer, Krebs erzeugender Eigenschaften dem Erkenntnisgewinn folgend anzupassen. Hier besteht auf europäischer Ebene Anpassungsbedarf, da stoffrechtlich die Nanoformen in der Regel keine eigene Stoffkategorie darstellen.

2 Bewertung der Literatur zu Nanopartikeln und deren Agglomeraten hinsichtlich eines potenziellen Krebsrisikos für den Menschen

2.1 Allgemeine Betrachtung

In der Diskussion über die Toxizität von Nanopartikeln wird zum Teil die Auffassung vertreten, dass Nanomaterialien aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften, unabhängig von ihrer stofflichen Zusammensetzung, karzinogen wirken können (Roller, 2009). Diese Einschätzung stützt sich auf mechanistische Überlegungen und einige tierexperimentelle Befunde nach hoher bis sehr hoher Dosierung. Zurzeit gibt es jedoch keine ausreichenden experimentellen Belege für die Karzinogenität von Nanomaterialien *per se*, wohl aber deutliche Hinweise, dass einige Nanomaterialien ein karzinogenes bzw. stärker karzinogenes Potential im Unterschied zu mikroskaligen Partikeln aus demselben Material besitzen. Von den bisher durchgeführten Studien mit ausgewählten Nanomaterialien erfüllen nur wenige die Ansprüche an Standardisierung und Qualität, um als Grundlage für eine regulatorische Bewertung genutzt werden zu können. Die meisten Untersuchungen sind eher explorativer Art, die einen Vergleich der Ergebnisse und eine belastbare Bewertung nicht zulassen.

Die derzeit vorliegenden experimentellen *in vivo* Untersuchungen unterscheiden sich z.T. erheblich in den technischen Präparationen der Nanomaterialien und deren Charakterisierung, Applikationsformen und Dosierungen, aber auch in den verwendeten Tierarten und im Studiendesign. Aufgrund der Heterogenität im Versuchsdesign lassen sich die Befunde nur bedingt vergleichen³.

Internationale Standards für die Prüfung von Nanomaterialien werden derzeit erst entwickelt. Bis allgemeine Kriterien entwickelt worden sind, ist eine tragfähige Beurteilung des karzinogenen Potentials von Nanomaterialien nur im Einzelfall bei Vorliegen belastbarer Daten möglich. Da dies auch für andere toxikologische Endpunkte gilt, empfehlen verschiedene nationale und internationale Expertenkomitees (MAK, SCENIHR, SCCS, EFSA, US-EPA, US-NIOSH; etc.) für die Risikoanalyse die Einzelfallbetrachtung für jeden individuellen Typ von Nanomaterial.

Um eine Vergleichbarkeit unter den verschiedenen Materialien und Partikelgrößen zu gewährleisten, ist das Dosismaß "Masse" zwar praktikabel, aber nicht immer geeignet. Als besser mit der Wirkung korrelierende Dosismaße werden derzeit diskutiert: Oberfläche, Anzahl, Volumen sowie Kombinationen davon (z.B. Volumen mit Partikelgröße sowie Reaktivität bezogen auf die Oberfläche).

Eine prädiktive und übertragbare Aussage über das toxische Potential von Nanopartikeln ist erst dann möglich, wenn sich bestimmte toxische Effekte in biologischen Systemen/Organismen definierten Partikeleigenschaften zuordnen lassen. Insbesondere hat sich herausgestellt, dass die alleinige Betrachtung der Größe der Nanopartikel in vielen Fällen unzureichend ist. Die toxischen Wirkungen von Nanomaterialien werden nicht nur durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Partikels selbst, sondern auch durch die Wech-

³ Häufig waren die Testpartikel in Form, Größe, Herstellung und Funktionalisierung nicht standardisiert. Die Charakterisierung der Materialien wurde zudem häufig nur unzureichend dokumentiert, so dass oft wichtige Kenngrößen, wie z.B. die Aggregat- bzw. Agglomeratbildung, fehlten. Darüber hinaus stellen die untersuchten Nanopartikel eine Auswahl dar, die nicht die Vielzahl existierender und herstellbarer Nanomaterialien repräsentiert, sondern aufgrund technischer Machbarkeit oder bestehender Forschungsschwerpunkte einzelner Arbeitsgruppen erstellt wurde.

selwirkungen mit zellulären Strukturen und Biomolekülen ("Nano-Bio-Interface")⁴ determiniert (Nel et al., 2009).

Weitere für toxische Wirkungen relevante Prozesse, wie z.B. die Erzeugung von Radikalen („oxidativer Stress“), Induktion oder Modulation von (pro-)inflammatorischen Reaktionen, genetische Veränderungen sowie - im Falle filamentärer Nanomaterialien - besondere Wirkungen biopersistenter, langer Fasern, müssen in Betracht gezogen werden.

Eine bessere Grundlage zur Einschätzung des genotoxischen Potentials soll das OECD Programm "Working Party on Manufactured Nanomaterials" (WPMN⁵) liefern. Im Rahmen dieses Programms sollen erstmalig wesentliche, für eine toxikologische Bewertung der akuten Toxizität relevanten Endpunkte für ausgewählte Nanomaterialien erfasst werden. Erste Resultate werden ab 2012 erwartet.

Im Folgenden wird der aktuelle Stand der Fachliteratur zur Karzinogenität exemplarisch für die Nanomaterialien Titandioxid, Kohlenstoff-Nanoröhren ("Carbon Nanotubes", kurz CNTs) und amorphes Siliziumdioxid vorgestellt. Viele der Studien vergleichen die Toxizität von Nanopartikeln mit derjenigen größerer Partikel, die bis in den Mikrometermaßstab hinein reichen. Im folgenden Text werden die Nanomaterialien (per Definition <100 nm in mindestens einer Dimension) mit dem Präfix „nano“ gekennzeichnet und die Materialien mit größerer Korngröße als „feine Partikel“.

2.2 Titandioxid (TiO₂)

Titandioxid ist eine äußerst stabile Verbindung, die in der Natur in den drei Modifikationen Anatas, Brookit und Rutil, vorkommt. Anatas, Brookit und Rutil sind aus [TiO₆]-Oktaedern aufgebaut, die jedoch bei den drei Modifikationen unterschiedlich angeordnet sind. Während Brookit kaum Verwendung findet und auch nicht photokatalytisch aktiv ist, besitzen Anatas und Rutil neben der Photokatalyseaktivität weitere ausgeprägte Eigenschaften, die industriell genutzt werden. Titandioxid wird seit vielen Jahren industriell hergestellt. Es ist heute das mit Abstand wichtigste Weißpigment, das überwiegend aus mikroskalierten Partikeln besteht, anteilig können jedoch (produktionsbedingt) nanoskalige Partikel enthalten sein. Darüber hinaus werden auch nanostrukturierte Titandioxidpartikel aufgrund der besonderen katalytischen und photokatalytischen Eigenschaften gezielt und in großen Volumina hergestellt.

2.2.1 Inhalationsstudien am Tier

Titandioxid gehört aus inhalationstoxikologischer Sicht zur Klasse der so genannten "granulären, biobeständigen Stäube geringer Toxizität". Feinkörniges TiO₂ (Rutil, 99%, 84% der Partikel waren einatembarer Staub) löste in Ratten nach 2-jähriger inhalativer Exposition gegenüber hohen Dosierungen (250 mg/m³, 6 Stunden pro Tag, 5 Tage pro Woche) Tumoren in der bronchoalveolaren Region ohne Anzeichen einer Metastasierung aus. In den Nasenhöhlen der Ratten wurden keine Tumoren beobachtet (Lee et al., 1985a, b; Lee et al., 1986). Eine 2006 vorgenommene Zweitbewertung dieser Ergebnisse kam zu dem Schluss, dass es sich bei 13 der 16 beobachteten Gewebeveränderungen nicht um Karzinome, sondern um Keratinzysten handelte (Warheit und Frame, 2006). Keratinzysten sind präne-

⁴ Diese Interaktionen könnten unter anderem zur kompartimentspezifischen Adsorption von Ionen, Proteinen, Lipiden, DNA/RNA und organischen Verbindungen führen, wodurch die toxischen Eigenschaften dieses gleichsam beschichteten Partikels (auch "sekundäres Coating" genannt) moduliert werden können.

⁵ OECD_Safety of Manufactured Nanomaterials
http://www.oecd.org/about/0,3347,en_2649_37015404_1_1_1_1_37465,00.html

oplastische Veränderungen, welche Vorstufen der Tumorbildung darstellen können und in der Ratte extrem selten spontan auftreten.

In einer Inhalationsstudie an der Ratte wurden bei Exposition mit durchschnittlich 10 mg/m^3 nano-TiO₂ ('P25', 80% Anatas/20% Rutil, Primärpartikeldurchmesser 15-40 nm) nach 18 bzw. 24 Monaten vermehrt gutartige und bösartige Tumoren (Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome) festgestellt. Die retinierte TiO₂-Menge in der Lunge betrug nach 24 Monaten ca. 40 mg pro Tier. Nano-TiO₂ führte mit einer ähnlichen Potenz zur Induktion von Tumoren wie der als krebserzeugend eingestufte Dieselruß. Im Gegensatz zu Beobachtungen an der Ratte wurden bei Mäusen, die gegenüber der gleichen Menge nano-TiO₂ exponiert wurden, keine Tumoren nachgewiesen (Heinrich et al., 1995).

Nach 24-monatiger inhalativer Exposition von Ratten gegenüber 5 mg/m^3 feinem TiO₂ (Bayertitan T, $1,1 \mu\text{m}$) konnten Entzündungsreaktionen in der Lunge, aber keine erhöhte Tumorate in den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Muhle et al., 1989).

Nach 3-monatiger inhalativer Exposition von Ratten gegenüber 23 mg/m^3 feinem TiO₂ und nano-TiO₂ war am Ende der Expositionsphase in der Lunge der behandelten Tiere eine interstitielle Fibrose nachweisbar. Dieser histologische Befund war bei den gegenüber nano-TiO₂ exponierten Versuchstieren stärker ausgeprägt als bei Ratten, die feine TiO₂-Partikel inhaliert hatten. Ein Jahr nach Beendigung der Exposition hatte sich das Ausmaß interstitieller Fibrose in allen behandelten Tieren wieder weitestgehend auf Kontrollniveau abgesenkt. Die Anzahl Partikel-beladener Alveolar-Makrophagen war zum Ende der Exposition erhöht und blieb ein Jahr nach Expositionsende erhöht (Baggs et al., 1997).

In subchronischen Inhalationsstudien wurden weibliche Ratten, Mäuse und Hamster mit Aerosolkonzentrationen von $0,5$, $2,0$ oder 10 mg/m^3 nano-TiO₂ bzw. 10 , 50 oder 250 mg/m^3 feines TiO₂ 13 Wochen lang behandelt (6 h/Tag, 5 Tage/Woche) und bis zu 52 Wochen nachbeobachtet. Die Halbwertszeiten für die Lungenretention betragen im Falle von nano-TiO₂ bei Ratten 63, 132 und 395 Tage, für feines TiO₂ dagegen 100, 324 und 838 Tage für die drei genannten Dosisstufen der beiden TiO₂-Formen. Dabei wurden deutliche Speziesunterschiede der pulmonären Clearance festgestellt. So betragen die nano-TiO₂-Halbwertszeiten bei Mäusen 48, 40 und 319 Tage, bei Hamstern 33, 37 und 39 Tage. Während bei Hamstern keine toxischen Veränderungen im Atemtrakt beobachtet wurden, traten bei Ratten bei einer Dosis von 10 mg/m^3 nano-TiO₂ progressiv-metaplastische epitheliale und fibroproliferative Veränderungen auf. Anhand von Untersuchungsparametern in der bronchoalveolären Flüssigkeit (BALF⁶) wurde gezeigt, dass Ratten bei äquivalenter Lungenbelastung mit schwereren entzündlichen Wirkungen reagierten als Mäuse. Im Falle von hochdosiertem feinem TiO₂ (50 und 250 mg/m^3) zeigten alle drei Spezies Entzündungsreaktionen, die nur beim Hamster in der Nachbeobachtungszeit abklangen. Nur Ratten entwickelten dabei progressive fibroproliferative Läsionen und alveoläre epitheliale Metaplasien (Bermudez et al., 2002, 2004, Hext et al., 2005).

Die Autoren nahmen an, dass aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten bezogen auf die Masse für die untersuchten Partikeltypen und innerhalb eines Partikeltyps für die untersuchten Spezies unterschiedliche Overload-Schwellen existieren. Die Befunde zeigen jedoch auch, dass die Art der Effekte und die Reaktion der verschiedenen Tierspezies bei nano-TiO₂ und feinem TiO₂ grundsätzlich ähnlich sind. Die Wirkungen durch nano-TiO₂ traten jedoch bereits bei 5-10-fach geringerer Massenkonzentration auf. Bezogen auf die Oberfläche als Dosis-Metrik war die Partikelbelastung der Lunge bei 10 mg/m^3 Nano-TiO₂ vergleichbar derjenigen bei 50 mg/m^3 feinem TiO₂. Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten und der Abwesen-

⁶ BALF Bronchoalveolar lavage fluid

heit von Lungenläsionen beim Hamster wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass der Hamster über einen effizienteren Lungenclearance-Mechanismus verfügt.

2.2.2 Tierstudien mit intratrachealer Instillation

Im Rahmen der von Pott und Roller (2005) durchgeführten so genannten "19-Stäube-Studie" wurde in chronischen Versuchen an der Ratte über 30 Monate nach wiederholter intratrachealer Instillation von nano-TiO₂ (Primärpartikelgröße 21-30 nm) ab der 9. Lebenswoche eine signifikant erhöhte Anzahl benigner (Adenome und Epitheliome) und maligner Tumoren (Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome) im Vergleich zu feinem TiO₂ beobachtet. Bei hochdosierter Behandlung der Tiere mit insgesamt 60 mg (10 Instillationen x 6 mg) nano-TiO₂ wurden bei 70% der Ratten Tumoren festgestellt (gegenüber 30% im Falle von feinen TiO₂-Partikeln). Wurden die Tiere mit insgesamt 15 mg nano-TiO₂ (5 Instillationen x 3 mg) bzw. 30 mg nano-TiO₂ (5 Instillationen x 6 mg) behandelt, entwickelten 52% bzw. 67% der untersuchten Ratten Tumoren. Dieselruß, welcher als krebserzeugend eingestuft ist, führte bei 40% der mit insgesamt 30 mg (5 x 6 mg) instillierten Tiere zu Tumoren.

Eine erneute histopathologische Auswertung der "19-Stäube-Studie" ergab, dass 30 mg instilliertes nano-TiO₂ in 50% der untersuchten Tiere Tumoren induzierte, während nach Instillation von insgesamt 60 mg feinem TiO₂ in 21% der untersuchten Tiere Tumoren nachgewiesen wurden. Nano-TiO₂ zeigte dabei eine ähnlich starke Tendenz, Lungentumoren zu induzieren (56%) wie 5 mg Quarz (DQ-12). Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass die höhere Tumorzinzidenz auf direkten Effekten nach epithelialer Translokation der Nanopartikel in das Interstitium beruht (Borm et al., 2000, 2004).

Nach einmaliger intratrachealer Instillation von 1 mg oder 5 mg pro kg Körpergewicht nano-TiO₂ Partikel (Anatas in Stäbchen (92-233 nm x 20-35 nm) und Kugelform (6 nm)) und feiner TiO₂-Partikel (R-100, Rutil, ~99% TiO₂, ~1% Al) konnten Warheit et al. (2006) reversible Entzündungsreaktionen und Zelldefekte im Lungengewebe beobachten. Die gleiche Menge an instilliertem Quarz führte zu dosisabhängigen Entzündungen mit ersten Anzeichen von Epithelverdickungen und Fibrosen.

In der Folgestudie wurde die Lungentoxizität von drei kommerziell erhältlichen Varianten an nano-TiO₂ (P25 (130 nm); uf-1, 98% TiO₂ 2% Al (136 nm); uf-2, 88% TiO₂ Kern mit SiO₂ (7%) und Aluminium (5%) Coating (159 nm)) mit feinem TiO₂ (R-100, Rutil, (382 nm)) bei gleichen Dosierungen (1 mg und 5 mg/kg Körpergewicht) nach 24 Stunden, 1 Woche, 1 Monat und 3 Monaten verglichen. Die nano-TiO₂-Partikel (uf-1 98% TiO₂ 2% Al (136 nm)) lösten, wie auch das feine TiO₂, nach einmaliger Instillation Entzündungsreaktionen aus, die nach einer Woche abgeklungen. P25 verursachte stärkere Entzündungsreaktionen als die beiden "gecoateten" Varianten und die Rutilform. Im Falle der letztgenannten Formen war die Entzündung erst am Ende des Beobachtungszeitraums von 3 Monaten wieder abgeklungen. Die tracheobronchialen Epithelzellen wiesen nach 24 h eine (transient) signifikant vermehrte Proliferation auf; ein signifikant erhöhter Proliferationsindex der Lungenepithelzellen trat auf bei 5 mg/kg nach 24 Stunden und 3 Monaten (Warheit et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass die Oberflächenmodifikation („Coating“) und die Kristallstruktur (P25 (80% Anatas) und Rutilform) für das toxische Potential wichtig sind. Allgemein scheint die Anatas-Form reaktiver zu sein.

2.2.3 Epidemiologische Studien

Innerhalb der Einwohner Montreals wurde das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, im Zeitraum von 1979 bis 1985 untersucht. Es lagen 857 histopathologisch bestätigte Fälle von Lungenkrebs in der männlichen Bevölkerung (35 bis 70 Jahre) vor. Als Kontrollgruppen dienten 533 zufällig ausgewählte gesunde Personen und 533 an anderen Krebsarten erkrankte Personen. Die Exposition gegenüber TiO_2 oder TiO_2 -Komponenten wurde anhand eines Fragebogens ermittelt. Für 33 Lungenkrebs-Fälle und 43 Referenzteilnehmer wurde eine TiO_2 -Exposition identifiziert (maximal $10 \text{ mg/m}^3 \text{ TiO}_2$). Es gab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen einer Erkrankung an Lungenkrebs und der angegebenen Expositionshäufigkeit oder der Expositionslänge (Boffetta et al., 2001).

In einer in elf europäischen TiO_2 -herstellenden Unternehmen durchgeführten Studie wurden im Zeitraum von 1927 bis 2000 insgesamt 15017 Angestellte untersucht. Bei einer jährlichen durchschnittlichen Belastung der Arbeiter gegenüber $0,1$ bis $1,0 \text{ mg/m}^3 \text{ TiO}_2$ wurde keine Korrelation zwischen der erhöhten Anzahl von Todesfällen aufgrund von Lungenkrebs und der Exposition gegenüber TiO_2 festgestellt (Boffetta et al., 2004).

In einer Kohortenstudie mit eingebetteter Fall-Kontroll-Studie wurden zwischen 1956 und 1985 aus zwei US-Fabriken 1575 TiO_2 -exponierte Arbeiter beobachtet. Es wurde kein erhöhtes Lungenkrebsrisiko für TiO_2 -verarbeitende Angestellte (bis 20 mg/m^3) im Vergleich zur Referenzgruppe festgestellt. Die eingebettete Fall-Kontroll-Analyse mit 27 Lungenkrebs-Todesfällen und 381 Verstorbenen in der Kontrolle ergab ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen TiO_2 -Exposition und Lungenkrebs (Chen und Fayerweather, 1988).

In einer weiteren Kohortenstudie wurden 4241 TiO_2 -verarbeitende Angestellte in vier US-Unternehmen untersucht. Die Studienteilnehmer arbeiteten ab Januar 1960 für mindestens sechs Monate mit TiO_2 (maximale Belastung $50 \text{ mg/m}^3 \text{ TiO}_2$) und wurden bis Dezember 2000 beobachtet. Es wurde kein erhöhtes Lungenkrebsrisiko bei TiO_2 -verarbeitenden Angestellten beobachtet (Fryzek et al., 2003).

Die verfügbaren epidemiologischen Studien liefern keine Daten zur primären Partikelgröße oder der Größenverteilung der TiO_2 -Partikel, d.h. diese Studien enthalten auch keine Angaben zur Exposition gegenüber nano- TiO_2 . Rückschlüsse auf ein Krebsrisiko, das mit einer Exposition gegenüber nano- TiO_2 assoziiert ist, können auf der Basis der vorliegenden epidemiologischen Untersuchungen nicht gezogen werden.

2.2.4 Fazit zu nano- TiO_2

2.2.4.1 Karzinogenes Potential von nano- TiO_2

Es liegen derzeit nur wenige Langzeitstudien vor, die die karzinogene Wirkung von nano- TiO_2 untersucht haben. Inhalationsstudien an der Ratte ergaben eine erhöhte Inzidenz von Lungentumoren bei hohen Konzentrationen von nano- TiO_2 (Heinrich et al., 1995) und weisen auf ein mögliches karzinogenes Potential von nano- TiO_2 hin. Eine erhöhte Häufigkeit von Lungentumoren trat ebenso bei Untersuchungen an der Ratte mit mehrfacher Instillation von nano- TiO_2 auf (Pott und Roller, 2005). Bisher vorliegende epidemiologische Untersuchungen zu TiO_2 sind nicht aussagekräftig, Studien die spezifisch auf nano- TiO_2 ausgerichtet sind, fehlen.

Zur karzinogenen Wirkung von nano- TiO_2 kann gegenwärtig keine endgültige Aussage für den Menschen getroffen werden. Auf der Basis der Tierdaten ist lediglich ein Verdacht auf ein karzinogenes Potential von nano- TiO_2 für den Menschen auszusprechen, da die bisher vorliegenden Untersuchungen diesbezüglich nicht hinreichend belastbar sind. Weitere Un-

tersuchungen sind zur Absicherung der Befunde in der Ratte als auch in anderen Spezies, zur Aufklärung des Wirkmechanismus und zur Epidemiologie erforderlich.

2.2.4.2 Qualitativer Vergleich der karzinogenen Potentiale

Ein direkter Vergleich von nano-TiO₂ mit feinem TiO₂ in einer Langzeit-Inhalationsstudie existiert bisher nicht. Ein Vergleich in der Studie von Pott und Roller (2005) gibt einen ersten Hinweis auf eine mögliche höhere tumorinduzierende Potenz (gemessen an den Inzidenzen der tumorerkrankten Tiere) von nano-TiO₂. Diese Vermutung bedarf einer Bestätigung durch geeignete weitere Studien unter Einbeziehung verschiedener Nanoformen (bisher nur P25 untersucht).

In den Schlüsselstudien, die einen Hinweis auf ein mögliches karzinogenes Potential von nano-TiO₂ geben (Heinrich et al., 1995, Pott und Roller, 2005), traten Adenome bzw. Adenokarzinome und Plattenepitheliome/-karzinome auf. Aufgrund der beobachteten Tumortypen kann, soweit die wenigen Untersuchungen eine Aussage zulassen, nicht davon ausgegangen werden, dass nanospezifische Tumorerkrankungen induziert wurden.

2.2.4.3 Quantitativer Vergleich der karzinogenen Wirkstärken

Eine quantitative Abschätzung des Krebsrisikos durch Inhalation von TiO₂-Nanomaterialien ist derzeit mit vielen Unsicherheiten behaftet und erfordert weitere Untersuchungen. Instillationsversuche sind geeignet, ein mögliches karzinogenes Potential aufzuzeigen. Sie können als unterstützende Befunde für die Bewertung herangezogen werden. Für die Ableitung von Schwellenwerten und zur quantitativen Risikoermittlung erscheinen Instillationsversuche wegen der artifiziellen Applikationsform, möglicher Artefakte und hoher lokaler Bolusdosierungen dagegen wenig geeignet. Hierzu bedarf es entsprechend der Standardprüfrichtlinien auch für nanoskaliges Material Inhalationsstudien mit mindestens drei Dosierungen, die eine Dosis-Wirkungsbeziehung aufzeigen und die Ableitung einer Benchmark-Dosis oder einer NOAEC (no observed effect concentration) erlauben.

Aus subchronischen Untersuchungen ergaben sich Hinweise, dass nano-TiO₂-Partikel eine stärkere fibrotische Wirkung haben können (Baggs et al., 1997) und bei geringerer Massenkonzentration stärkere Entzündungsreaktionen auslösen können als feinpartikuläres TiO₂ (Bermudez et al., 2002, 2004, Hext et al., 2005). Die vorhandenen toxikologischen Informationen aus Inhalations- und Instillationsversuchen deuten auf eine im Vergleich zur Nicht-Nanoform tendenziell höhere Aktivität der Nanoform(en) bezogen auf die Masse hin.

2.2.4.4 Möglicher Wirkmechanismus

Die tierexperimentellen Studien mit nano-TiO₂ wurden mit hohen Dosierungen durchgeführt und führten zu Wirkungen, die als so genannte ‚Overload Effekte‘ beschrieben sind (Morrow et al., 1988). Eine ausreichend hohe Partikelbelastung im alveolären Raum führt zu einer verminderten Aktivität der Alveolar-Makrophagen. Die unzureichende phagozytäre Clearance vergrößert dann die Wahrscheinlichkeit des Eindringens von Partikeln in das Interstitium. Aus noch nicht ganz verstandenen Gründen ist bei gleicher Masse die phagozytäre Clearance von Nanopartikeln stärker beeinträchtigt als diejenige feiner Partikel des gleichen Materials (Ferin et al., 1992, Oberdörster et al., 1994).

Die geringere Effizienz der Clearance wird zum einen mit einer stärkeren Agglomeration von Nanopartikeln in Verbindung gebracht, die eher zum volumetrischen Overload führt (Pau-luhn, 2009). Andererseits sind direkte zytotoxische Effekte, die aufgrund der größeren Ober-

fläche und der damit verbundenen höheren Reaktivität auftreten, als eigentliche Ursache nicht auszuschließen (Borm et al., 2004, Sager et al., 2008). Die Ergebnisse der subchronischen Instillationsversuche mit TiO₂ von Warheit et al. (2007) deuten darauf hin, dass die Oberflächenmodifikation („Coating“) und die Kristallstruktur (P25 (80% Anatas) versus Rutilform) für das toxische Potential wichtig sind. Allgemein scheint die Anatas-Form reaktiver zu sein. Die Diskussion spiegelt auch die Problematik der Dosismetrik wider (hier Volumen versus Oberfläche).

Als zugrunde liegender Mechanismus für die Tumorentstehung wird derzeit die sekundäre Genotoxizität favorisiert, d.h. oxidativer Stress aufgrund chronischer Entzündungsprozesse. Dabei gilt es, die Rolle der besonderen Partikel-Eigenschaften und/oder deren verlängerte Retention im Lungengewebe sowie der systemischen Verfügbarkeit nach Translokation heraus zu finden. Allerdings kann auch ein primär genotoxischer Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Hierfür sprechen die geringe Größe der Nanopartikel und ihre Fähigkeit, direkt mit intrazellulären Strukturen interagieren zu können.

In der Literatur bestehen jedoch Unsicherheiten über die Annahme einer unschädlichen Schwellendosis. Pott und Roller (2005) postulierten das Fehlen eines Schwellenwerts für die karzinogene Wirkung von Partikeln in der Rattenlunge. Das Fehlen eines Schwellenwerts könnte jedoch auch mit der Verabreichungsform zusammenhängen. So gibt es durchaus Zweifel an der Existenz eines Schwellenwerts bei Instillationsversuchen. Durch die hohe Boluskonzentration können die Abwehrmechanismen der Lunge lokal überfordert werden. Die bisherige Datenlage und der Diskussionsstand reichen für eine Entscheidung bezüglich eines Schwellenwertes nicht aus. Diese Bedenken aufzunehmen und das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Wirkungsschwelle experimentell weiter zu untersuchen, erscheint dringend geboten. Um die Ableitung von Schwellenwerten zu ermöglichen, sind Inhalationsstudien mit stetiger Partikelakkumulation gegenüber Mehrfach-Instillationen den Vorzug zu geben.

Neben dem inhalativen sollte zukünftig auch dem oralen Aufnahmepfad stärkere Beachtung geschenkt werden. So haben kürzlich Trouiller et al. (2009) Hinweise auf genotoxische Effekte *in vivo* in Mäusen nach oraler Aufnahme von nano-TiO₂ (P25) erhalten. Allerdings waren die wirksamen Dosen im Trinkwasser mit bis zu 500 mg/kg Körpergewicht sehr hoch und es wurde ein spezieller Mäusestamm verwendet.

2.2.4.5 Interspezies-Vergleich

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Inhalations- und Instillationsuntersuchungen auf den Menschen wird kontrovers diskutiert. In diesem Zusammenhang wird auch die beobachtete Speziesabhängigkeit der Tumorentwicklung diskutiert. So scheint zwar für Ratten und in geringerem Maße auch für Mäuse, nicht aber für Hamster das "Overload"-Konzept zu gelten (Oberdörster, 1995).

Im Hamster wurde nach inhalativer Aufnahme eine deutlich geringere Konzentration von TiO₂ in der Lunge nachgewiesen, was auf einen schnelleren Clearance-Prozess zurückgeführt wurde. Entzündliche Prozesse oder Fibrosen konnten in Hamstern nicht beobachtet werden (Bermudez et al., 2002, 2004; Hext et al., 2005). Hamster besitzen darüber hinaus andere antioxidative Schutzmechanismen als Ratte und Mensch (Driscoll et al., 2002). Diese physiologische Gegebenheit hat daher dazu geführt, dass partikuläre Stoffe, deren karzinogene oder andere chronische Wirkungen auf entzündlich-oxidativen Schädigungen beruhen, vorzugsweise nicht an Hamstern untersucht werden bzw. solche Daten nicht primär für die Risikobewertung herangezogen werden können. Aus regulatorischer Sicht werden in erster Linie Daten der sensibelsten Tierart berücksichtigt, solange kein ausreichendes Argument für eine Ausnahme spricht.

2.2.4.6 Bewertungen durch wissenschaftliche und regulatorische Gremien

Titandioxid ist Gegenstand mehrerer internationaler und nationaler Bewertungen. Die International Agency for Research on Cancer (IARC) der WHO stuft TiO_2 für den Menschen als möglicherweise karzinogen bei Einatmung ein (Kategorie II B). Die Einstufung erfolgte aufgrund deutlicher Hinweise auf ein karzinogenes Potential im Tierversuch bei unzureichender epidemiologischer Datenlage (Baan, 2007). Die IARC-Einstufung unterscheidet jedoch nicht zwischen ultrafeinen Partikeln (nano- TiO_2) und feinen Partikeln. Sie ist eine wissenschaftliche Empfehlung und zieht nicht automatisch eine in Deutschland oder Europa rechtlich verbindliche Einstufung als Kanzerogen nach sich.

Die MAK-Kommission der DFG-Senatskommission gruppiert die einatembare Staubfraktion von Titandioxid neuerdings in die Kategorie 3A der erwiesenen krebserzeugenden Stoffe im Tier ein. Für Stoffe der Kategorie 3 (A erwiesen, B möglich) ist ein krebserzeugender Wirkmechanismus zwar bekannt, für die Ableitung eines MAK-Wertes fehlen jedoch die erforderlichen Daten, um auf der Basis der vorliegenden Tierexperimente einen NOAEC ableiten zu können⁷. Die aktuelle MAK-Bewertung zieht allerdings nicht ultrafeine Partikel für die Bewertung heran. Ein möglicher Grenzwert für granuläre biobeständige Stäube geringer Toxizität, der auch für Titandioxid-Nanopartikel gelten soll, ist seit längerem in der Diskussion (Greim et al., 2007).

Ein Vorschlag zur möglichen legalen Einstufung von Titandioxid als Karzinogen im Rahmen der CLP Verordnung EG Nr. 1272/2008 sollte sowohl für feine Partikel als auch für spezifische Nanoformen geprüft und gegebenenfalls ein entsprechender Vorschlag zur harmonisierten Einstufung bei der Europäischen Chemikalien Agentur (ECHA) in Helsinki eingereicht werden⁸. US-amerikanische Institutionen – das National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), das National Toxicological Program (NTP), die Occupational Safety & Health Administration (OSHA) und die US-EPA – haben TiO_2 nicht als karzinogen eingestuft.

2.3 Carbon Nanotubes (CNTs)

Als Carbon Nanotubes (CNTs) werden nanoskalige röhrenförmige Gebilde (molekulare Nanoröhren) aus reinem Kohlenstoff bezeichnet, wobei die Kohlenstoffatome eine wabenartige Struktur mit Sechsecken und jeweils drei Bindungspartnern einnehmen. Die offenen oder geschlossenen Röhren-Strukturen können ein- oder mehrwandig sein. CNTs gelten als ein sehr biobeständiges Material. Das Verhalten von CNTs in der Nahrungskette ist nicht bekannt. In der Umwelt wurde bereits für unterschiedliche Organismen die Bioverfügbarkeit von CNTs gezeigt (Helland et al., 2007). CNTs mit einer Faserlänge von $>15 \mu\text{m}$ zeigen strukturelle Ähnlichkeiten mit Asbest und anderen mineralischen Fasern, welche ein nachgewiesenes karzinogenes Potential nach inhalativer Aufnahme besitzen. Asbest wurde als eindeutig

⁷ Unter Kategorie 3 fallen solche Stoffe, die wegen erwiesener oder möglicher krebserzeugender Wirkung Anlass zur Besorgnis geben, aber aufgrund unzureichender Informationen nicht endgültig beurteilt werden können. Die Einstufung ist für diese Stoffe stets vorläufig.

⁸ Eine Einstufung eines Stoffes in Kategorie 1 entsprechend der EU-VO 1272/2008 erfolgt, wenn einschlägige epidemiologische Daten (die einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Exposition von Menschen gegenüber einem Stoff und der Entwicklung von Krebs herstellen und somit als bekanntes Humankarzinogen gelten) und/oder Tierversuchsdaten (deren Beweiskraft ausreicht, um eine karzinogene Wirkung beim Tier nachzuweisen und somit als wahrscheinliches Humankarzinogen gilt) vorliegen.

Eine Einstufung in Kategorie 2 erfolgt für Stoffe, für die aufgrund von Nachweisen aus Studien an Mensch und/oder Tier Verdacht auf karzinogene Wirkung beim Menschen besteht. Eine entsprechende (stoffbezogene) Pauschaleinstufung aller Nanoformen nach GHS-Kriterien ist in jedem Falle schwierig.

krebserregend beim Menschen (Kategorie I) eingestuft, andere mineralische Fasern werden als krebserzeugend (Kategorie II) angesehen.

2.3.1 Inhalationsstudien am Tier

Von Ryman-Rasmussen et al. (2009) wurde gezeigt, dass inhalierte Multi Wall Carbon Nano Tubes (MWCNTs) (1 mg/m^3 und 30 mg/m^3 für 6 Stunden; Helix Material Solutions ($0,5 - 50 \mu\text{m}$)) in Mäusen bereits nach 24 Stunden bis zur Subpleura gelangen. In der Studie wurden weiterhin bereits 2 und 6 Wochen nach einmaliger inhalativer Aufnahme der MWCNTs Fibrosen in der Pleura und der Subpleura beobachtet.

Die Inhalation mit maximal $2,5 \text{ mg/m}^3$ MWCNTs für 5 Tage pro Woche über 13 führte zur Ausbildung von Entzündungen und Granulomen in der Lunge und in lungenassoziierten Lymphknoten. Für die granulomatöse Entzündungsreaktion wurde ein NOEC von unter $0,1 \text{ mg/m}^3$ ermittelt, welcher weit unter dem Arbeitsplatzgrenzwert für einatembare Stäube von 10 mg/m^3 liegt. Die Autoren empfahlen deshalb, strikte industrielle Hygienemaßnahmen während der Be- und Weiterverarbeitung eines solchen Materials einzuhalten (Ma-Hock et al., 2009).

Nach inhalativer Exposition von Mäusen gegenüber MWCNT-Aerosolen einer mittleren Konzentration von 32 mg/m^3 für bis zu 24 Tage akkumulieren kleine Partikel-Aggregate im bronchio-alveolären Bereich. Die MWCNTs drangen in die alveolaren Wände ein und lösten dort Zellproliferation und eine Verdickung der Wände der Lungenbläschen aus (Li et al., 2007).

Die Inhalation von 5 mg/m^3 Single Wall Carbon Nano Tubes (SWCNTs) für 5 Tage/Woche über 4 Wochen führte bei Mäusen zu Entzündungsreaktionen, Kollagendeposition und Granulom- und Fibrosen-Bildung sowie zur Induktion von oxidativem Stress im Lungengewebe. Ebenfalls wurde eine Mutation im Genlokus des Protoonkogens *K-ras* nach Exposition der Tiere mit SWCNTs beobachtet (Shvedova et al., 2005, 2008).

2.3.2 Tierstudien mit intratrachealer Instillation

Die einmalige Instillation von $0,5 \text{ mg}$ MWCNTs (Rice University) führte zu einer starken Aggregatbildung und Klumpung des Fremdmaterials im oberen Respirationstrakt von Mäusen (Lam et al., 2004). Die einmalige Instillation von 5 mg/kg SWCNTs in Ratten führte ebenfalls zu einer mechanischen Verlegung durch Verklumpung in den oberen Atemwegen und dem Tod einiger Tiere 24 Stunden nach Exposition. Die überlebenden Tiere wiesen transiente Entzündungsreaktionen und nachfolgend multifokale Granulombildung auf (Warheit et al., 2004).

Die Instillation von $0,05 \text{ mg}$ MWCNTs führte zu einer starken Aggregatbildung und Klumpung des Fremdmaterials im oberen Atemtrakt. Diese gingen mit Entzündungen der Bronchien und der Zerstörung der alveolaren Wandstruktur einher (Li et al., 2007).

2.3.3 Tierstudien mit intraperitonealen Injektionen

Eine intraperitoneale Applikation von $50 \mu\text{g}$ MWCNTs ($\text{NT}_{\text{long}1}$ $40 - 50 \text{ nm} \times 13 \mu\text{m}$; Mitsui & Co.; $\text{NT}_{\text{long}2}$ $20 - 100 \text{ nm} \times 56 \mu\text{m}$, University of Manchester) führte nur bei der Langform der MWCNTs in Mäusen zur Bildung von Granulomen. Die gleichzeitig applizierte positive Asbestkontrolle zeigte ähnliche Wirkungen. Wurden die MWCNTs gemahlen oder in sich

verknäuelte MWCNTs (NT_{tang1} 15 nm x 1-5 μm und NT_{tang2} 15 nm x 5-20 μm) eingesetzt, wurden keine asbestähnlichen Wirkungen beobachtet (Poland et al., 2008).

In p53-defizienten Mäusen, welche als besonders sensitiv gegenüber Asbestexposition gelten, induziert die intraperitoneale Injektion von 3 mg MWCNTs (MWCNT-7, 100 nm x 1 - 10 μm MITSU) Mesotheliome und eine erhöhte tumorbedingte Sterblichkeit der Tiere (Takagi et al., 2008).

In einer weiteren Studie wurde nach Injektion von MWCNTs (2 mg oder 20 mg; selbst hergestellt, 11 nm x 0,7 μm) in den Bauchraum von Ratten kein Hinweis auf Tumorbildungen gesehen (Muller et al., 2009).

2.3.4 Fazit

Dem BfR liegen keine Langzeitstudien am Tier vor, die eine Aussage zum möglichen karzinogenen Potential von CNTs nach Inhalation erlauben. Ebenso fehlen epidemiologische Untersuchungen. CNTs, welche einmalig in hohen Dosen in den Bauchraum transgener p53 knockout-Mäuse injiziert wurden, induzierten Mesotheliome im Peritoneum (Tagaki et al., 2008).

In Inhalationsstudien bis zu 13 Wochen führten CNTs in der Lunge zu entzündlich-fibrotischen Läsionen bis hin zur Granulombildung. Nach Aufnahme der CNTs im Atemtrakt können sich einzelne Röhren und Agglomerate ablagern und dort auch dauerhaft verbleiben.

Die vorliegenden Studien mit intratrachealer Applikation sind aufgrund der Verlegung der Atemwege durch verklumpendes Material nicht aussagekräftig.

Die Verteilung von CNTs im Körper und ihr Migrationsverhalten sind nicht aufgeklärt. Ein Vordringen ausgewählter CNTs nach inhalativer Aufnahme bis zur Subpleura wurde kürzlich beschrieben (Ryman-Rasmussen et al., 2009). Das Einwandern der CNTs aus dem Atemtrakt in den Brustraum und eine Induktion von Tumoren in der Brusthöhle kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

Aussagekräftige Langzeitstudien mit Inhalation von CNTs sind zur Ermittlung des karzinogenen Potentials erforderlich.

2.4 Amorphes Siliziumdioxid (SiO_2)

Im Unterschied zur kristallinen Form, die als Quarzstaub Silikose auslöst, wird amorphes Siliziumdioxid als weitgehend ungefährliches Material angesehen. Kristalline SiO_2 -Partikel können sowohl akute als auch chronisch-entzündliche Atemwegserkrankungen auslösen (Bowden und Adamson, 1984; Morgan et al., 1980). Die chronische Inhalation von kristallinem Silikat induziert in Rattenlungen Fibrose (Reiser und Last, 1979) und Krebs (IARC, 1997; Saffiotti, 1992). Die Schäden werden vorwiegend durch zytotoxische Effekte der kristallinen Form im Gewebe verursacht.

2.4.1 Tierstudien mit inhalativer Aufnahme oder intratrachealer Instillation

Sehr hohe Dosen an amorphem SiO_2 (Aerosil 150, 22 nm; Aerosil 200, 12 nm; Aerosil R974, 12 nm; Sipernat 22S, 18 nm; Ludox kolloidal Suspension 22 nm) können nach inhalativer Aufnahme oder intratrachealer Instillation akute Entzündungen in der Lunge der Versuchstiere auslösen, welche nach wenigen Tagen wieder abklingen (Reuzel et al., 1991; Lee und Kelly, 1993; Lewinson et al., 1994; Ernst et al., 2002). Dennoch wurden auch bleibende Schäden in Form von Granulomen im Interstitium nach Inhalation (Reuzel et al., 1991) und

intratrachealer Instillation (Lee und Kelly, 1993) von amorphem SiO_2 (Ludox kolloidal Suspension, 22 nm) beobachtet.

In der 19-Stäube-Studie von Pott und Roller (2005) wurde Ratten insgesamt 15 mg amorphes SiO_2 (Si S5505, 14 nm) intratracheal instilliert. Tumoren traten mit einer Häufigkeit von 6% in den behandelten Tieren auf. In der mitgeführten Positivkontrolle wurden die Tiere mit 3 mg DQ12 Quarz behandelt, 80% der Tiere dieser Gruppe entwickelten Tumoren. Die geringe Anzahl an Tumoren durch amorphes SiO_2 wurde auf die gute Löslichkeit und die damit einhergehende geringe Biopersistenz zurückgeführt (Borm et al., 2004). Amorphes SiO_2 erwies sich nach akuter und chronischer oraler Aufnahme als nicht toxisch sowie nicht karzinogen (Lewinson et al., 1994).

2.4.2 Epidemiologische Studien

Eine von Pelucchi et al. (2006) durchgeführte Metaanalyse von 28 Kohorten- und 15 Fallkontrollstudien zum Thema Silikateexposition und Ausbildung von Lungentumoren kommt zu dem Schluss, dass der Beitrag von Silikat in Abwesenheit einer Silikose an der Krebsentstehung noch ungeklärt ist. Bei der Verarbeitung von Silikat sind Arbeiter neben amorphem Silikat auch kristallinen Silikatstäuben ausgesetzt. Darüber hinaus liegen keine Angaben vor, ob (nanoförmiges) amorphes SiO_2 Untersuchungsgegenstand in den Studien war.

2.4.3 Fazit zu amorphem SiO_2

Nach heutigem Kenntnisstand besitzt amorphes SiO_2 nach inhalativer und oraler Aufnahme kein karzinogenes Potential. Die Bedeutung der 6% Tumore nach Instillation von amorphem SiO_2 ist fraglich (Pott und Roller, 2005), da keine weiteren Daten vorliegen, die einen Verdacht auf ein mögliches karzinogenes Potential stützen. Es kann jedoch nach chronischer inhalativer Aufnahme großer Mengen zur Ausbildung einer Staublunge (Pneumokoniose) kommen, die mit Fibrosen, einer Verdickung der Pleura und Beeinträchtigungen der Lungenfunktion verbunden ist (Mazziotti et al., 2002; Merget et al., 2002).

Synthetisches amorphes Silikat besteht aus ultrafeinen primären Partikeln mit einer sehr großen Oberfläche und wird sehr schnell, aufgrund der hohen Löslichkeit, aus der Lunge eliminiert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass amorphes SiO_2 durch Einwandern in den Interstitialraum toxische Eigenschaften aufweisen kann.

Für eine abschließende Bewertung sollten aussagekräftige Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung von amorphem SiO_2 in Nanoform durchgeführt werden.

3 Gegenwärtiger Kenntnisstand über die Freisetzung von Nanopartikeln und deren Agglomerate aus Produkten

Generelle Aussagen zur Freisetzung von Nanopartikeln aus unterschiedlichen Produkten und deren Anwendungen sind gegenwärtig noch nicht möglich. Erste Untersuchungen zur Freisetzung von Nanopartikeln aus Produkten finden zurzeit statt, zum Beispiel eine Untersuchung von Emissionen bei der Bearbeitung von Nanomaterial-haltigen Lacken (Vorbau et al., 2009).

Informationen über die Freisetzung von Nanopartikeln stehen bisher kaum zur Verfügung. Wichtige nächste Schritte sind die Entwicklung von Messverfahren zur Bestimmung der

Emissionen und Schätzung der Freisetzungsmengen sowie der daraus resultierenden Exposition und Immission für Mensch und Umwelt.

Von einer „besonders kritischen“ Exposition ist dann auszugehen, wenn a) eine hohe Exposition und/oder b) eine hohe Toxizität des Materials besteht. Die Exposition ist abhängig von der Art des Produktes und der Form der Anwendung.

Für die Freisetzung von Nanopartikeln aus Produkten ergibt sich aus dem derzeitigen Kenntnisstand folgende Reihung für die Expositionsrelevanz:

- luftgetragen > flüssig > auf einer festen Matrix > in einer festen Matrix.

Für die Expositionspfade erfolgt — gereiht nach ihrer Bedeutung — die Reihung:

- inhalativ >> oral > dermal.

Für die Anwendung erfolgt die Reihung:

- im/am Menschen > direkt durch einen Menschen > in der Umwelt/an Produkten > in Prozessen / Maschinen (geschlossen).

Entsprechend der oben aufgeführten Reihung sind insbesondere Sprays, die Nanopartikel enthalten und vom Verbraucher angewendet werden, als kritisch hinsichtlich einer möglichen Exposition und in Abhängigkeit von den toxischen Eigenschaften auch kritisch hinsichtlich eines möglichen Gesundheitsrisikos zu betrachten.

Problematisch ist, dass es derzeit noch kein ausgereiftes, routinemäßig einsetzbares Monitoringsystem zur Erfassung von Produkt-Nanoaerosolen für die Ableitung von Grenz- und Richtwerten gibt. Dies beruht auf der komplexen Messmethodik und der Unsicherheit in Bezug auf eine adäquate Dosimetrie (v.a. Masse, Partikelzahl, Oberfläche, Volumen). Adäquat ist eine Dosimetrie, wenn i) Effekte klar von Hintergrundrauschen differenziert werden können, und ii) eine gute Korrelation zwischen Dosis und Wirkung darstellbar ist und damit die Ableitung von Grenzwerten ermöglicht. In diesem Bereich sind jedoch die Kenntnisse noch sehr lückenhaft. Erste Ansätze in den Arbeitsgruppen von CEN und ISO zur Bereitstellung von möglichen Referenzverfahren sind auf dem Wege.

Zum Verhalten von Nanomaterialien in der Nahrungskette existieren derzeit keine ausreichenden Daten. Auch zur Überwachung stehen keine geeigneten Routinemethoden zum Nachweis von nanoskaligen Kontaminanten und Rückständen in Nahrungsmitteln zur Verfügung. Diese sollten, insbesondere für biopersistente Nanomaterialien und Nanomaterialien mit langer Verweildauer im Organismus (Akkumulationsgefahr) entwickelt werden.

Andere wichtige Expositionsszenarien, die nicht direkt in die obige Reihung passen, betreffen die Bearbeitung von Materialien, die Nanomaterialien enthalten, z.B. das Schleifen von entsprechenden Lacken oder die Bearbeitung von Baumaterialien, die Freisetzung durch Alterungsprozesse der Produkte, die Entsorgung und somit den gesamten Lebenszyklus von Nanomaterialien.

Als „besonders kritische“ Expositionen sind auch wiederholte Belastungen mit geringen Einzeldosen einer persistenten Nanoform zu betrachten, die zu chronischen, potentiell nicht reversiblen Wirkungen im Organismus führen kann.

4 Sachgerechte Einstufung von Nanomaterialien

Grundsätzlich sind die bestehenden Kriterien für die Einstufung von Karzinogenen entsprechend der CLP-VO (EG) Nr. 1272/2008 anzuwenden. Da stoffrechtlich die Nanoformen bisher keine eigene Stoffkategorie darstellen, sondern unter die Regelungen für feine Partikel

des betreffenden Stoffes fallen, wären bei entsprechenden Einstufungen des Stoffes als Karzinogen im Anhang VI der CLP-VO (EG) 1272/2008 auch die Nanoformen betroffen. Hier ist eine regulatorische Anpassung zur Definition der Stoffidentität von Nanoformen erforderlich.

Wie für feine Partikel eines Stoffes sind die Daten zur Tumorstoffwirkung, zum Mechanismus der Karzinogenität und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen entscheidend. Für Nanomaterialien bestehen jedoch erhebliche Daten- und Kenntnislücken. Folglich sind die Kriterien für die Bewertung nanospezifischer, Krebs erzeugender Eigenschaften dem Erkenntnisgewinn folgend anzupassen.

Hinsichtlich der Prüfmethodik sind nanospezifische Eigenschaften zu berücksichtigen und entsprechende Parameter zu identifizieren (z.B. Oberflächenreaktivität, Kristallinität, Form, Aggregations- bzw. Agglomerationsverhalten, Toxikokinetik). Dies betrifft auch mögliche Veränderungen des Prüfmaterials in Trägersubstanzen und Vehikeln. Von der OECD werden derzeit Methoden und Strategien für eine Anpassung und Standardisierung von Prüfrichtlinien entwickelt, die auch der europäischen Chemikalienprüfung gemäß der REACH-VO dienlich werden sollen.

An die nanospezifischen Eigenschaften angepasste Prüfrichtlinien werden zukünftig die Datenlage zu Nanomaterialien verbessern und eine Anpassung der Einstufungskriterien nach sich ziehen. Wie die Analyse der Daten zu den hier bewerteten Stoffbeispielen exemplarisch gezeigt hat, sind für die Bewertung des karzinogenen Potentials und somit zur Entscheidung über eine notwendige Einstufung von Nanomaterialien noch eine Reihe offener Fragen zur Nanospezifität toxischer Effekte zu klären.

Eine differenzierte Einstufung für feine Partikel und für spezifische Nanopartikel bei sonst gleicher Stoffidentität wird als erforderlich betrachtet, weil z.B. die gesonderte Einstufung einer Nanoform als Karzinogen und die Nicht-Einstufung der feinen Partikelform prinzipiell möglich ist. Ferner können sich auch verschiedene Nanoformen eines Stoffes in ihrem karzinogenen Potential unterscheiden und unterschiedlich eingestuft werden. Möglich ist weiterhin, dass aufgrund der Daten zur Karzinogenität eine Einstufung der feinen Partikelform in Kategorie 3, für eine geprüfte Nanoform jedoch in die Kategorie 2 oder 1 erforderlich ist.

Eine pauschale Einstufung aller Nanoformen als Karzinogen, wenn die feinen Partikel eines Materials als solche eingestuft sind, würde von der bisherigen Praxis der Daten-basierten Einstufung aufgrund von positiven Karzinogenitätsstudien, epidemiologischen Studien und SAR-Betrachtungen abweichen.

Einstufungen nicht-genotoxischer Nanomaterialien oder Nanomaterialien enthaltender Stoffe ohne Nachweis des karzinogenen Potentials in Tierstudien auf der Basis anderer Testsysteme sind erst denkbar, wenn ausreichendes Wissen über die Tumorentstehung durch spezifische Nanomaterialien und aussagekräftige validierte Screeningtests vorhanden ist.

5 Referenzen

- Baan RA (2007) Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhal. Toxicol.* 19 (s1):213-228
- Baggs RB, Ferin J, Oberdörster G (1997) Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet. Pathol.* 34(6):592-597
- Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2002) Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* 70(1):86-97
- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* 77(2):347-357
- Boffetta P, Gaborieau V, Nadon L, Parent MF, Weiderpass E, Siemiatycki J (2001) Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal. *Scand J. Work. Environ. Health.* 27(4):227-32
- Boffetta P, Soutar A, Cherrie JW, Granath F, Andersen A, Anttila A, Blettner M, Gaborieau V, Klug SJ, Langard S, Luce D, Merletti F, Miller B, Mirabelli D, Pukkala E, Adami HO, Weiderpass E (2004) Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer Causes Control* 15(7):697-706
- Borm PJA, Schins RPF, Albrecht C (2004) Inhaled particles and lung cancer. Part B: Paradigms and risk assessment. *Int. J. Cancer* 110:3-14
- Borm, PJA, Hohl D, Steinfartz Y, Zeittrager I, Albrecht C (2000) Chronic inflammation and tumor formation in rats after intratracheal instillation of high doses of coal dusts, titanium dioxides, and quartz. *Inhal. Toxicol.* 12 (suppl 3):225-231
- Bowden DH, Adamson IYR (1984) The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 144(3):149-161
- Chen JL, Fayerweather WE (1988) Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide. *J. Occup. Med.* 30(12):937-942
- Driscoll KE, Carter JM, Borm PJA (2002) Antioxidant defense mechanisms and the toxicity of fibrous and nonfibrous particles. *Inhal. Toxicol.* 14(1):101-118
- Ernst H, Rittinghausen S, Bartsch W, Creutzenberg O, Dasenbrock C, Görlitz BD, Hecht M, Kairies U, Muhle H, Müller M, Heinrich U, Pott F (2002) 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. Toxicol. Pathol.* 54(2):109-126
- Ferin J, Oberdorster G, Penney DP. (1992). Pulmonary Retention of Ultrafine and Fine Particles in Rats. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 6: 535-542
- Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK, Blot WJ (2003) A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *J Occup. Environ. Med.* 45(4):400-409
- Greim, H; Ziegler-Skylakakis, K. (2007). Risk assessment for biopersistent granular particles. *Inhal Toxicol* 19 Suppl 1: 199-204

- Heinrich U, Fuhst R, Rittinghausen S, Creuzenberg O, Bellmann B, Koch W, Levsen K (1995) Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and two Different Strains of Mice to Diesel Engine Exhaust, Carbon Black, and Titanium Dioxide. *Inhal. Toxicol.* 7(4):533-556
- Helland A, Wick P, Koehler A, Schmid K, Som C (2007) Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 115(8):1125-1131
- Hext PM, Tomenson JA, Thompson P (2005) Titanium dioxide: inhalation toxicology and epidemiology. *Ann. Occup. Hyg.* 49(6):461-472
- IARC (Ed.): IARC-Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Vol. 68: Silica. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1997, pp. 41-42
- Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL (2004) Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77(1):126-134
- Lee KP, Henry NW 3rd, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF (1986) Pulmonary response to impaired lung clearance in rats following excessive TiO₂ dust deposition. *Environ. Res.* 41(1):144-167
- Lee KP, Kelly DP. (1993) Translocation of particle-laden alveolar macrophages and intra-alveolar granuloma formation in rats exposed to Ludox colloidal amorphous silica by inhalation. *Toxicology* 77(3):205-222
- Lee KP, Trochimowicz HJ Reinhardt CF (1985a) Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 79(2):179-92
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF (1985b) Transmigration of titanium dioxide (TiO₂) particles in rats after inhalation exposure. *Exp. Mol. Pathol.* 42(3):331-343
- Lewinson J, Mayr W, Wagner H (1994) Characterization and toxicological behavior of synthetic amorphous hydrophobic silica. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 20(1):37-57
- Li JG, Li WX, Xu JY, Cai XQ, Liu RL, Li YJ, Zhao QF, Li QN (2007) Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ. Toxicol.* 22(4):415-421
- Ma-Hock L, Treumann S, Strauss V, Brill S, Luizi F, Mertler M, Wiench K, Garmer A, van Ravenzwaay B, Landsiedel R (2009) Inhalation Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes in Rats Exposed for 3 Months. *Toxicol. Sci.* 112(2):468-481
- Mazziotti S, Costa C, Ascenti G, Lamberto S, Scribano E (2002) Unusual pleural involvement after exposure to amorphous silicates (Liparitosis): report of two cases. *Eur. Radiol.* 12(5):1058-1060
- Merget R, Bauer T, Küpper HU, Philippou S, Bauer HD, Breitstadt R, Bruening T (2002) Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Arch. Toxicol.* 75(11-12):625-634
- Morgan A, Moores SR, Holmes A, Evans JC, Evans NH, Black A (1980) The effect of quartz, administered by intratracheal instillation, on the rat lung. I. The cellular response. *Environ. Res.* 22(1):1-12
- Morrow PE (1988). Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs. *Fundam. Appl. Toxicol.* Apr;10(3):369-84.

Muhle H, Mermelstein R, Dasenbrock C, Takenaka S, Mohr U, Kilpper R, MacKenzie J, Morrow P (1989) Lung response to test toner upon 2-year inhalation exposure in rats. *Exp. Pathol.* 37(1-4):239-242

Muller J, Delos M, Panin N, Rabolli V, Huaux F, Lison D (2009) Absence of carcinogenic response to multi-wall carbon nanotubes in a 2-year bioassay in the peritoneal cavity of the rat. *Toxicol. Sci.* 110 (2): 442-48

Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8(7):543-557

Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE (1994) Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 5:173-9.

Oberdörster G (1995) Lung particle overload: implications for occupational exposures to particles. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 21(1):123-135

Pauluhn J. (2009). Comparative pulmonary response to inhaled nanostructures: considerations on test design and endpoints. *Inhal. Toxicol* 21: 40-54.

Pelucchi C, Pira E, Piolatto G, Coggiola M, Carta P, La Vecchia C (2006) Occupational silica exposure and lung cancer risk: a review of epidemiological studies. *Ann. Oncol.* 17(7):1039-1050

Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WAH, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W, Donaldson K (2008) Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* 3(7):423-8

Pott F, Roller M (2005) Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur. J. Oncol.* 10(4):249-281

Reiser KM, Last JA (1979) Silicosis and fibrogenesis: fact and artifact. *Toxicology* 13(1):51-72

Reuzel PGJ, Bruijntjes JP, Feron VJ, Woutersen RA (1991) Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Food Chem. Toxicol.* 29(5):341-354

Roller M (2009) Carcinogenicity of inhaled nanoparticles. *Inhal Toxicol.* 21 (1):144-157

Ryman-Rasmussen JP, Cesta MF, Brody AR, Shipley-Phillips JK, Everitt JL, Tewksbury EW, Moss OR, Wong BA, Dodd DE, Andersen ME, Bonner JC (2009) Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nat. Nanotechnol.* 4(11):747-751

Saffiotti U. (1992) Lung cancer induction by crystalline silica. *Prog. Clin. Biol. Res.* 374:51-69

Sager TM, Kommineni C, Castranova V. 2008. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: Role of particle surface area. *Particle and Fibre Toxicology* 5.

Shvedova AA, Kisin E, Murray AR, Johnson VJ, Gorelik O, Arepalli S, Hubbs AF, Mercer RR, Keohavong P, Sussman N, Jin J, Yin J, Stone S, Chen BT, Deye G, Maynard A, Castranova V, Baron PA, Kagan VE (2008) Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 295(4):L552-565

Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P (2005) Unusual inflammatory and fibro-

genic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289(5):L698-708

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J (2008) Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J. Toxicol. Sci.* 33(1):105-16

Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. (2009). Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. *Cancer Research* 69: 8784-8789.

Vorbau M, Hillemann L, Stintz M (2009) Method for the characterization of the abrasion induced nanoparticle release into air from surface coatings. *J. Aero. Sci.* 40(3):209-217

Warheit DB, Frame SR (2006) Characterization and reclassification of titanium dioxide-related pulmonary lesions. *J. Occup. Environ. Med.* 48(12):1308-1313

Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR (2004) Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77(1):117-125

Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM (2007) Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230(1):90-104

Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, Colvin VL, Reed KL, (2006) Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol. Sci.* 91(1):227-236