

TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNGEN

ISBN 0937-4248

TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG

Ausgabe 11/00

ISSN 0937-4248

o-Chlornitro- benzol

Nr. 73

CAS-Nr. 88-73-3



BG Chemie
Berufsgenossenschaft der
chemischen Industrie

ISSN 0937-4248

Die Erstellung der TOXIKOLOGISCHEN BEWERTUNGEN ist nach bestmöglicher Sorgfalt erfolgt, jedoch ist eine Haftung bei fehlerhaften Angaben oder Bewertungen ausgeschlossen.

© Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Heidelberg

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung, vorbehalten. Nachdrucke - auch auszugsweise - nur mit ausdrücklicher Genehmigung der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie.

Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie
Postfach 10 14 80, 69004 Heidelberg
Telefon: 06221 523 (0) 400
E-Mail: praevention@bgchemie.de
Internet: www.bgchemie.de

o-Chlornitrobenzol

o-Chloronitrobenzene

Zu m-Chlornitrobenzol (Nr. 74) liegt ebenfalls eine TOXIKOLOGISCHE BEWERTUNG vor, die zum Vergleich herangezogen werden kann.

1 Zusammenfassung und Bewertung

o-Chlornitrobenzol wird bei entsprechender Exposition sowohl über die Haut und den Magen-Darm-Trakt als auch über die Atemwege vom Körper aufgenommen. In Untersuchungen mit dem ¹⁴C-markierten Stoff an Ratten konnte gezeigt werden, dass o-Chlornitrobenzol nach oraler Verabreichung bis zu 80 % und nach offener dermaler Verabreichung zu mindestens 40 % aufgenommen wird. Der wesentliche Teil des Stoffes wird in Form von Metaboliten innerhalb der ersten 24 Stunden mit dem Urin (60 bis 80 % der aufgenommenen Menge) und mit den Faeces (20 bis 30 % der aufgenommenen Menge) wieder ausgeschieden. Bei sehr hohen Dosierungen, wie z. B. 200 mg/kg Körpergewicht oral, erfolgt die Ausscheidung über den Urin verzögert und die Ausscheidung über die Faeces ist stark unterdrückt. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung des enterohepatischen Kreislaufes, aber keinerlei Anzeichen für eine Kumulation von o-Chlornitrobenzol oder von einem seiner Metaboliten. Im Gewebe wird nur ein sehr kleiner Teil der verabreichten Radioaktivität gefunden. Hauptwege des Metabolismus von o-Chlornitrobenzol im Körper sind die Reduktion der Nitro-Gruppe zur Amino-Gruppe und die Hydroxylierung am Benzol-Ring. Gebildet werden neben o-Chloranilin die entsprechenden Nitro- und Aminophenole, die als Konjugate mit Glukuronsäure und Schwefelsäure ausgeschieden werden. o-Chloranilin tritt auch unkonjugiert in Urin und Faeces auf. Bei der Reduktion der Nitro-Gruppe zur Amino-Gruppe entsteht als sehr reaktives Zwischenprodukt die Hydroxylamin-Verbindung, die sowohl in vivo an Ratten als auch in vitro nachgewiesen worden ist.

Bei oraler bzw. dermaler akuter Applikation erweist sich o-Chlornitrobenzol als gesundheitsschädlich bis giftig. Als orale LD₅₀ für Ratten liegen Werte zwischen 144 und 560 mg/kg Körpergewicht vor, für Mäuse zwischen 135 und 440 mg/kg Körpergewicht. Für Kaninchen beträgt die orale LD₅₀ 280

mg/kg Körpergewicht und die dermale LD₅₀ 355 bis 445 mg/kg Körpergewicht. Männliche Ratten zeigen eine dermale LD₅₀ von 655 mg/kg Körpergewicht und weibliche Ratten von 1320 und 1796 mg/kg Körpergewicht. Als typisches Vergiftungssymptom tritt Zyanose auf. Bei der einmaligen Behandlung mit niedrigen o-Chlornitrobenzol-Dosierungen wird an Ratten und Katzen Methämoglobinämie festgestellt. Die Bestimmung der akuten Toxizität nach Inhalation ist wegen des geringen Dampfdruckes von o-Chlornitrobenzol bei 31,8 °C Umgebungstemperatur durchgeführt worden und ergab eine approximative LC₅₀ für Ratten von 3200 mg/m³.

Bei Untersuchungen an Kaninchen zeigt o-Chlornitrobenzol keine haut- und augenreizenden Wirkungen. An Ratten und Meerschweinchen durchgeführte Untersuchungen, die nur unvollständig dokumentiert sind und in denen heute nicht mehr gebräuchliche Methoden benutzt worden sind, geben einen Hinweis auf eine sensibilisierende Wirkung, lassen aber eine abschließende Bewertung nicht zu.

In einer Reihe von Untersuchungen, in denen o-Chlornitrobenzol über 14 Tage, 4 Wochen, 3 bzw. 7 Monate oral oder durch Inhalation an Ratten oder Mäuse verabreicht wurde, erweist sich das hämatopoetische System aufgrund der starken Methämoglobinbildung, die zu einer hämolytischen Anämie führt, als Hauptzielorgan der toxischen Wirkung des Stoffes. In allen Untersuchungen wird unabhängig von Spezies und Verabreichungsweg durch die Gabe von o-Chlornitrobenzol der Methämoglobingehalt im Blut stark erhöht und der Hämoglobingehalt gesenkt. Weitere Veränderungen sind Senkung der Zahl der Erythrozyten und Leukozyten sowie des Hämatokrits, Erhöhung der Zahl der Lymphozyten, Thrombozyten und Retikulozyten und eine starke Erhöhung der Bildung von Heinz-Körpern. Soweit untersucht ist die Milz dunkel gefärbt, vergrößert und das Milzgewicht erhöht. In der Milz zeigt sich eine Hämosiderinablagerung, eine leichte bis mittlere Hämatopoese und eine minimale Hyperplasie der roten Pulpa. Schwächer sind die Einwirkungen auf die Leber. Das Lebergewicht ist nach längerer Behandlung erhöht, die Leberfunktion leicht gestört und histologisch ist eine zentrilobuläre Hypertrophie festzustellen. Die Nierengewichte sind etwas erhöht, ohne dass Funktionsstörungen beobachtet werden. Andere Organe sind nicht betroffen. Für die toxischen Effekte des o-Chlornitrobenzols nach längerer Exposition können aus den vorliegenden Befunden Dosierungen ohne Wirkung nicht abgeleitet werden. In den inhalativen Stu-

dien über 13 Wochen an Maus und Ratte sind die niedrigsten Dosierungen von 7 mg/m³ noch wirksam.

Zahlreiche Untersuchungen zur Gentoxizität von o-Chlornitrobenzol in vitro ergeben widersprüchliche Befunde. In Testen mit *Salmonella typhimurium* werden mit den meisten eingesetzten Stämmen eindeutig negative Ergebnisse erhalten. Die Stämme TA 98 und TA 100 reagieren in 12 bzw. 13 durchgeführten Testen mit metabolischer Aktivierung durch Zusatz von S9-Mix in der Hälfte der Fälle positiv (5 bzw. 7 Untersuchungen), in der anderen Hälfte negativ (7 bzw. 6 Untersuchungen). Ohne metabolische Aktivierung werden fast nur negative Ergebnisse berichtet. Nur in zwei Fällen werden mit dem *Salmonella typhimurium*-Stamm TA 1538 positive Testergebnisse erhalten. Dem stehen zwei negative Ergebnisse aus vergleichbaren Testen entgegen. Negativ verlaufen sind auch mehrere Tests mit *Escherichia coli* und ein umu-Test mit *Salmonella typhimurium* auf DNA-schädigende Wirkung. Widersprüchlich sind auch die Ergebnisse der Tests an Säugerzellen. Von zwei berichteten Untersuchungen zur Chromosomenaberration an CHO-Zellen verläuft eine eindeutig negativ, die andere schwach positiv. An den gleichen Zellen ist auch ein Test auf Schwester-Chromatid-Austausch schwach positiv. Ein Genmutationstest an V79-Zellen und ein UDS-Test an primären Rattenhepatozyten sind eindeutig negativ. Zur Gentoxizität von o-Chlornitrobenzol in vivo liegen nur wenige Daten vor. In zwei geschlechtsgebundenen rezessiven Letal-Testen an *Drosophila melanogaster* erweist sich der Stoff als nicht gentoxisch. Die einmalige intraperitoneale Gabe von 60 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht an Mäusen führt zum vermehrten Auftreten von DNA-Bruchstücken nach Isolierung der Zellkerne aus Leber und Niere der Tiere und Eluierung der DNA daraus. Nach den vorliegenden Untersuchungen ist o-Chlornitrobenzol nicht als gentoxisch zu bewerten und ist auch nicht legal eingestuft worden.

Für die Bewertung der kanzerogenen Wirkung von o-Chlornitrobenzol steht nur das Ergebnis einer Langzeitstudie mit 18-monatiger Behandlung von Ratten und Mäusen zur Verfügung und eine 4-Wochen-Studie an Mäusen zur Ausbildung präneoplastischer Leberfoci und Beeinflussung des Leberzellstoffwechsels durch o-Chlornitrobenzol. In der den heutigen Anforderungen in Durchführung und Dokumentation nicht entsprechenden Langzeitstudie ist nach Gabe von 100 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht (später 50 mg/kg Körpergewicht) im Futter über 18 Monate und einer weiteren Wartezeit von 6 Monaten bei Ratten eine erhöhte Tumorzinzidenz ge-

genüber den Kontrollen beobachtet worden. Es handelt sich um sehr unterschiedliche Tumoren in verschiedenen Organen. Bei der Behandlung mit einer höheren Dosierung an o-Chlornitrobenzol (200 mg und später 100 mg/kg Körpergewicht) sind keine erhöhten Tumorzahlen gegenüber den Kontrollen aufgetreten. Bei Mäusen, die 18 Monate mit o-Chlornitrobenzol behandelt (zunächst 300 mg und später 150 mg/kg Körpergewicht) und die noch weitere 3 Monate mit Normalfutter gehalten worden sind, ist die Anzahl an Hepatomen gegenüber den Kontrollen erhöht gewesen. Auch hier hat sich der Befund bei Männchen nach Gabe einer höheren Dosierung von 600 mg und später 300 mg/kg Körpergewicht nicht bestätigt. Nur die weiblichen Mäuse haben auch bei dieser hohen Dosierung den gleichen Effekt wie bei der niedrigen Dosierung gezeigt. In der 4-Wochen-Studie an Mäusen hat o-Chlornitrobenzol bei Gabe von 5, 50 und 500 mg/kg Körpergewicht mit dem Futter nicht zur Ausbildung der typischen Leberfoci geführt. Es ist jedoch nachgewiesen worden, dass in den Hepatozyten dosisabhängig Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels stattfinden. Insbesondere bei der mittleren und der höchsten Dosis ist es zu einer starken Abnahme der Glukoneogenese und des Glykogengehaltes in den Leberzellen sowie zu einer Steigerung der Glykolyse und des Pentosephosphat-Weges gekommen. Damit wird in den Hepatozyten eine Stoffwechsellage induziert, die nach Interpretation der Autoren dieser Studie die Entstehung von Tumoren möglicherweise begünstigen könnte. Die aufgeführten Untersuchungen geben Hinweise auf ein mögliches kanzerogenes Potential des Stoffes.

Werden weibliche Ratten vom 6. bis 15. Tag der Trächtigkeit täglich mit bis zu 100 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht oral mit der Schlundsonde behandelt, so ergibt sich gegenüber den mitgeführten Kontrollen keine Abweichung der Rate der Fruchtbarkeit, der mittleren Zahl der lebenden und toten Feten, der gesamten Implantationen, der späten Resorptionen und der Corpora lutea oder der Präimplantationsverluste, obgleich es bei dieser hohen Dosierung zu Körpergewichtsverlust und reduzierter Futteraufnahme der Muttertiere kommt. Es werden auch keine biologisch relevanten Unterschiede zur Kontrolle in der Zahl der Jungtiere festgestellt, die eine Missbildung an Organen oder dem Skelett aufweisen. Somit besteht hier weder eine teratogene Wirkung des o-Chlornitrobenzols noch sind embryo- oder fetotoxische Effekte nachweisbar. In einer Studie, in der Ratten und Mäusen über 13 Wochen o-Chlornitrobenzol mit der Atemluft verabreicht

worden ist (Konzentration bis zu 115,2 mg/m³), wird bei Weibchen kein Unterschied des durch Vaginalzytologie bestimmten Östruszyklus gegenüber den Kontrollen festgestellt. Bei den männlichen Ratten kommt es bei der höchsten Konzentration von 115,2 mg/m³ zu einer verminderten Spermatogenese und einer Verringerung des Hodengewichtes. Das Gewicht des Nebenhodens ist gesenkt und die Spermatidköpfe/Hoden sowie die Anzahl der Spermatozoen ist gegenüber der Kontrolle vermindert. Konzentrationen von 57,6 mg/m³ haben bei den Ratten keinen Einfluss auf die männlichen Geschlechtsorgane, obwohl auch bei dieser Konzentration noch erhebliche toxische Effekte auf das hämatopoetische System auftreten. Bei den männlichen Mäusen ist nur eine Verminderung der Spermienbeweglichkeit zu beobachten. Diese Befunde können in Untersuchungen mit kürzerfristigen o-Chlornitrobenzol-Behandlungen nicht bestätigt werden: Bei der einmaligen oralen Gabe von 150 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht an männliche Ratten werden keinerlei Effekte auf den Hoden beobachtet und 4 Wochen lang mit 1120 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht über das Futter behandelte männliche Mäuse reagieren nur mit einer leichten Senkung des Hodengewichtes ohne histopathologisches Korrelat. Eine umfassende Studie zur Reproduktionstoxizität an Mäusen über zwei Generationen, die mit oralen Dosierungen von bis zu 160 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht durchgeführt worden ist, erbringt schließlich keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Fortpflanzung der Tiere, obwohl bei der höchsten Dosierung deutliche toxische Effekte (Methämoglobinämie, Milzvergrößerung) auftreten. Weder die Zahl der Paare mit Nachkommen noch die Zahl der Würfe/Pair, der lebenden Nachkommen, ihrer Geschlechtsverteilung und ihres Gewichtes sind durch die Behandlung mit o-Chlornitrobenzol gegenüber unbehandelten Kontrollen in der ersten oder zweiten Generation beeinflusst. Am Ende der Untersuchung werden an den behandelten Männchen keine Effekte auf die Zahl der Spermien, abnormer Spermien und auf die Spermienbeweglichkeit gefunden.

Die Gefährlichkeit von o-Chlornitrobenzol für den Menschen ist seit langem bekannt, es wird jedoch immer über Mischexpositionen, häufig mit p-Chlornitrobenzol und/oder Nitrobenzol, berichtet. Kritisch ist die schnelle Aufnahme des Stoffes über die Haut und die Atemwege. Akute Vergiftungssymptome sind Methämoglobinämie, Zyanose, Erbrechen, Kopfschmerzen und in schweren Fällen Kollaps.

Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MAK-Kommission) hat o-Chlornitrobenzol in die Kategorie 3 der Krebs erzeugenden Arbeitsstoffe „Stoffe, die wegen erwiesener oder möglicher Krebs erzeugender Wirkung Anlass zur Besorgnis geben, aber aufgrund unzureichender Informationen nicht endgültig beurteilt werden können“ der MAK- und BAT-Werte-Liste eingestuft und wegen der Gefahr der Hautresorption mit „H“ markiert. o-Chlornitrobenzol ist außerdem in die Kanzerogenitätskategorie K3 „Stoffe, die wegen möglicher Krebs erregender Wirkung beim Menschen Anlass zur Besorgnis geben, über die jedoch nicht genügend Informationen für eine befriedigende Beurteilung vorliegen“ sowie in die Kategorie R_F3 der fortpflanzungsgefährdenden Stoffe „Stoffe, die wegen möglicher Beeinträchtigung der Fortpflanzungsfähigkeit (Fruchtbarkeit) des Menschen zur Besorgnis Anlass geben“ gemäß den EU-Einstufungskriterien in der TRGS 905 legal eingestuft worden.

A Toxicological Evaluation on *m*-chloronitrobenzene (No. 74) is also available and can be consulted for comparison.

Summary and assessment

o-Chloronitrobenzene, under appropriate conditions of exposure, is absorbed by the body both via the skin and the gastrointestinal tract as well as via the respiratory tract. Rat studies with the ¹⁴C-labelled chemical show that *o*-chloronitrobenzene absorption is 80% following oral administration and at least 40% after open dermal application. Essentially, most of the compound is excreted within the first 24 hours in the form of metabolites which are found in the urine and faeces (60 to 80% and 20 to 30% of the absorbed amount, respectively). At very high doses, e.g. 200 mg/kg body weight given orally, urinary excretion is delayed and faecal excretion is markedly suppressed. There is evidence to suggest involvement of the enterohepatic cycle, but there are no signs of accumulation of *o*-chloronitrobenzene or one of its metabolites. In tissue, only a very small fraction of the administered radioactivity is recovered. The main metabolic routes for *o*-chloronitrobenzene in the body consist in reduction of the nitro group to an amino group and hydroxylation of the benzene ring. Apart from *o*-chloroaniline, the corresponding nitrophenols and aminophenols are formed, which are excreted as conjugates of glucuronic acid and sulfuric acid. *o*-Chloroaniline also appears in the urine and faeces in the unconjugated form. During reduction of the nitro group to the amino group, the hydroxylamine compound forms as a highly reactive intermediate which has been detected both *in vivo* in rats, and *in vitro*.

Upon acute oral administration and dermal application, *o*-chloronitrobenzene proves to be harmful to toxic. The oral LD₅₀ ranges for the rat and the mouse are 144 to 560 mg/kg body weight and 135 to 440 mg/kg body weight, respectively. For rabbits, the oral LD₅₀ is 280 mg/kg body weight and the dermal LD₅₀ is in the range between 355 and 445 mg/kg body weight. In male rats, the dermal LD₅₀ is 655 mg/kg body weight and in females it is in the range between 1320 and 1796 mg/kg body weight. A typical sign of intoxication is cyanosis. Following single treatment with low doses of *o*-chloronitrobenzene, rats and cats are observed to develop methaemoglobinaemia. The inhalation toxicity of *o*-chloronitrobenzene was determined at an ambient temperature of 31.8 °C because of the chemical's

low vapour pressure, and the resulting LC_{50} was found to be approximately 3200 mg/m^3 for rats.

In rabbit studies, o-chloronitrobenzene has no irritant effect on the skin or eye. Studies conducted in rats and guinea pigs indicate a sensitising potential but because study documentation is incomplete and the methodology employed is no longer in use, they can not serve as a basis for final evaluation of the chemical in this respect.

A series of studies in which rats or mice were exposed to o-chloronitrobenzene by oral administration or inhalation for 14 days, 4 weeks, 3 months and 7 months shows that because of the marked methaemoglobin formation which leads to haemolytic anaemia, the haematopoietic system is the main target organ for the chemical's toxicity. Independently of species and route of administration, o-chloronitrobenzene administration resulted in markedly increased blood methaemoglobin levels and reduced haemoglobin levels in all of the studies. Further changes included decreased red and white blood cell counts and haematocrit, increased lymphocyte, platelet and reticulocyte counts and a marked increase in the formation of Heinz bodies. Where investigated, the spleen showed dark discoloration, enlargement and increased organ weight. Haemosiderin deposits were found in the spleen, as were slight to moderate haematopoiesis and minimal hyperplasia of the red pulp. The effects on the liver were weaker. Liver weight was increased after treatment, hepatic function was slightly impaired and histologically, centrilobular hypertrophy was noted. Kidney weights were slightly increased but no dysfunction was observed. No other organs were affected. It is not possible on the basis of the available data to predict the toxic effects of o-chloronitrobenzene after longer periods of exposure. In the 13-week inhalation studies carried out in the mouse and the rat, even the lowest dose of 7 mg/m^3 was effective.

Numerous studies on the in-vitro genotoxicity of o-chloronitrobenzene have produced contradictory results. In tests on Salmonella typhimurium, most of the strains investigated gave clearly negative results. Out of 12 assays and 13 assays carried out in strains TA 98 and TA 100, respectively, with metabolic activation by addition of S9 mix, half of the tests were positive (5 and 7 tests, respectively), the other half negative (7 and 6 tests, respectively). In the absence of metabolic activation, the results are practically all reported to be negative. Only in two cases were positive test results obtained

with Salmonella typhimurium strain TA 1538. These are counterbalanced by two negative results from comparable tests. With regard to DNA-damaging activity, negative results were also obtained with several tests on Escherichia coli and one umu test on Salmonella typhimurium. Contradictory results were also obtained with tests on mammalian cells. Of two reported studies on chromosome aberrations in CHO cells, one gave clearly negative, the other weakly positive results. A test for sister chromatid exchange which was conducted in the same cells was also weakly positive. A gene mutation test on V79 cells and a UDS test on primary rat hepatocytes were clearly negative. Only few data are available on the in-vivo genotoxicity of o-chloronitrobenzene. Two sex-linked recessive lethal tests in Drosophila melanogaster show that the chemical is not genotoxic. Single intraperitoneal administration of 60 mg o-chloronitrobenzene/kg body weight to mice leads to an increase in the frequency of DNA fragments upon isolation of hepatic and renal cell nuclei from the mice and subsequent elution of the DNA. According to the studies available, o-chloronitrobenzene can not be evaluated as genotoxic nor has it been legally classified.

For the assessment of the carcinogenicity of o-chloronitrobenzene, the only available results are those from a long-term study involving 18-month treatment of rats and mice, and a 4-week mouse study investigating the formation of preneoplastic liver foci and the effects of o-chloronitrobenzene on hepatocellular metabolism. In the long-term study, which was not conducted according to current requirements for study conduct and documentation, administration of 100 mg o-chloronitrobenzene/kg body weight (later on, 50 mg/kg body weight) in the feed of rats for 18 months, followed by a rest period of 6 months, resulted in an increase in tumour incidence, compared with controls. A great variety of different tumours were found in different tissues. Following treatment at a higher dose level of o-chloronitrobenzene (200 mg and, later on, 100 mg/kg body weight), the numbers of tumours were not increased over controls. Mice receiving 18-month treatment with o-chloronitrobenzene (initially 300 mg and, later on, 150 mg/kg body weight) followed by another 3 months on a diet of normal feed showed an increase in the number of hepatomas relative to controls. In this case too, the findings in males treated with a higher dose of 600 mg and, later on, 300 mg/kg body weight were not confirmed. Only the female mice showed the same effect at the high dose level as they did at the lower dose level. In the 4-week study in mice, o-chloronitrobenzene administrations of

5, 50 and 500 mg/kg body weight in the feed did not result in the development of typical liver foci. It was demonstrated, however, that the carbohydrate metabolism of hepatocytes was altered in a dose-dependent manner. Particularly at the mid and high doses, there was a marked decrease in hepatocyte gluconeogenesis and glycogen content and an increase in glycolysis and pentose phosphate pathway activity. Thus, a metabolic situation was induced in hepatocytes which, according to the authors of the study, may have contributed to tumorigenesis. The studies referred to above suggest that the chemical may have a carcinogenic potential.

When female rats were treated with daily o-chloronitrobenzene doses of up to 100 mg/kg body weight by oral gavage on days 6 to 15 of gestation, there was no change, compared with controls, in fertility rate, mean numbers of live and dead foetuses, total implantations, late resorptions and corpora lutea or preimplantation losses, despite the body weight loss and reduced food consumption seen in the dams of the high dose group. Similarly, there were no biologically relevant differences from the controls with respect to the number of pups with visceral or skeletal malformations. Hence, in this study o-chloronitrobenzene was found not to cause teratogenicity, nor were embryotoxic or foetotoxic effects detectable. In a study in which rats and mice inhaled o-chloronitrobenzene with the air they breathed (at concentrations up to 115.2 mg/m³) for 13 weeks, no differences were noted relative to controls in the females' oestrus cycles as determined by vaginal cytology. In the male rats, reduced spermatogenesis and testicular weight occurred at the highest concentration of 115.2 mg/m³. Epididymal weight as well as the number of spermatid heads/testis and the number of spermatids were lower than controls. Concentration levels of 57.6 mg/m³ have no effect on the genitals of male rats, however, even at this concentration level, there are considerable toxic effects on the haematopoietic system. In male mice, reduced sperm motility was the only observation to be made. These findings could not be confirmed in studies with o-chloronitrobenzene treatment of shorter duration as summarised in the following. Upon single oral administration of 150 mg o-chloronitrobenzene/kg body weight to male rats, no effects whatsoever were seen on the testes, and 4-week treatment with 1120 mg o-chloronitrobenzene/kg body weight administered in feed gave no other result in male mice than a slight reduction in testicular weight without any histopathological correlate. From a comprehensive, two-generation reproductive toxicity study in mice treated with oral doses of up to

160 mg o-chloronitrobenzene/kg body weight, there is, finally, no indication that reproduction in these mice was impaired, even though at the highest dose level marked toxic effects (methaemoglobinaemia, enlargement of the spleen) were noted. Neither the number of pairs with offspring nor the number of litters/pair and viable offspring, nor their sex ratio or body weight were affected in the first or second generation by the o-chloronitrobenzene treatment in comparison with untreated controls. At the end of the study, the treated males were found to be unaffected in terms of sperm numbers, abnormal sperm cells and sperm motility.

It has long since been known that o-chloronitrobenzene is dangerous to humans; however, all reports relate to mixed exposure, frequently in combination with p-chloronitrobenzene and/or nitrobenzene. A critical aspect in this context is that the chemical is rapidly absorbed via the skin and the respiratory tract. The signs of acute intoxication include methaemoglobin-aemia, cyanosis, vomiting, headache and, in severe cases, collapse.

The German Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area ("MAK-Kommission") has assigned o-chloronitrobenzene to category 3 of carcinogenic substances of the List of MAK and BAT Values, i.e. the category of "substances that cause concern that they could be carcinogenic for man but cannot be assessed conclusively because of lack of data", and the chemical has been designated with "H" because of the danger of cutaneous absorption. Furthermore, o-chloronitrobenzene has been legally classified in the TRGS 905 and placed into carcinogenicity category C3 of "substances which cause concern for man owing to possible carcinogenic effects but in respect of which the available information is not adequate for making a satisfactory assessment" and in category R_F3 of substances toxic to reproduction, the category comprising "substances which cause concern for human fertility", in accordance with the EU classification criteria.

2 Stoffname

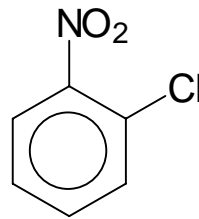
2.1	Gebrauchsname	o-Chlornitrobenzol
2.2	IUPAC-Name	1-Chlor-2-nitrobenzol
2.3	CAS-Nr.	88-73-3
2.4	EINECS-Nr.	201-854-9

3 Synonyme, Trivial- und Handelsnamen

Benzene, 1-chloro-2-nitro-
1,2-Chlornitrobenzol
2-Chlornitrobenzol
Chlor-o-nitrobenzol
2-Chlor-1-nitrobenzol
2-Chloronitrobenzene
o-Chloronitrobenzene
Chloro-o-nitrobenzene
1-Chloro-2-nitrobenzene
2-Chloro-1-nitrobenzene
o-Nitrochlorbenzol
1,2-Nitrochlorbenzol
2-Nitrochlorbenzol
o-Nitrochlorbenzoyl TTR
1-Nitro-2-chlorbenzol
2-Nitro-1-chlorbenzol
o-Nitrochlorobenzene
2-Nitrochlorobenzene
1-Nitro-2-chlorobenzene

4 Struktur- und Summenformel

4.1 Strukturformel



4.2 Summenformel



5 Physikalisch-chemische Eigenschaften

5.1	Molekularmasse, g/mol	157,56	
5.2	Schmelzpunkt, °C	31,8 32 32,5 32 - 33 33 33 - 35	(Monsanto, 1990) (Bayer, 1998) (Lide und Frederikse, 1996) (Budavari et al., 1989) (Booth, 1991) (Falbe und Regitz, 1996)
5.3	Siedepunkt, °C	243 245,5 245 - 246 246	(Bayer, 1998) (Booth, 1991; Lide und Frederikse, 1996) (Budavari et al., 1989) (Monsanto, 1990; Falbe und Regitz, 1996)
5.4	Dampfdruck, hPa	0,0575 (bei 20 °C) 0,532 (bei 25 °C) 49,8 (bei 150 °C)	(Bayer, 1998) (Monsanto, 1990) (Hoechst, 1997)
5.5	Dichte, g/cm ³	1,35 (bei 40 °C) 1,368 (bei 22 °C) 1,49 (bei 15 °C)	(Bayer, 1998) (Booth, 1991; Lide und Frederikse, 1996) (Bayer, 1998)
5.6	Löslichkeit in Wasser	nicht löslich 280 mg/l (bei 20 °C) 580 mg/l 590 mg/l (bei 20 °C)	(Budavari et al., 1989; Booth, 1991; Lide und Frederikse, 1996) (Monsanto, 1990) (Bayer, 1998) (BUA, 1985)

5.7	Löslichkeit in organischen Lösemitteln	löslich in Alkohol, Benzol und Ether (Budavari et al., 1989; Booth, 1991) löslich in Ethanol, Diethylether und Aceton (Lide und Frederikse, 1996)
5.8	Löslichkeit in Fett	keine Information vorhanden
5.9	pH-Wert	ca. 6 (bei 400 mg/l Wasser) (Bayer, 1998)
5.10	Umrechnungsfaktor	1 ml/m ³ (ppm) \triangleq 6,54 mg/m ³ 1 mg/m ³ \triangleq 0,153 ml/m ³ (ppm) (bei 1013 hPa und 25 °C)

6 Herstellung, Produktionsmenge und Verwendung

6.1 Herstellung

Durch Nitrierung - gelinde Einwirkung eines Salpetersäure-Schwefelsäure-Gemisches - von Chlorbenzol. Es entsteht ein Gemisch von o- und p-Chlornitrobenzol, das durch fraktionierte Kristallisation und Destillation getrennt wird (Booth, 1991).

6.2 Hergestellte oder eingeführte Menge

Jährlich werden ca. 25000 t hergestellt (BUA, 1985).

6.3 Verwendung

Weiterverarbeitung in der chemischen Großindustrie zur Herstellung von Vorprodukten für Farbstoffe, Pflanzenschutzmittel, Kautschukchemikalien und Pharmazeutika (BUA, 1985).

7 Experimentelle Befunde

7.1 Toxikokinetik und Metabolismus

In einer Studie zur Aufnahme und Verteilung sowie zum Metabolismus von o-Chlornitrobenzol wurde der Stoff in Dosierungen von 2, 20 und 200

mg/kg Körpergewicht einmalig mit der Schlundsonde an Gruppen von je 8 männlichen Ratten (Fischer 344, 11 Wochen alt) verabreicht. o-Chlornitrobenzol war ¹⁴C-markiert (51,17 mCi/mmol). Von 4 Tieren jeder Gruppe wurden Urin und Faeces von 0 bis 24 Stunden nach der o-Chlornitrobenzol-Gabe gesammelt. Die Tiere wurden dann getötet und es wurden Leber, Niere, Herz, Lunge, Gehirn und Proben von Muskel- und Fettgewebe sowie Blut entnommen. In allen Gewebeproben, in Urin, Blut und Faeces wurde die Radioaktivität bestimmt. Mit den verbliebenen 4 Tieren jeder Gruppe wurde in gleicher Weise verfahren, nur wurden Urin und Faeces von 0 bis 72 Stunden gesammelt und dann die Tötung vorgenommen. Die radioaktiven Metaboliten im Urin wurden mit HPLC-Analyse quantitativ bestimmt. Es konnten insgesamt 23 Metaboliten nachgewiesen werden, deren Struktur jedoch nicht aufgeklärt wurde. Von diesen sind nur 3 Metaboliten, die von den Autoren mit XXI, XIX und XI bezeichnet wurden, mengenmäßig von Bedeutung. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle 1 dargestellt und werden gemeinsam mit den Ergebnissen von zwei weiteren Untersuchungen aus dem selben Laboratorium, die in Tabelle 2 dargestellt sind, diskutiert (Arthur D. Little, 1989 a).

Tabelle 1. Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung und Metabolisierung von o-Chlornitrobenzol in % der wiedergefundenen Radioaktivität nach einmaliger oraler Aufnahme von ¹⁴C-markierter Prüfsubstanz bei der Ratte

Parameter		Dosis (mg/kg Körpergewicht)		
		2	20	200
Ausscheidung im Urin	0 bis 24 Stunden	56,4	53,0	39,2
	0 bis 72 Stunden	59,6	57,7	73,5
Ausscheidung mit den Faeces	0 bis 24 Stunden	21,9	19,8	0,0
	0 bis 72 Stunden	28,2	26,3	6,9
im Gewebe insgesamt	nach 24 Stunden	5,42	6,08	20,85
	nach 72 Stunden	2,64	2,75	3,90
Mindestresorption in 72 Stunden		62	61	77
mengenmäßig wichtigste Metaboliten im Urin	0 bis 48 Stunden			
	XI	2,9	3,2	21,1
	XIX	8,2	8,4	5,9
	XXI	27,3	26,4	23,2
Alle anderen Metaboliten mit jeweiligem Gehalt ≤ 6 %		20,1	21,5	23,6
Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte von 4, in einzelnen Fällen auch von 3 behandelten Tieren				

In einer Untersuchung wurde o-Chlornitrobenzol in einer Dosierung von 65 mg/kg Körpergewicht an 4 männliche Ratten (Fischer 344, 9 Wochen alt) über 11 Tage täglich mit der Schlundsonde verabreicht. Am Tag 1, 5 und 9 war das o-Chlornitrobenzol ¹⁴C-markiert (51,17 mCi/mmol). Nach jeder Gabe von markiertem o-Chlornitrobenzol wurden Urin und Faeces wie in der ersten Studie gesammelt, beginnend am 1. und 5. Tag auch bis zu 96 Stunden. Einen Tag vor Beginn der Applikation und am 4., 8. und 12. Tag wurde den Tieren retroorbital Blut entnommen, in dem der Gehalt an Methämoglobin bestimmt wurde (siehe auch Kapitel 7.2). Danach wurden am 12. Tag die Tiere getötet und Blut und Gewebe wie oben angegeben gewonnen. Die Metaboliten im Urin wurden wie in der voranstehenden Studie bestimmt. Die Ergebnisse werden gemeinsam mit den Ergebnissen der nächsten Studie in Tabelle 2 dargestellt (Arthur D. Little, 1989 b).

In einer dritten Studie, in der die Kinetik und der Metabolismus der Verbindung an älteren Tieren untersucht werden sollten, wurden mit der gleichen Versuchsanordnung und -durchführung 4 männliche, ungefähr 19 Monate alte Ratten (Fischer 344) ebenfalls über 11 Tage täglich mit einer Dosis von 65 mg/kg Körpergewicht mit der Schlundsonde behandelt. Die Gaben des radioaktiv markierten Stoffes, die Sammlung und Analyse von Urin und Faeces sowie die Entnahme und Aufarbeitung von Blut und Geweben erfolgte in der oben beschriebenen Weise (siehe Arthur D. Little, 1989 b). Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle 2 gemeinsam mit der vorstehenden Studie dargestellt und diskutiert (Arthur D. Little, 1990).

Tabelle 2. Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung und Metabolismus von o-Chlornitrobenzol in % der wiedergefundenen Radioaktivität nach oraler Aufnahme von ¹⁴C-markierter Prüfsubstanz (65 mg/kg Körpergewicht) bei der Ratte

Parameter	Alter der Tiere		
	9 Wochen	19 Monate	
Ausscheidung im Urin nach einmaliger Applikation	0 bis 24 Stunden	60,6	63,5
	0 bis 96 Stunden	70,9	85,1
Ausscheidung im Urin nach 5-maliger Applikation	0 bis 24 Stunden	70,8	61,3
	0 bis 96 Stunden	74,4	75,1
Ausscheidung im Urin nach 9-maliger Applikation	0 bis 24 Stunden	69,6	52,2
	0 bis 72 Stunden	73,5	70,8
Ausscheidung mit den Faeces nach einmaliger Applikation	0 bis 24 Stunden	5,4	1,4
	0 bis 96 Stunden	19,9	22,4
Ausscheidung mit den Faeces nach 5-maliger Applikation	0 bis 24 Stunden	18,1	7,0
	0 bis 96 Stunden	23,0	21,7
Ausscheidung mit den Faeces nach 9-maliger Applikation	0 bis 24 Stunden	21,4	7,5
	0 bis 72 Stunden	26,6	18,9
im Gewebe insgesamt nach 9-maliger Applikation		4,67	8,21
Mindestresorption in 72 Stunden nach einmaliger Applikation		70,9	85,1
Mindestresorption in 72 Stunden nach 5-maliger Applikation		74,4	75,1
Mindestresorption in 72 Stunden nach 9-maliger Applikation		78,2	79,0
Metaboliten im Urin nach einmaliger Applikation	0 bis 72 Stunden		
XI		12,6	5,6
XIX		6,4	7,3
XXI		21,1	24,8
alle anderen Metaboliten mit jeweiligem Gehalt ≤ 6 %		30,8	46,0
Metaboliten im Urin nach 5-maliger Applikation	0 bis 72 Stunden		
XI		10,7	8,7
XIX		4,2	3,5
XXI		18,1	12,8
alle anderen Metaboliten mit jeweiligem Gehalt ≤ 6 %		40,8	48,4
Metaboliten im Urin nach 9-maliger Applikation	0 bis 72 Stunden		
XI		8,0	10,1
XIX		4,7	2,6
XXI		20,1	10,6
alle anderen Metaboliten mit jeweiligem Gehalt ≤ 6 %		40,7	47,5
Methämoglobingehalt im Blut der Tiere (%)	einen Tag vor Applikationsbeginn	0,9	0,7
	am 4. Tag	6,4	-*
	am 8. Tag	5,8	6,1
	am 12. Tag	4,6	6,2
* keine Daten vorhanden			
Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte von 4, in einzelnen Fällen auch von 3 behandelten Tieren			

Die in Tabelle 1 und 2 zusammengetragenen Daten zeigen, dass oral verabreichtes o-Chlornitrobenzol zu mindestens 60 % bis über 80 % vom Körper aufgenommen wurde. Die Resorption war wahrscheinlich aber noch größer, da bei ihrer Berechnung die in den Faeces wiedergefundene Radioaktivität nicht berücksichtigt wurde, man aber annehmen kann, dass auch die hier enthaltene Radioaktivität nicht ausschließlich unresorbiertes o-Chlornitrobenzol war, sondern Metaboliten desselben und den Stoff selbst nach Resorption und Wiederausscheidung in den Darm darstellten.

Die mit dem ^{14}C -markierten o-Chlornitrobenzol verabreichte Radioaktivität wurde hauptsächlich mit dem Urin wieder ausgeschieden und repräsentierte Metaboliten des eingesetzten Stoffes. Bei den niedrigeren Dosierungen bis zu 65 mg/kg Körpergewicht erfolgte die Ausscheidung im Wesentlichen innerhalb der ersten 24 Stunden. Bei einer Dosierung von 200 mg/kg Körpergewicht war die Urinausscheidung verzögert und wurde erst nach 72 Stunden abgeschlossen. Die Menge der mit dem Urin ausgeschiedenen Metaboliten stieg bei den jungen Tieren mit der Dosis von ca. 60 % auf über 70 % der verabreichten Radioaktivität an. Menge und Geschwindigkeit der mit den Faeces ausgeschiedenen Radioaktivität war deutlich dosisabhängig. Bei kleineren Dosierungen von 2 und 20 mg/kg Körpergewicht erfolgte eine Ausscheidung von ca. 20 % der verabreichten Radioaktivität innerhalb der ersten 24 Stunden, die in weiteren 48 Stunden nur noch um einige Prozent zunahm. Die Dosierung von 65 mg/kg Körpergewicht führte dazu, dass in den ersten 24 Stunden nur wenige Prozent der eingesetzten Radioaktivität mit den Faeces ausgeschieden wurden. Nach weiteren 48 Stunden wurden ca. 20 % erreicht, was aber eine geringere Ausscheidung gegenüber den niedrigeren Dosierungen bedeutete. Bei 200 mg/kg Körpergewicht wurde in den ersten 24 Stunden keine Radioaktivität in den Faeces ausgeschieden und in weiteren 48 Stunden nur 7 % der eingesetzten Radioaktivität. Aufgrund dieser Verschiebung der Ausscheidung im Urin und in den Faeces bei höheren Dosierungen vermuteten die Autoren, dass die aus dem ^{14}C -markierten o-Chlornitrobenzol stammenden radioaktiven Verbindungen in den Faeces hier über Gallensekretion in den Intestinaltrakt gelangt waren (Arthur D. Little, 1989 a).

Nach der einmaligen Verabreichung von radioaktiv markiertem o-Chlornitrobenzol wurden in allen untersuchten Geweben der jungen Tiere nur geringe Mengen an radioaktivem Material gefunden, die nach 72 Stunden noch deutlich gegenüber dem 24-Stunden-Wert zurückgegangen waren.

Lediglich in der höchsten Dosisgruppe war der Wert nach 24 Stunden mit 21 % der verabreichten Radioaktivität hoch, ging aber nach weiteren 48 Stunden auch auf 3,9 % zurück. Zudem war die Radioaktivität in den Geweben weit verstreut und erreichte nur in der Leber und bei der höchsten Dosierung im Fettgewebe (in den ersten 24 Stunden) höhere Werte (Arthur D. Little, 1989 a).

Die nach Gabe von ¹⁴C-markiertem o-Chlornitrobenzol im Urin innerhalb von 72 Stunden ausgeschiedene Radioaktivität konnte durch HPLC-Analyse auf 23 Metaboliten der Ausgangsverbindung aufgeteilt werden. Davon spielten 20 Metaboliten mit bis zu je 6 % der verabreichten Radioaktivität eine untergeordnete Rolle. Hauptmetabolit mit über 20 % der Radioaktivität war XXI. Daneben spielten XIX und XI eine Rolle. Besonders XI wurde mit steigender Dosierung von o-Chlornitrobenzol bei den jungen Tieren in höherem Maß ausgeschieden, bis zu 21 % der eingesetzten Radioaktivität bei 200 mg/kg Körpergewicht. Diese Beobachtung könnte nach Ansicht der Autoren auf eine Sättigung der bei niedrigeren Dosierungen bevorzugten Stoffwechselwege oder auf Gallensekretion von Metaboliten des o-Chlornitrobenzols zurückgeführt werden (Arthur D. Little, 1989 a).

Wurde o-Chlornitrobenzol über 11 Tage täglich einmal an 9 Wochen alte Ratten mit einer Dosierung von 65 mg/kg Körpergewicht verabreicht und nach Gabe des ¹⁴C-markierten Stoffes am 9. Tag Urin und Faeces bis zum 11. Tag gesammelt sowie das Gewebe am 12. Tag untersucht, so waren keine wesentlichen Abweichungen gegenüber der einmaligen Verabreichung zu beobachten. In Bezug auf die Dosisabhängigkeit der Ausscheidungsparameter fügte sich die Dosierung von 65 mg/kg Körpergewicht (siehe Tabelle 2) gut in die Daten der Tabelle 1 ein. Erhöht gegenüber der einmaligen Applikation von 65 mg/kg Körpergewicht war die Geschwindigkeit der Ausscheidung durch die Faeces nach mehrfacher Applikation, die bereits nach 24 Stunden Beobachtungszeit hohe Werte zeigte. Etwas verschoben war hier auch das Metabolitenmuster, da mehr Radioaktivität in verschiedenen Nebenmetaboliten (I: 5,7 %, XVI: 5,7 %) erschien (Arthur D. Little, 1989 b).

Wurden für die gleichen Untersuchungen wie obenstehend statt 9 bis 11 Wochen alte 19 Monate alte männliche Ratten eingesetzt, so waren keine wesentlichen Unterschiede in den untersuchten Parametern gegenüber den mit der gleichen Dosierung behandelten jungen Ratten festzustellen.

Das galt sowohl für die einmalige Behandlung als auch für eine Behandlung von bis zu 11 Tagen. Letztere führte bei den alten Ratten zu einer etwas erniedrigten Ausscheidung im Urin und in den Faeces verglichen mit der einmaligen Behandlung. Nach 9-tägiger Behandlung war wie bei den jungen Tieren das Metabolitenmuster verändert, allerdings nicht ganz in der gleichen Weise. Es fällt auf, dass der Hauptmetabolit XXI nur noch mit 10 % ausgeschieden wurde (nach einmaliger Behandlung 25 %), ein Effekt, der bei den jungen Tieren nicht auftrat. Daneben waren mengenmäßig unbedeutende Metaboliten erhöht (I: 5,2 %, VI: 5,1 %, VII: 4,8 %, XIII: 4,3 %). Die insgesamt im Gewebe gefundene Radioaktivität, gemessen am Ende der Behandlungszeit, stieg bei alten Ratten auf 8 % an, auch hier mit den höchsten Werten in der Leber (Arthur D. Little, 1990).

Die dermale Resorption von o-Chlornitrobenzol wurde an 10 bis 12 Wochen alten männlichen Ratten (Fischer 344, 200 bis 225 g schwer) untersucht. Gruppen von je 3 Tieren erhielten ¹⁴C-ringmarkiertes o-Chlornitrobenzol, gelöst in Aceton, auf eine 4 cm² große rasierte Fläche der Rückenhaut in Dosierungen von 0,65, 6,5 und 65 mg/kg Körpergewicht aufgetragen. Um praxisnahe Applikationsbedingungen zu simulieren, wurde auf einen okklusiven Verband verzichtet und die behandelte Hautpartie nur leicht abgedeckt. Urin und Faeces der Tiere wurden im 4-Stunden-Intervall bis zu 72 Stunden nach der Applikation gesammelt und die ausgeschiedene Radioaktivität bestimmt. Unabhängig von der aufgetragenen Dosis wurden unter den beschriebenen Versuchsbedingungen mindestens 33 bis 40 % des o-Chlornitrobenzols aufgenommen (berechnet aus Urin- und Faecesausscheidung innerhalb von 72 Stunden ohne Berücksichtigung der im Körper verbliebenen Stoffmenge, die nicht gemessen wurde). Die Ausscheidung, gemessen als Gesamtradioaktivität ohne Bestimmung der chemischen Konstitution von Metaboliten, erfolgte zu etwa 2/3 über den Urin (21 bis 28 % der eingesetzten Menge) und zu etwa 1/3 über die Faeces (11 bis 15 % der eingesetzten Menge). Ein großer Teil der Ausscheidung erfolgte innerhalb der ersten 24 Stunden, jedoch ließ sich wegen der über die ganze Versuchszeit andauernden Applikation keine Kinetik ableiten (Nomeir et al., 1992).

Wurde 6 männlichen Wistar-Ratten (150 bis 220 g schwer) o-Chlornitrobenzol, suspendiert in Propylenglykol, intraperitoneal in einer Dosis von 100 µmol/kg Körpergewicht (entsprechend 15,8 mg/kg Körpergewicht) verabreicht und der Urin danach 5 Stunden lang gesammelt, so konnte eine

deutliche Menge eines oder mehrerer Metaboliten identifiziert werden, die als Diazo-positiv mit der Bratton-Marshall-Reaktion nachgewiesen wurden (keine Angaben zur Konstitution und zur absoluten Menge der Metaboliten; Watanabe et al., 1976).

In einer Studie zum Metabolismus von o-Chlornitrobenzol wurde weiblichen Kaninchen (2 bis 3 kg schwer, keine Angabe zur Anzahl) der Stoff einmalig in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht oral verabreicht. Urin und Faeces wurden in den ersten 24 Stunden und in weiteren 24 Stunden gesammelt und analytisch auf Nitro- und Amino-Verbindungen untersucht. Nach 48 Stunden war die Ausscheidung beendet. Als Kontrollen wurden weibliche Kaninchen verwendet, die nur Wasser erhielten. Von dem eingesetzten o-Chlornitrobenzol wurden als Metaboliten im Urin 42 % als Glukuronid, 24 % als Sulfat, 7 % als Nitrophenylmercaptursäure und 9 % als freies o-Chloranilin wiedergefunden. Nur 0,3 % des verabreichten o-Chlornitrobenzols wurde mit den Faeces in Form von o-Chloranilin ausgeschieden. Die detaillierte Analyse der im Urin aufgefundenen Metaboliten zeigte, dass o-Chlornitrobenzol zu phenolischen Verbindungen hydroxyliert und zum anderen zu Amino-Verbindungen reduziert wurde. In deutlichen Mengen im Urin nachweisbar waren o-Chloranilin, 3-Amino-4-chlorphenol, 4-Amino-3-chlorphenol und 3-Chlor-4-nitrophenol. Die Phenole lagen zum überwiegenden Teil als Konjugate mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure vor. Die Bildung von Nitrophenylmercaptursäure schien nach Ansicht der Autoren nur einen Stoffwechselweg von geringerer Bedeutung darzustellen (Bray et al., 1956).

Die Bildung von o-Chloranilin aus verabreichtem o-Chlornitrobenzol im Organismus konnte auch in einer Arbeit an Ratten nachgewiesen werden. Dabei wurde in einer ersten Reduktionsstufe N-Hydroxy-o-chloranilin gebildet, das als Hämoglobinaddukt aus dem Blut der behandelten Tiere isoliert wurde. Das gleiche Hämoglobinaddukt wurde auch gefunden, wenn man o-Chloranilin den Tieren verabreichte, das im Körper zu N-Hydroxy-o-chloranilin oxidiert wurde. Im Experiment wurden je 2 weibliche Wistar-Ratten (200 bis 225 g schwer) einmalig mit der Schlundsonde mit 0,5 mmol o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht (entsprechend 78,8 mg/kg Körpergewicht) oder mit 0,5 mmol o-Chloranilin/kg Körpergewicht (entsprechend 63,8 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Beide Stoffe waren 99 % rein und in Tricaprylin (1 ml/kg Körpergewicht) gelöst. Nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet, das Blut durch Herzpunktion entnommen und die roten Blut-

zellen isoliert. Daraus wurde das Hämoglobin isoliert, durch Behandlung mit 0,1 M Natronlauge das Addukt gespalten und das N-Hydroxy-o-chloranilin als o-Chloranilin freigesetzt. Die Behandlung der Ratten mit o-Chlornitrobenzol ergab eine Menge von etwa 4 mmol des Hämoglobinadduktes/mol Hämoglobin, während unter gleichen Bedingungen mit o-Chloranilin nur etwa 1,6 mmol/mol gebildet wurden. Der Autor schloss daraus, dass N-Hydroxy-o-chloranilin im Körper verfügbar war und dass mehr N-Hydroxy-o-chloranilin aus o-Chlornitrobenzol gebildet wurde, als aus o-Chloranilin. Die sehr reaktive N-Hydroxyl-Verbindung könnte nach Diskussion des Autors möglicherweise für zytotoxische, mutagene und kanzerogene Wirkungen des o-Chlornitrobenzols verantwortlich sein. Allerdings waren die hier nachgewiesenen Konzentrationen im Vergleich zu anderen untersuchten Verbindungen (p-Chlornitrobenzol, Nitrobenzol) nur sehr gering (Sabbioni, 1994).

Zur Untersuchung des Metabolismus von o-Chlornitrobenzol in vitro wurden primäre Hepatozyten von Lebern männlicher Fischer-Ratten (CDF[F-344]CrIBR, 200 bis 250 g schwer) sowie aus diesen Zellen isolierte Mikrosomen und Zytosol eingesetzt. Die Hepatozyten (6×10^6) wurden 90 Minuten lang in 3 ml Krebs' Bicarbonatpuffer bei 37 °C mit ^{14}C -markiertem o-Chlornitrobenzol (1 μCi , 100 μmol in 3 ml, entsprechend 5,3 mg/ml) inkubiert. Danach wurden die Reaktionen durch Zugabe von kaltem Methanol gestoppt, die gebildeten Metaboliten und nicht umgesetztes o-Chlornitrobenzol mit HPLC isoliert, die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt und die Konstitution der gefundenen radioaktiven Stoffe mit GC/MS aufgeklärt. Nach der 90-minütigen Inkubation waren 46,7 % der eingesetzten Radioaktivität in drei wesentlichen Metaboliten nachzuweisen: 19,2 % waren o-Chloranilin, 14,2 % waren das N-Glukuronid des o-Chloranilins und 13,3 % waren S-(2-Nitrophenyl)-glutathion. Bei der Inkubation von radioaktivem o-Chlornitrobenzol (0,33 $\mu\text{Ci/ml}$ und 100 $\mu\text{mol/ml}$, entsprechend 15,8 mg/ml) mit isolierten Mikrosomen (2 mg Protein/ml) in Phosphatpuffer pH 7,4 unter Zusatz von NADPH wurde o-Chloranilin gebildet. Wurde das NADPH durch NADH ersetzt, die Inkubation unter einer Kohlenmonoxid-Atmosphäre durchgeführt oder die als Hemmer von Cytochrom P450-abhängigen Reaktionen bekannten Stoffe SKF 525-A und Metyrapon zugesetzt, war die Bildung von o-Chloranilin weitgehend gehemmt, sodass man davon ausgehen kann, dass die Reduktion der Nitro-Gruppe zur Amino-Gruppe P450-abhängig ist. Allerdings konnten auch gewisse Mengen (etwa

14 % des normalen Umsatzes) über die Cytochrom b5-Reduktase von der Nitro-Verbindung zur Amino-Verbindung umgesetzt werden, wie der Versuch mit NADH statt NADPH zeigte. Die Inkubation von markiertem o-Chlornitrobenzol (0,33 µCi/ml, 50 µmol/ml, entsprechend 7,9 mg/ml) mit aus den Leberzellen isoliertem Zytosol (2 mg Protein/ml) in Phosphatpuffer pH 7,4 unter Zusatz von Glutathion führte zur Bildung von S-(2-Nitrophenyl)-glutathion. Das Chloratom war durch die Glutathion-Gruppe ersetzt worden. Die Autoren schrieben auch dieser Umsetzung eine Rolle beim Stoffwechsel des o-Chlornitrobenzols zu (Rickert und Held, 1990).

Die Reduktion von o-Chlornitrobenzol wurde ebenfalls in vitro in dem Enzymsystem Xanthin-Oxydase-Xanthin untersucht. Gemessen wurde die Menge an Harnsäure, die aus dem Xanthin/mg Enzymprotein und Minute gebildet wurde. Ohne den Zusatz von o-Chlornitrobenzol wurde in dem System keine Harnsäure gebildet, da der Elektronenakzeptor fehlte. Das Reduktionsprodukt wurde durch Dünnschichtchromatographie und UV-Spektrophotometrie bestimmt. o-Chlornitrobenzol wurde in diesem System bis zur Hydroxylamin-Verbindung reduziert, wobei als Zwischenprodukt die Nitroso-Verbindung angenommen wurde. Die Reduktion der o-Verbindung war deutlich langsamer als die der p-Verbindung, wofür sterische Hinderung verantwortlich gemacht wurde (Tatsumi et al., 1978).

7.2 Akute und subakute Toxizität

Akute Toxizität

Die Daten zur akuten oralen und dermalen Toxizität von o-Chlornitrobenzol sind in Tabelle 3 zusammengefasst:

Anfang Tabelle 3

Tabelle 3. Daten zur akuten oralen und dermalen Toxizität von o-Chlornitrobenzol					
Spezies, Stamm, Geschlecht*	Zufuhrweg	Dosis (mg/kg Körpergewicht)	Effekt	Nachbeobachtungszeit	Literatur
Ratte	oral	350	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Davydova, 1967
Ratte	oral	268	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Back et al., 1972

Tabelle 3. Daten zur akuten oralen und dermalen Toxizität von o-Chlornitrobenzol					
Spezies, Stamm, Geschlecht*	Zufuhrweg	Dosis (mg/kg Körpergewicht)	Effekt	Nachbeobachtungszeit	Literatur
Ratte, Sprague-Dawley, männlich und weiblich	oral	560	LD ₅₀ ; Reduktion von Appetit und Aktivität, Schwäche, Augenausfluss, Kollaps; Sektionsbefund der verendeten Tiere: gastroenterale Entzündung, dunkle Nieren und Milz, ikterische Leber, Lungenblutungen	7 Tage	Younger Laboratories, 1973
Ratte, Wistar, männlich	oral	144	LD ₅₀ ; Gleichgewichtsstörungen, leichtes Zittern, Durchfall	14 Tage	Hoechst, 1975 a
Ratte, Wistar II, männlich	oral	219	LD ₅₀ ; Zyanose, herabgesetztes Allgemeinbefinden	14 Tage	Bayer, 1976
Ratte, Wistar II, weiblich	oral	457	LD ₅₀ ; Zyanose, herabgesetztes Allgemeinbefinden	14 Tage	Bayer, 1976
Ratte, Sprague-Dawley, männlich	oral	270	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Vernot et al., 1977
Ratte	oral	510	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Vasilenko und Zvezdai, 1981
Ratte	oral	339	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Izmerov et al., 1982
Ratte, Wistar TNO W74, weiblich	oral	263	LD ₅₀ ; Narkose, Sedation, struppiges Fell, Zyanose, Herabsetzung des Allgemeinbefindens, Lähmung der hinteren Extremitäten; keine Befunde bei der Sektion	14 Tage	Bayer, 1982 a
Ratte, Wistar TNO W74, männlich	oral	251	LD ₅₀ ; Sedation, Narkose, Herabsetzung des Allgemeinbefindens, Zyanose, struppiges Fell; keine Befunde bei der Sektion	14 Tage	Bayer, 1982 b
Maus	oral	135	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Back et al., 1972

Tabelle 3. Daten zur akuten oralen und dermalen Toxizität von o-Chlornitrobenzol					
Spezies, Stamm, Geschlecht*	Zufuhrweg	Dosis (mg/kg Körpergewicht)	Effekt	Nachbeobachtungszeit	Literatur
Maus, CF-1, männlich	oral	140	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Vernot et al., 1977
Maus	oral	340	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Vasilenko und Zvezdai, 1981
Maus	oral	440	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Izmerov et al., 1982
Kaninchen	oral	280	LD ₅₀ , keine weiteren Angaben	keine Angaben	Izmerov et al., 1982
Ratte, Wistar, weiblich	dermal (24 Stunden okklusiv)	1796	LD ₅₀ ; keine erkennbaren Vergiftungssymptome	14 Tage	Hoechst, 1975 b
Ratte, Wistar II, weiblich	dermal (24 Stunden okklusiv)	1320	LD ₅₀ ; Atemstörungen, Zyanose, herabgesetztes Allgemeinbefinden	14 Tage	Bayer, 1976
Ratte, Wistar II, männlich	dermal (24 Stunden okklusiv)	655	LD ₅₀ ; Atemstörungen, Zyanose, herabgesetztes Allgemeinbefinden	14 Tage	Bayer, 1976
Kaninchen, Neuseeländer	dermal (24 Stunden okklusiv)	450	LD ₅₀ ; Lethargie, Verlust der motorischen Koordination; Methämoglobinämie	14 Tage	Harton und Rawl, 1976
Kaninchen, Neuseeländer, weiblich	dermal	355	LD ₅₀ ; Lethargie, zunehmende Schwäche; Sektionsbefund der verendeten Tiere: Blutungen in der Lunge, Verfärbung von Leber, Nieren und Milz, gastrointestinale Entzündung	14 Tage	Younger Laboratories, 1983
Kaninchen, Neuseeländer, männlich	dermal	445	LD ₅₀ ; Lethargie, zunehmende Schwäche; Sektionsbefund der verendeten Tiere: Verfärbung von Leber, Nieren und Milz, gastrointestinale Entzündung	14 Tage	Younger Laboratories, 1983

* sofern angegeben

Ende Tabelle 3

Die LD₅₀-Werte zeigen unabhängig vom Zufuhrweg und der untersuchten Spezies erhebliche Schwankungen. Für die Ratte bei oraler Verabreichung lagen sie zwischen 144 und 560 mg/kg Körpergewicht und für die Maus zwischen 135 und 440 mg/kg Körpergewicht. Der LD₅₀-Wert oral für das Kaninchen passte mit 280 mg/kg Körpergewicht in diesen Bereich. Für die dermale Verabreichung lagen die LD₅₀-Werte beim Kaninchen zwischen 355 und 458 mg/kg Körpergewicht, bei der Ratte mit großer Schwankung zwischen 655 und 1796 mg/kg Körpergewicht. Als typisches Vergiftungssymptom trat bei der akuten Behandlung mit o-Chlornitrobenzol Zyanose auf. Damit ist o-Chlornitrobenzol sowohl nach oraler als auch nach dermaler Applikation als gesundheitsschädlich bis giftig zu bezeichnen.

In einer Studie zur Methämoglobinbildung wurden 6 männliche Wistar-Ratten einmalig mit einer Dosis von 100 µmol o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht (entsprechend 15,8 mg/kg Körpergewicht), gelöst in Propylenglykol, intraperitoneal behandelt. Das Blut der 5 Stunden nach der Applikation getöteten Tiere enthielt 20,6 % Methämoglobin. Wurde Hämolyat von Rattenblut, das in Phosphatpuffer mit o-Chlornitrobenzol in Propylenglykol versetzt war (0,5 µmol o-Chlornitrobenzol, 0,1 µmol Hämoglobin in 5 ml), über 5 Stunden bei 37 °C inkubiert, so wurde kein Methämoglobin gebildet. Die Autoren schlossen daraus, dass nicht das o-Chlornitrobenzol selbst, sondern das durch Reduktion im Körper entstehende o-Chloranilin für die Methämoglobinbildung verantwortlich war (Watanabe et al., 1976).

Die einmalige orale Verabreichung von 10 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht an 2 Katzen führte innerhalb von 7 Stunden bei einer Katze zu einer ganz leichten, bei der anderen Katze zu einer leichten Methämoglobinbildung, die nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar war. Das Blutbild war im Sinn einer Neutrophilie, Leukozytose und Lymphozytopenie verändert. Heinz-Körper konnten bis zu 14,5 % nachgewiesen werden. Auch diese Effekte waren nach 48 Stunden reversibel (Hoechst, 1975 c).

Zur akuten inhalativen Toxizität von o-Chlornitrobenzol liegt das Ergebnis einer Studie vor, bei der Ratten in einer Apparatur so behandelt wurden, dass nur der Kopf dem mit der Prüfsubstanz versetzten Luftstrom ausgesetzt wurde. Dieser und die gesamte Umgebung wurde auf einer Temperatur von mindestens 31,8 °C gehalten, wodurch im Luftstrom eine Mischung aus Dampf und Aerosol des flüssigen o-Chlornitrobenzols entstand. Eingesetzt wurden Gruppen von je 10 männlichen Cr1:CD-Ratten (8 Wochen alt,

230 bis 260 g schwer), die einmalig 4 Stunden behandelt und 14 Tage nachbeobachtet wurden. Es wurde eine approximative LC_{50} von 3200 mg/m³ bestimmt, die anzeigt, dass o-Chlornitrobenzol auch bei der Inhalation als gesundheitsschädlich zu bezeichnen ist. Die wenig spezifischen Vergiftungssymptome wurden als Lethargie, Entkräftung, Corneatrübung, Zyanose und teilweise Lähmung der Hinterbeine angegeben (Haskell, 1982).

Subakute Toxizität

In einer älteren Studie erhielten 20 Albino-Ratten eine Dosis von 70 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht über 20 Tage täglich oral verabreicht. Alle Tiere überlebten diese Behandlung, woraus die Autorin den Schluss zog, dass der Stoff keine ausgeprägten kumulativen Eigenschaften besitzt (keine weiteren Angaben; Davydova, 1967).

Bei der Durchführung von zwei Studien zur Toxikokinetik und zum Metabolismus von o-Chlornitrobenzol (siehe auch Kapitel 7.1) mit identischen Methoden an 9 Wochen bzw. 19 Monate alten Ratten (Fischer 344) wurde der Stoff in einer Dosis von 65 mg/kg Körpergewicht 11 Tage lang täglich an je 4 Tiere mit der Schlundsonde verabreicht. Einen Tag vor Behandlungsbeginn, am 4. und 8. Behandlungstag und einen Tag nach Abschluss der Behandlung wurde den Ratten retroorbital Blut entnommen und der Gehalt an Methämoglobin bestimmt. Die erhaltenen Daten, die auch in Tabelle 2 aufgeführt sind, zeigten, dass der Methämoglobingehalt im Blut der Tiere unter der o-Chlornitrobenzol-Behandlung bereits nach 4 Tagen deutlich von 0,7 bis 0,9 % (vor Behandlungsbeginn) auf 6,1 bis 6,4 % angestiegen war. Die weitere Behandlung bis zu 11 Tagen führte zu keinem weiteren Anstieg des Methämoglobingehaltes im Blut. Das Alter der Tiere war ohne Einfluss (Arthur D. Little, 1989 b, 1990).

In einer entsprechend der OECD-Richtlinie Nr. 407 durchgeführten subakuten Toxizitätsstudie an B6C3F1-Mäusen (5 Wochen alt, 21 bis 25 g schwer) wurden Gruppen von je 12 weiblichen und 12 männlichen Tieren über 4 bis 5 Wochen mit o-Chlornitrobenzol (99,7 % rein) im Futter behandelt. In Erweiterung des Untersuchungsumfanges der OECD-Richtlinie wurden zusätzlich umfangreiche enzymhistochemische Untersuchungen zur Erfassung möglicher präneoplastischer Veränderungen in der Leberzelle durchgeführt. Weitere je 6 weibliche und männliche Tiere/Gruppe

wurden mitgeführt und nach einer Woche Behandlung getötet. Als Dosierungen wurden 0 (Kontrollen), 50, 500 und 5000 ppm im Futter angesetzt. Die tatsächlich aufgenommenen Mengen, berechnet aus den individuellen Körpergewichten und dem Futterverbrauch, betragen für Männchen 0, 16, 167 und 1120 mg/kg Körpergewicht und für Weibchen 0, 24, 220 und 1310 mg/kg Körpergewicht. Die am Versuchsende getöteten Tiere wurden sehr ausführlich untersucht, einschließlich histochemischer und enzymatischer Prüfungen von Leberproben. Eine vollständige Blut- und Urinanalyse, Sektion und histopathologische Untersuchung wurden durchgeführt. Die Tiere aus der Zwischenuntersuchung nach einer Woche wurden seziiert und ihre Lebern histochemisch und enzymatisch, aber nicht histopathologisch untersucht. Die Befunde sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Anfang Tabelle 4

Tabelle 4. Befunde nach Verabreichung von o-Chlornitrobenzol über 1 und 4 bis 5 Wochen an Mäuse mit dem Futter			
	50 ppm	500 ppm	5000 ppm
Klinische Symptome	-	-	verengte Lidspalten und Augentrübung bei Männchen
Mortalität	-	-	-
Futteraufnahme	-	11 % geringer bei Weibchen	50 % geringer bei Weibchen, 38 % geringer bei Männchen
Trinkwasseraufnahme	-	-	-
Körpergewichtsentwicklung	-	-	nach 4 Wochen um 4 % (Weibchen) bzw. 8 % (Männchen) erniedrigt
Hämatologie und Histopathologie der blutbildenden Organe	-	-	Erythrozytenzahl, Hämatokrit- und Hämoglobingehalt erniedrigt, Bilirubin- und Methämoglobingehalt erhöht; Milzgewicht erhöht, schwarze Verfärbung der Milz, Hämosiderinablagerungen in der Milz, Knochenmark ohne Befund
Leberveränderungen nach einer Woche	-	erhöhte Lebergewichte	erhöhte Lebergewichte

Tabelle 4. Befunde nach Verabreichung von o-Chlornitrobenzol über 1 und 4 bis 5 Wochen an Mäuse mit dem Futter

	50 ppm	500 ppm	5000 ppm
Leberveränderungen nach 4 bis 5 Wochen	leicht erhöhte Lebergewichte (ohne histopathologisches Korrelat)	erhöhte Lebergewichte, mittelgradige Hypertrophie der zentrilobulären Hepatozyten	erhöhte Lebergewichte, deutlich vergrößerte Lebern; hochgradige Hypertrophie der zentrilobulären Hepatozyten; erhöhte Cholesterinwerte und erhöhte Aktivitäten der Transaminasen ASAT und ALAT und der alkalischen Phosphatase im Blut, erniedrigte Harnstoffkonzentrationen im Plasma
enzymatische Untersuchungen an Leberproben (Homogenat) nach einer Woche	keine Erhöhung der Enzymaktivitäten bis auf eine leichte Erhöhung der GSH-T bei Weibchen	EOD, ALD, EH, GSH-T und GLU-T waren induziert um Faktoren von 1,5 bis 3,8, EOR nur schwach erhöht	EOD, EH und GLU-T erhöht um Faktoren von 1,5 bis 2,3, ALD erhöht um den Faktor 5 und GSH-T bei Weibchen um den Faktor 6, bei Männchen um den Faktor 2,3, EOR nur schwach erhöht
enzymatische Untersuchungen an Leberproben (Homogenat) nach 4 bis 5 Wochen	keine Erhöhung der Enzymaktivitäten bis auf eine leichte Erhöhung der GSH-T bei Weibchen und Männchen	EOD, EOR, EH, GLU-T und ALD (nur bei Männchen) erhöht um Faktoren von 1,5 bis 3, ALD bei Weibchen nicht erhöht, GSH-T bei Weibchen um den Faktor 7 erhöht, bei Männchen um den Faktor 2,3	EH und GLU-T erhöht um Faktoren von 1,9 bis 2,4, bei Männchen EOD um den Faktor 3, ALD um den Faktor 1,8 und GSH-T um den Faktor 2 erhöht, bei Weibchen ALD nicht erhöht, EOD nur schwach erhöht und GSH-T sehr stark um den Faktor 11 erhöht, EOR nur geringfügig erhöht
histochemische Untersuchung an Leberschnitten nach einer Woche	-	Verminderung der hepatozytären Glykogenspeicherung (nur Weibchen) und verminderte Glukoneogenese im „Perivenulärbereich“	Verminderung der Glykogenspeicherung und der Glukoneogenese der Hepatozyten im „Perivenulärbereich“, Aktivierung des Pentosephosphat-Weges dort und verstärkte Glykolyse „perivenulär“

Tabelle 4. Befunde nach Verabreichung von o-Chlornitrobenzol über 1 und 4 bis 5 Wochen an Mäuse mit dem Futter			
	50 ppm	500 ppm	5000 ppm
histochemische Untersuchung an Leberschnitten nach 4 bis 5 Wochen	-	Verminderung der hepatozytären Glykogenspeicherung und verminderte Glukoneogenese im „Perivenulärbereich“	Verminderung der Glykogenspeicherung und der Glukoneogenese der Hepatozyten, verstärkte Glykolyse und Aktivierung des Pentosephosphat-Weges im „Perivenulärbereich“
-	keine Änderungen gegenüber der Kontrolle		
ALAT	Alaninaminotransferase	EOD	7-Ethoxycumarindeethylase
ALD	Aldrinepoxidase	EOR	7-Ethoxyresorufindeethylase
ASAT	Aspartataminotransferase	GSH-T	Glutathion-S-transferase
EH	Epoxidhydrolase	GLU-T	Uridindiphosphatglukuronyltransferase

Ende Tabelle 4

Abgesehen von den geringfügigen Enzymveränderungen in der Leber und einer leichten Lebergewichtserhöhung ohne histopathologisches Korrelat nach 4-wöchiger Behandlung wurden 50 ppm o-Chlornitrobenzol ohne Befund vertragen. Auch bei 500 ppm wurde außer Leberveränderungen (siehe unten) nur bei den Weibchen eine geringere Futteraufnahme gegenüber den Kontrollen beobachtet. Bei 5000 ppm o-Chlornitrobenzol, über bis zu 5 Wochen im Futter gegeben, zeigten sich dann deutliche Befunde: geringere Futteraufnahme, verengte Lidspalten und Augentrübung bei den Männchen, verzögerte Körpergewichtsentwicklung, deutliche Veränderungen des Blutbildes mit Methämoglobinbildung sowie Verfärbung der Milz mit Hämosiderinablagerungen und Milzgewichtserhöhung. Bis auf die Leber zeigten alle übrigen Organe keine prüfsubstanzbedingten Funktionsstörungen oder Veränderungen in den klinisch-chemischen, pathologisch-anatomischen, organgravimetrischen und histopathologischen Untersuchungen. Deutliche dosisabhängige Leberveränderungen wurden in der 500 und der 5000 ppm-Gruppe beobachtet mit erhöhten Lebergewichten und einer mittelgradigen Hypertrophie der zentrilobulären Hepatozyten. Die Lebergewichte waren bereits nach einwöchiger Behandlung dosisabhängig erhöht. Außerdem waren die Cholesterinwerte und die Aktivitäten der Transaminasen sowie der alkalische Phosphatase im Blut erhöht. Die enzymatischen Untersuchungen an Leberhomogenaten zeigten, dass bereits nach einer Woche die Aktivitäten der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen 7-Ethoxycumarindeethylase und Aldrinepoxidase sowie die Phase II-Enzy-

me Epoxidhydrolase, Glutathion-S-transferase und Uridindiphosphatglukonyltransferase bei beiden Geschlechtern ab einer Dosis von 500 ppm im Futter erhöht waren. Besonders auffällig war die Erhöhung der Glutathion-S-transferase bei Weibchen um den Faktor 6 in der 5000 ppm-Gruppe bereits nach einer Woche. Sonst traten keine deutlichen Geschlechtsunterschiede auf. Das änderte sich deutlich nach 4 Wochen Applikation. Bei Weibchen wurde eine Erhöhung der 7-Ethoxycumarindeethylase-Aktivität kaum noch und der Aldrinepoxidase-Aktivität gar nicht mehr gefunden, dafür war die Glutathion-S-transferase-Aktivität um den Faktor 11 erhöht. Bei den Männchen waren alle Enzymaktivitäten um Faktoren von 1,8 bis 3 erhöht, wenn 4 Wochen lang mit 5000 ppm o-Chlornitrobenzol im Futter behandelt wurde. Die histochemischen Untersuchungen an Leberschnitten zeigten bei den mit 500 ppm behandelten Tieren bereits nach einer Woche eine verminderte Glykogenspeicherung (nur Weibchen) und eine verminderte Glukoneogenese (gemessen als Glukose-6-phosphatase-Aktivität). Bei 5000 ppm zeigte sich nach einer Woche zusätzlich eine Aktivierung des Pentosephosphat-Weges (gemessen als Glukose-6-phosphatdehydrogenase-Aktivität), eine verstärkte Glykolyse (gemessen als Glycerin-3-phosphatdehydrogenase-Aktivität) sowie eine verminderte Glykogenspeicherung auch bei den Männchen. In der 5. Behandlungswoche wurden die gleichen Effekte beobachtet. Die Befunde waren im Wesentlichen auf den „perivenulären“ Bereich beschränkt. Fokale Läsionen in der Leber wurden nicht beobachtet. Da eine Aktivierung des Pentosephosphat-Weges und der Glykolyse bei gleichzeitiger Reduktion der Glukoneogenese als möglicherweise bedeutsame Veränderungen bei der Transformation von Maushepatozyten betrachtet werden, diskutierten die Autoren, dass o-Chlornitrobenzol in den Parenchymzellen der Leber eine Stoffwechsellage induziert, die die Entstehung von Tumoren begünstigt (siehe auch Kapitel 7.7). Dafür sprach auch die Erhöhung der Enzymaktivitäten im Leberhomogenat (zur Darstellung der Befunde der makroskopischen und histopathologischen Untersuchung des Hodens der Tiere siehe Kapitel 7.8; Bayer, 1991, 1993).

In einer Studie zur Dosisfindung für eine Untersuchung zur Reproduktionstoxizität wurden männliche und weibliche Mäuse (Swiss-CD-1) in Gruppen von 8 Tieren/Geschlecht und Dosis mit o-Chlornitrobenzol (> 99 % rein, in Maiskeimöl) in den Dosierungen von 0 (Kontrollen), 20, 40, 80, 160 bzw. 320 mg/kg Körpergewicht täglich über 14 Tage oral mit der Schlundsonde

behandelt. Befundet wurden nur Todesfälle, klinische Symptome, Körpergewichtsentwicklung und Trinkwasserverbrauch. Alle Tiere der Dosisgruppe 320 mg/kg Körpergewicht starben innerhalb der ersten 2 Behandlungstage. Die Tiere, die 160 mg/kg Körpergewicht erhielten, zeigten in der ersten Woche leichte Schwäche und Inaktivität und wurden in der zweiten Woche leicht zyanotisch, blieben aber aktiv. Nach der Gabe von 80 mg/kg Körpergewicht kam es nur an den ersten beiden Behandlungstagen zur Inaktivität, später verhielten sich die Tiere normal. Alle Tiere der Dosisgruppen bis 160 mg/kg Körpergewicht zeigten keine Veränderungen der Körpergewichtsentwicklung gegenüber den Kontrollen. Der Trinkwasserverbrauch war bei 20 und 160 mg/kg Körpergewicht in der ersten Woche bei Weibchen und bei 40 mg/kg Körpergewicht in der zweiten Woche bei Männchen und Weibchen signifikant erhöht (NTP, 1992).

Die subakute Toxizität von o-Chlornitrobenzol nach Inhalation wurde in einer Studie an männlichen Ratten (Stamm Cr1:CD[SD]BR, 8 bis 10 Wochen alt, 218 bis 235 g schwer) untersucht. Je 16 Tiere/Gruppe wurden 2 Wochen lang an 5 Tagen/Woche für 6 Stunden/Tag dem Dampf-Luft-Gemisch von o-Chlornitrobenzol (99,8 % rein) ausgesetzt. Der Stoff wurde auf 80 bis 100 °C erhitzt und Stickstoff darüber geleitet. Dieser Dampf wurde in einer Apparatur mit Luft gemischt und den Tieren ausschließlich am Kopf appliziert. 74 % des o-Chlornitrobenzols waren im Gemisch atembar, entsprechend einem mittleren Teilchendurchmesser von 6,8 µm. Als Konzentrationen für die inhalative Exposition wurden 0 (Kontrollen), 30, 160 bzw. 530 mg/m³ gewählt. Bei 10 Tieren jeder Gruppe wurden nach 9 Expositionen Urinalysen (16-Stunden-Urin) und nach 10 Expositionen hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen durchgeführt. 5 dieser Tiere wurden dann sofort getötet und der Sektion und histopathologischen Untersuchung unterworfen. Die übrigen 5 Tiere wurden ohne Exposition noch 13 Tage nachbeobachtet und nach Urinalyse am 12. Tag und hämatologischen und klinisch-chemischen Untersuchungen am 13. Tag ebenfalls getötet, sezirt und histopathologisch untersucht. Den weiteren in jeder Gruppe mitgeführten 6 Tieren wurde während der Expositions- und Erholungszeit regelmäßig Blut entnommen, das nur hinsichtlich Methämoglobin und Hämoglobin analysiert wurde, und zwar am Tag 1, 3, 5, 8, 10, 12, 17, 19, 23 und 25. Deutliche klinische Symptome wurden nur an einzelnen Tieren der höchsten Konzentrationsgruppe beobachtet (Zyanose bei 6 Tieren, Hyperämie der Ohren bei einem Tier). In der mittleren und der höchsten

Konzentrationsgruppe starb je ein Tier nach der 7. bzw. 9. Exposition, ohne dass die Todesursache aufgeklärt werden konnte. Die 10-malige Exposition gegenüber der niedrigsten Konzentration an o-Chlornitrobenzol (30 mg/m³) führte zu keinerlei Effekten bei den Tieren, verglichen mit der Kontrolle. Bei der hohen Konzentration wurde eine leichte, in der Erholungsphase reversible erniedrigte Körpergewichtsentwicklung beobachtet. Die Urinalysen ergaben keine Effekte der Prüfsubstanz. In den Tiergruppen, die mit 160 oder 530 mg/m³ behandelt wurden, kam es zu einer hämolytischen Anämie, Methämoglobinämie und zu einer kompensatorischen Hämatopoese. Bereits nach der ersten Behandlung war der Hämoglobingehalt gesenkt. Das setzte sich bis zur 10. Behandlung (Tag 12) konzentrationsabhängig fort. Der Methämoglobingehalt im Blut wurde bei einer o-Chlornitrobenzol-Konzentration von 160 mg/m³ nicht signifikant bis maximal 3 % gesteigert. Bei 530 mg/m³ stieg er am 3. Behandlungstag auf 21 % und blieb bis zum Ende der Behandlung auf dieser Höhe. Die Behandlung mit 530 mg o-Chlornitrobenzol/m³ bewirkte auch einen Abfall der Erythrozytenzahl im Blut. Direkt nach den 10 Behandlungen getötete Tiere der höchsten Konzentrationsgruppe zeigten einen leichten Anstieg der Milzgewichte, makroskopisch eine Vergrößerung und Dunkelfärbung sowie histopathologisch Blutandrang und Hämosiderinablagerungen in der Milz. Bis auf die Hämosiderinablagerungen in der Milz und den Abfall der Erythrozytenzahl waren bis zum Ende der 13-tägigen Nachbeobachtungszeit alle Effekte reversibel. Bei der mittleren und höchsten Konzentration kam es zu leichten degenerativen und regenerativen Leberveränderungen. Das Lebergewicht war geringfügig erhöht, entsprechend einer geringen Lebervergrößerung. Histopathologisch wurden in den Hepatozyten zytoplasmatische Lipidvakuolisierung, zentrilobulär blass verfärbtes Zytoplasma und vermehrt Mitosen gesehen. Diese Effekte waren nach der Erholungsphase reversibel. Ebenfalls waren die in der höchsten Konzentrationsgruppe beobachteten Erhöhungen der Alaninaminotransferase-Aktivität, des Harnstoffes, des Gesamtproteins und des Cholesterins im Blutserum reversibel. Weitere prüfsubstanzbedingte Befunde konnten nicht erhoben werden. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Angriffspunkte für toxische Wirkungen von o-Chlornitrobenzol das hämatopoetische System und die Leber sind. Der no effect level betrug 30 mg/m³ (Haskell, 1984).

In einer umfassenden subakuten Inhalationstoxizitätsstudie wurden Sprague-Dawley-Ratten über 4 Wochen 6 Stunden/Tag an 5 Tagen/Woche der

Ganzkörperexposition gegenüber o-Chlornitrobenzol (99,7 % rein) angereicherter Luft unterzogen. Pro Konzentrationsgruppe wurden 15 männliche Tiere (216 bis 283 g schwer) und 15 weibliche Tiere (150 bis 183 g schwer) eingesetzt. Als Kontrollgruppe dienten 15 weibliche und 15 männliche Tiere, die nur mit Luft in der Inhalationskammer behandelt wurden. Die o-Chlornitrobenzol-Konzentrationen betragen 10, 30 bzw. 60 mg/m³. Für die Herstellung dieser Konzentrationen wurde Stickstoff durch das auf 40 bis 45 °C erhitzte o-Chlornitrobenzol geleitet und die entstehende Dampfphase mit Luft entsprechend gemischt. Nach Beendigung der Expositionen wurden die Tiere getötet, nachdem Blut aus der Retroorbitalvene entnommen worden war. Die Sektion aller Tiere und die histopathologische Untersuchung von insgesamt 35 Organen und Geweben von jeweils 10 Tieren/Geschlecht der Kontrollgruppe und der Gruppe mit der höchsten Konzentration schlossen sich an. Die Milz wurde in allen Konzentrationsgruppen histopathologisch untersucht. Blut für die Methämoglobinbestimmung wurde auch nach 2 Behandlungswochen retroorbital entnommen. Unter der Behandlung mit o-Chlornitrobenzol traten keine Todesfälle auf. Testsubstanbedingte klinische Symptome oder Augenschäden wurden nicht beobachtet. Die Körpergewichtsentwicklung der Tiere entsprach der der Kontrollen. Bereits nach 2 Wochen war die Methämoglobinkonzentration dosisabhängig ab der unteren Konzentration und signifikant ab der mittleren Konzentration erhöht. Nach 4 Wochen wurden bei der hohen Konzentration 4,8 % Methämoglobin bei den Weibchen und 5,7 % bei den Männchen erreicht. Der Hämoglobingehalt und die Zahl der Erythrozyten im Blut war gesenkt. Die Sektion der Tiere nach der Behandlung erbrachte keine sichtbaren Effekte der Prüfsubstanz. Die absoluten und relativen Organgewichte von Leber und Milz waren bei der mittleren und hohen Konzentrationsgruppe signifikant erhöht, von den Nieren nur schwach, aber auch signifikant. In der niedrigsten Konzentrationsgruppe war nur das relative Lebergewicht der männlichen Tiere schwach signifikant erhöht. Die histopathologische Untersuchung ergab nur in der Milz Veränderungen: vermehrte extramedulläre Hämatopoese in der mittleren und höchsten Konzentration und ausgeprägte Hämosiderose bereits bei der niedrigsten Konzentration. Alle anderen Organe waren ohne Befund. Die Autoren sahen den ausgeprägtesten toxischen Effekt des o-Chlornitrobenzols in der Wirkung auf das hämatopoetische System, der sich auch noch bei der niedrigsten Konzentration von 10 mg/m³ zeigte (Nair et al., 1986).

Als Voruntersuchung für eine subchronische Toxizitätsstudie wurden 6 Wochen alte männliche und weibliche Ratten (F344/N) einer Ganzkörperinhalationsbehandlung mit o-Chlornitrobenzol (> 99 % rein) unterzogen. Gruppen von je 5 Tieren/Geschlecht und Konzentration wurden über 2 Wochen an 5 Tagen/Woche jeweils 6 Stunden Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 1,1, 2,3, 4,5, 9 bzw. 18 ppm o-Chlornitrobenzol (entsprechend 0, 7, 14,7, 28,8, 57,6 bzw. 115,2 mg/m³) ausgesetzt. Am Ende der Behandlungsperiode waren keine Einflüsse auf die Körpergewichtsentwicklung der Tiere festzustellen. Todesfälle traten nicht auf. Klinische Symptome traten nach Behandlung mit 18 ppm in Form von nasalem Ausfluss bei Weibchen und Männchen und zusätzlicher Hypoaktivität, Ataxie und Blässe bei den Männchen auf. Bei der Sektion wurden keine pathologischen Befunde erhoben. In der 18 ppm-Gruppe waren die absoluten und relativen Leber- und Milzgewichte erhöht und das relative Nierengewicht leicht erhöht. Die Lebergewichte waren absolut und relativ auch in den niedrigeren Konzentrationsgruppen erhöht (keine weiteren Angaben). Die histopathologische Untersuchung zeigte in der Leber geringe Hämosiderinablagerungen im portalen Bereich und um die Zentralvenen bei 18 ppm-Behandlung. Auch die Milz wies eine schwache Hämosiderinablagerung in dieser Behandlungsgruppe auf. Histopathologische Veränderungen, die zur Erklärung der Erhöhung der Organgewichte herangezogen werden könnten, wurden nicht beobachtet. Sonstige Untersuchungen, wie Blut- und Urinalysen, wurden nicht durchgeführt (NTP, 1993). Ein no effect level konnte in dieser Konzentrationsfindungsstudie nicht bestimmt werden.

Parallel wurden auch 6 Wochen alte männliche und weibliche Mäuse (B6C3F1) einer Ganzkörperinhalationsbehandlung mit o-Chlornitrobenzol (> 99 % rein) unterzogen. Auch hier wurden die Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 1,1, 2,3, 4,5, 9 bzw. 18 ppm (entsprechend 0, 7, 14,7, 28,8, 57,6 bzw. 115,2 mg/m³) verwendet und Gruppen von je 5 männlichen und 5 weiblichen Tieren/Konzentration 6 Stunden/Tag an 5 Tagen/Woche über 2 Wochen exponiert. Die Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung der Tiere. In der höchsten Konzentrationsgruppe starb ein Tier nach 2-tägiger Behandlung, bei dem ein deutlicher Leberschaden diagnostiziert werden konnte. Klinische Symptome wurden nur in der höchsten Behandlungsgruppe vorwiegend bei Männchen als Hypoaktivität, abnorme Körperhaltung und Dyspnoe gefunden. Die absoluten und relativen Lebergewichte waren in allen mit o-Chlornitrobenzol behandelten

Gruppen konzentrationsabhängig und deutlich erhöht. Die absoluten und relativen Nieren- und Milzgewichte waren nur in der 18 ppm-Gruppe erhöht. Die Sektion ergab keine pathologischen Befunde bis auf eine Verfärbung und raue Oberfläche der Lebern bei einigen Tieren der 18 ppm-Gruppe. Histopathologische Veränderungen wurden in Leber und Milz gefunden. Zentrilobuläre Nekrosen traten in der Leber konzentrationsabhängig auf und waren bei den Tieren der 18 ppm-Gruppe von granulomatösen Entzündungsprozessen begleitet. In der 9 und der 18 ppm-Gruppe wurde eine Vergrößerung der zentrilobulären Hepatozyten sichtbar. In der Milz wurde ein Ansteigen der hämatopoetischen Aktivität in den 4,5, 9 bzw. 18 ppm-Gruppen bei den Weibchen und nur in der 18 ppm-Gruppe bei den Männchen beobachtet. In der 18 ppm-Gruppe kam es zusätzlich bei 4/5 männlichen und allen weiblichen Tieren zu einer schwächeren Hämosiderinablagerung. Sonstige Untersuchungen, wie Blut- und Urinanalysen, wurden nicht durchgeführt (NTP, 1993). Ein no effect level konnte in dieser Konzentrationsfindungsstudie nicht bestimmt werden.

7.3 Haut- und Schleimhautverträglichkeit

Die Wirkung von o-Chlornitrobenzol auf die Haut wurde an 6 Neuseeland-Kaninchen untersucht, denen 0,5 ml des leicht erwärmten, unverdünnten Stoffes für 24 Stunden aufgetragen wurden. Innerhalb einer Beobachtungszeit von 168 Stunden traten keine Anzeichen für eine Hautreizung, Erytheme oder Ödeme auf (keine weiteren Angaben; Younger Laboratories, 1973).

In einer weiteren Untersuchung, in der Albino-Himalaja-Kaninchen verwendet wurden, erhielten 6 Tiere (Gewicht 1,5 bis 2,0 kg) auf je eine geschorene unverletzte und eine geschorene skarifizierte Flankenhautstelle von 3 cm x 3 cm 0,5 ml einer 10-prozentigen Lösung in Sesamöl von o-Chlornitrobenzol verabreicht, die für 24 Stunden mit Gaze und elastischer Binde abgedeckt wurde. Ablesungen erfolgten nach 24, 48 und 72 Stunden. 4 der Kaninchen zeigten an der intakten und an der skarifizierten Flankenhaut geringgradige Reizerscheinungen (sehr leichte, kaum wahrnehmbare Erytheme) direkt nach Verbandabnahme, die aber nach 48 Stunden reversibel waren. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wirkte o-Chlornitrobenzol nicht hautreizend (Hoechst, 1975 d).

An Albino-Kaninchen (3,5 bis 4,0 kg schwer) wurde die hautreizende Wirkung von o-Chlornitrobenzol an der unbehaarten Innenseite der Ohrmuschel bestimmt. Zellstoffplättchen von 2 cm x 2 cm, auf die 500 mg o-Chlornitrobenzol gegeben worden waren, wurden für 24 Stunden bei 2 Kaninchen mittels Pflasterverband fixiert. An den behandelten Arealen wurden weder bei Abnahme des Verbandes noch während der 7-tägigen Nachbeobachtungszeit Veränderungen beobachtet. Somit wirkte o-Chlornitrobenzol auch in dieser Untersuchung nicht reizend (Bayer, 1976).

Die Wirkung von o-Chlornitrobenzol auf die Augen von Neuseeland-Kaninchen wurde an 6 Tieren geprüft, denen 0,1 ml des leicht erwärmten, unverdünnten Stoffes in den Bindehautsack des Auges appliziert wurde. Bei der Beobachtung nach 24 Stunden zeigten sich leichte bis mäßige Erytheme der Bindehaut, die nach weiteren 24 Stunden abgeklungen und nach 48 Stunden reversibel waren. Die Autoren bewerteten o-Chlornitrobenzol damit als nicht augenreizend (Younger Laboratories, 1973).

In einer weiteren Untersuchung zur Schleimhautverträglichkeit wurden je 6 Albino-Kaninchen entweder 100 mg unverdünntes oder 0,1 ml einer 10-prozentigen Lösung in Sesamöl von o-Chlornitrobenzol in den Bindehautsack am Auge appliziert. Beobachtet wurde bei den mit der unverdünnten Probe behandelten Tieren nach einer Stunde eine leichte bis mäßige Rötung der Bindehaut, die nach 7 Stunden bei 4/6 und nach 24 Stunden bei allen Tieren vollständig reversibel war. Die 10-prozentige Lösung ergab eine leichte, reversible Rötung der Bindehaut bei 3 der 6 Kaninchen in der ersten Stunde. Die Autoren bewerteten danach o-Chlornitrobenzol als kaum schleimhautreizend (Hoechst, 1975 d).

Die Wirkung von o-Chlornitrobenzol auf die Augenschleimhaut von Kaninchen wurde an 2 Tieren (3,5 bis 4,0 kg schwer) geprüft, denen je 50 mg des Stoffes in den Bindehautsack des rechten Auges eingebracht wurden. Es kam dadurch weder am Applikationstag noch während der 7-tägigen Nachbeobachtungszeit zu Veränderungen an den Augenschleimhäuten bzw. an der Cornea. o-Chlornitrobenzol zeigte somit in diesem Test keine schleimhautreizende Wirkung (Bayer, 1976).

7.4 Sensibilisierende Wirkung

In einer nur unzureichende Angaben enthaltenden Arbeit zur sensibilisierenden Wirkung von o-Chlornitrobenzol nach langfristiger Inhalation kleiner Mengen durch Ratten wurden Gruppen von je 25 Tieren einer Konzentration von 0,008 mg/m³ über 5 Monate ausgesetzt (keine weiteren Angaben) oder ohne Behandlung (Kontrollen) belassen. Direkt anschließend an die Behandlung wurde die Sensibilisierung der Ratten mit der Mikropräzipitinreaktion nach Vanier, der Auflösungsreaktion der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zur Bestimmung der in den Zellen fixierten Antikörper in vitro, der Bestimmung der passiven Sensibilisierung nach Praustnitz-Küstner und durch Injektion von 0,2 ml einer o-Chlornitrobenzol-Lösung (105 mg/l) in die Oberlippe der Tiere mit 6 Tage späterer Feststellung der Effekte überprüft (keine weiteren Angaben). Alle Teste verliefen positiv und gaben damit einen Hinweis auf ein sensibilisierendes Potential des o-Chlornitrobenzols. Dieses reagierte allerdings schwächer als das mitgeprüfte p-Chlornitrobenzol (Rusakov et al., 1973).

Die selben Autoren untersuchten auch die hautsensibilisierende Wirkung von o-Chlornitrobenzol am Meerschweinchen. 10 Tiere wurden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 3 Tropfen einer 1-prozentigen Lösung des Stoffes in Aceton auf der geschorenen Rückenhaut behandelt. Am 7. Tag erfolgte die Auslösung mit einem Tropfen der gleichen Lösung auf ein anderes geschorenes Hautareal. Bei keinem der Tiere wurde eine Reaktion beobachtet. Die Versuche wurden dann an den selben Tieren mit einer 10-prozentigen o-Chlornitrobenzol-Lösung fortgesetzt. Am 22. Versuchstag wurde ihnen 0,2 ml Freund's Adjuvans zusammen mit 0,5 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht in die Fußballen der Hinterpfoten injiziert. Am 6. Tag nach dieser Injektion wurde die Auslösung mit einem Tropfen einer 10-prozentigen Lösung des Stoffes auf eine geschorene, sonst unbehandelte Hautpartie vorgenommen. Bei 50 % der behandelten Tiere wurde von den Autoren eine positive allergische Reaktion beschrieben. Bei dem mitgeprüften p-Chlornitrobenzol waren es 100 % (Rusakov et al., 1973).

Die vorliegenden Untersuchungen zur sensibilisierenden Wirkung des o-Chlornitrobenzols sind so unvollständig dokumentiert und verwenden heute nicht mehr gebräuchliche Methoden, dass eine abschließende Bewertung nicht möglich ist. Es besteht jedoch ein Hinweis darauf, dass

o-Chlornitrobenzol möglicherweise sensibilisierende Eigenschaften sowohl beim Auftrag auf die Haut als auch nach längerfristiger Inhalation besitzt.

7.5 Subchronische und chronische Toxizität

In einer umfangreichen Studie im Rahmen des US National Toxicology Program (NTP) zur subchronischen Toxizität von o-Chlornitrobenzol wurden Gruppen von je 10 männlichen und weiblichen, 5 bis 6 Wochen alten Ratten (F344/N) über 13 Wochen einer Ganzkörperinhalationsbehandlung unterworfen. Als Inhalationskonzentration wurden 0 (Kontrollen), 1,1, 2,3, 4,5, 9 bzw. 18 ppm (entsprechend 0, 7, 14,7, 28,8, 57,6 bzw. 115,2 mg/m³) ausgewählt. Die Behandlung erfolgte über 6 Stunden/Tag an 5 Tagen/Woche. Die Prüfsubstanz (> 99 % rein) wurde durch Erwärmen bis deutlich oberhalb des Schmelzpunktes und Durchleiten von erwärmtem Stickstoff in die Gasphase gebracht und in der erwärmten, geschlossenen Inhalationsapparatur mit erwärmter Luft vermischt, um das Auftreten eines Aerosols zu vermeiden. Blutentnahmen durch Punktion des Retroorbitalsinus wurden am 1. (nur für die Methämoglobinbestimmung), 4. und 23. Tag und am Versuchsende durchgeführt. Für die zwischenzeitlichen Blutentnahmen zur Durchführung von hämatologischen und klinisch-chemischen Analysen wurden zusätzlich je 10 männliche und 10 weibliche Tiere in jeder Gruppe mitgeführt. Am Versuchsende wurden die Tiere getötet, der Sektion unterworfen und alle relevanten Organe und Gewebe der Kontrollen und der höchsten Konzentrationsgruppe histopathologisch untersucht. Außerdem wurden alle Organe und Gewebe, die makroskopische Veränderungen aufwiesen, auch in den anderen Konzentrationsgruppen lichtmikroskopisch untersucht. Organe und Gewebe, die histopathologische Veränderungen zeigten, wurden auch in den niedrigeren Konzentrationsgruppen untersucht. Die Zielorgane Leber, Nieren, Milz und Nasenhöhlen wurden in allen Konzentrationen histopathologisch untersucht. Zusätzlich wurde eine umfassende Untersuchung der Reproduktionsorgane vorgenommen (ausführliche Darstellung siehe Kapitel 7.8.). Keines der 13 Wochen lang behandelten Tiere verstarb in diesem Zeitraum. Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung wurden nicht beobachtet. Keines der Tiere zeigte unter der Behandlung klinische Symptome. Die hämatologische Untersuchung zeigte eine deutliche Methämoglobinämie, die nach 13 Wochen Behandlung bei allen Konzentrationen nachweisbar war und sich konzentrationsabhängig

steigerte. Die Methämoglobinkonzentration war in den meisten Expositionsgruppen bereits nach einem Tag Behandlung erhöht, nach 23 Tagen in allen Gruppen bei den Männchen und ab 2,3 ppm bei den Weibchen. Am Behandlungsende wurden in der 18 ppm-Gruppe bei den Männchen das 6fache und bei den Weibchen das 4fache der Kontrollwerte erreicht. Konzentrationsabhängige mäßige Abnahmen des Hämatokrits, der Hämoglobinkonzentration und der Erythrozytenzahl traten bei Männchen und Weibchen ab 4,5 ppm auf. Im höchsten Konzentrationsbereich von 9 und 18 ppm waren alle bestimmten hämatologischen Parameter verändert, bis auf die Zahl der Leukozyten und Lymphozyten bei den Weibchen. Somit wurde bei den Tieren eine konzentrationsabhängige Methämoglobinämie und eine normozytäre normochrome Anämie festgestellt. Die klinisch-chemischen Analysen erbrachten nur schwache Abweichungen von den Kontrollwerten, die zwar gehäuft bei höheren Expositionskonzentrationen auftraten und teilweise auch signifikant waren, aber sich nicht abhängig von der Expositionsdauer zeigten und im Rahmen der Schwankungen bei den zeitlich aufeinanderfolgenden Messungen im Bereich der Kontrollen blieben. Bei den Sektionen der Tiere am Versuchsende wurden keine pathologischen Veränderungen beobachtet, bis auf eine dunkle Verfärbung der Milz bei 2 männlichen und einem weiblichen Tier der 18 ppm-Gruppe. Das absolute und relative Lebergewicht war bei den Männchen ab einer Konzentration von 2,3 ppm und bei den Weibchen von 4,5 ppm konzentrationsabhängig signifikant erhöht. Das absolute und relative Milzgewicht war bei den Weibchen ab einer Konzentration von 4,5 ppm konzentrationsabhängig signifikant erhöht, bei den Männchen nur in der 18 ppm-Gruppe. Eine schwache Erhöhung der Nierengewichte wurde in der 18 ppm-Gruppe bei beiden Geschlechtern beobachtet. Histopathologisch wurde in der Leber eine geringgradige zytoplasmatische Basophilie der zentrilobulären Hepatozyten bei allen männlichen und bei der Mehrzahl der weiblichen Ratten der 9 und 18 ppm-Gruppen diagnostiziert. Eine minimale bis schwache Pigmentierung in den proximalen Tubuli der Niere, vermutlich ein Lipofuscin-Pigment, wurde bei einzelnen männlichen Tieren ab 4,5 ppm und bei allen männlichen und weiblichen Tieren bei 18 ppm gefunden. Alle weiblichen Tiere zeigten diesen Effekt auch bei 9 ppm. Eine ausgeprägtere Kongestion der Milz wurde bei beiden Geschlechtern lediglich in den beiden oberen Konzentrationsgruppen beobachtet. Eine vermehrte Hämosiderinablagerung in der Milz wurde bei den exponierten Ratten nicht festgestellt. In allen mit o-Chlornitrobenzol behandelten Gruppen wurden Hyperpla-

sien/Hypertrophien am Epithel der Nasenhöhle beobachtet, wovon fast alle Tiere betroffen waren. Bei der Untersuchung der Geschlechtsorgane (ausführliche Darstellung siehe Kapitel 7.8) wurden bei den weiblichen Tieren keine prüfsubstanzbedingten Veränderungen festgestellt. Bei den Männchen der höchsten Konzentrationsgruppe waren das Gewicht der Cauda epididymidis, die Spermatidköpfe/Hoden und die Anzahl an Spermatiden verringert, was eine Verminderung der Spermatogenese anzeigte. Da selbst die niedrigste Konzentration von 1,1 ppm noch zu substanzbedingten Veränderungen führte, konnte kein NOAEL (no observed adverse effect level) abgeleitet werden (NTP, 1993; Travlos et al., 1996).

Mit der gleichen Versuchsanordnung und Dosierung wie bei den Ratten wurde eine Studie zur subchronischen Toxizität nach Inhalation von o-Chlornitrobenzol auch an männlichen und weiblichen, 5 bis 6 Wochen alten Mäusen (B6C3F1) von den selben Untersuchern parallel durchgeführt. Es wurden jedoch keine Blutentnahmen vorgenommen und keine hämatologischen und klinisch-chemischen Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse waren mit denen im Rattenversuch weitgehend übereinstimmend, wichen aber in einigen Punkten ab. Hier starben 2 Männchen der 18 ppm-Gruppe während der 12. Behandlungswoche. Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung sowie klinische Symptome traten unter der Behandlung nicht auf. Bei 6 männlichen und einer weiblichen Maus der 18 ppm-Gruppe war die Leber entfärbt und bei 3 weiblichen Tieren der 9 ppm-Gruppe und 4 weiblichen Tieren der 18 ppm-Gruppe war die Milz vergrößert. Das absolute und relative Nierengewicht war bei weiblichen und männlichen Mäusen ab einer Konzentration von 2,3 ppm erhöht, jedoch nur schwach und nicht konzentrationsabhängig. Das Lebergewicht war bei weiblichen Mäusen aller Konzentrationsgruppen und bei männlichen Mäusen ab 9 ppm erhöht. Eine Erhöhung der Milzgewichte wurde bei Mäusen nicht beobachtet. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten vornehmlich in der 18 ppm-Gruppe hepatozelluläre Nekrosen, Mineralisation, chronische Entzündung und Hepatozytomegalie in der Leber. In der Milz wurde nur eine minimale Steigerung der hämatopoetischen Aktivität bei weiblichen Mäusen der 9 und 18 ppm-Gruppe und keine Hämosiderose beobachtet. Die Untersuchung der Geschlechtsorgane (ausführliche Darstellung siehe Kapitel 7.8) ergab keine Befunde bei den Weibchen und bei den Männchen eine signifikante Verringerung der Spermienbeweglichkeit in den hohen Konzentrationsgruppen. Der NOAEL für histopathologische Schädigungen betrug damit 4,5 ppm (NTP, 1993; Travlos et al., 1996).

Insgesamt 42 Ratten wurden in einer unzureichend dokumentierten Studie über 7 Monate mit o-Chlornitrobenzol in Dosierungen von 0,0025, 0,005, 0,025 bzw. 5,0 mg/kg Körpergewicht oral behandelt. Nur in der höchsten Dosis von 5,0 mg/kg Körpergewicht wurden Effekte der Behandlung beobachtet. Am deutlichsten waren die Veränderungen im Blutbild. Der Methämoglobingehalt stieg während der letzten Behandlungsmonate an, der Hämoglobingehalt sank ab. Der Gehalt an Retikulozyten stieg bis auf 78 % (Kontrolle 35 %) und der Gehalt an Heinz-Körpern wurde von 0 % auf 47 % erhöht. Als Leberfunktionstest wurde die alkalische Phosphatase im Blut und der Bilirubinspiegel im Harn erhöht gefunden. Sehr schwache Wirkungen auf das zentrale Nervensystem (Verlangsamung der konditionierten Reflexreaktion) wurden beobachtet (keine weiteren Angaben; Davydova, 1967).

7.6 Gentoxizität

7.6.1 In vitro

Die vorliegenden Befunde zur gentoxischen Wirkung von o-Chlornitrobenzol in vitro sind in Tabelle 5 zusammengefasst:

Anfang Tabelle 5

Tabelle 5. In vitro-Gentoxizitätsteste mit o-Chlornitrobenzol					
Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich* (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
1. Teste an Salmonella typhimurium und Escherichia coli					
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1530, TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 1532, TA 1950, TA 1975, TA 1978, G46, Standardplatteninkorporationstest	1 - 2000	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	negativ unter aeroben und anaeroben Bedingungen	negativ unter aeroben und anaeroben Bedingungen	Gilbert et al., 1980
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1530, TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 1532, TA 1950, TA 1975, TA 1978, G46, Fluktuationstest	1 - 2000	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Gilbert et al., 1980

Tabelle 5. In vitro-Gentoxizitätsteste mit o-Chlornitrobenzol					
Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich* (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
Salmonella/Mikrosomen-Test nach Ames (keine weiteren Angaben)	keine Angaben	keine Angaben	positiv an TA 100	keine Angaben	D'Addario und Jagannath, 1981
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, Präinkubationstest	100 - 1000, bei 1000 Bakteriotoxizität (99 % rein)	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Ratten- und Hamsterleber	positiv an TA 100	negativ	Haworth et al., 1983; NTP, 1993
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1538, Standardplatteninkorporationstest	keine Angaben (99,7 % rein)	S9-Mix aus Rattenleber (keine Angabe zur Induktion)	negativ	negativ	Graham et al., 1983
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538, Präinkubationstest	25,6 - 3276,8, Bakteriotoxizität bei der höchsten Konzentration (99 % rein)	-	nicht geprüft	positiv an TA 98 und TA 1538	Shimizu et al., 1983
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, Präinkubationstest	5 - 100, keine Bakteriotoxizität	S9-Mix aus PCB-induzierter Rattenleber	positiv an TA 98 nur mit Zusatz von Norharman	negativ	Suzuki et al., 1983
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, Standardplatteninkorporationstest	833,3 - 2073,6, Bakteriotoxizität ab 1000 (99,8 % rein)	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	positiv an TA 100	negativ	Bayer, 1984
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, TA 1538, Standardplatteninkorporationstest	4 - 2500, bakteriotoxisch bei 2500 (99 % rein)	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	positiv an TA 98 und TA 100	positiv an TA 1538	Hoechst, 1984
Standardplatteninkorporationstest, Escherichia coli WP2 uvrA	4 - 2500, bakteriotoxisch bei 2500 (99 % rein)	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Hoechst, 1984
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1537, TA 1538	keine Angaben	S9-Mix, keine weiteren Angaben	positiv, keine Angaben, ob mit oder ohne metabolische Aktivierung und bei welchen der untersuchten Stämme		Koch et al., 1985
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 98 NR, TA 98/1,8-DNP ₆ , Präinkubationstest	5 - 20	S9-Mix aus PCB-induzierter Rattenleber	positiv an allen drei Stämmen	-	Suzuki et al., 1987
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, Präinkubationstest	100 - 5000	S9-Mix aus Kanechlor-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Kawai et al., 1987

Tabelle 5. In vitro-Gentoxizitätsteste mit o-Chlornitrobenzol					
Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich* (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
SOS-Chromo-Test, Escherichia coli PQ37	bis 1576	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	von der Hude et al., 1988
umu-Test, Salmonella typhimurium TA 1535/pSK 1002	100 µg/ml	S9-Mix aus Phenobarbital- und 5,6-Benzoflavon-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Ono et al., 1992
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, Standardplatteninkorporationstest	10 - 1000, bakteriotoxisch bei 1000	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Ratten- und Hamsterleber	positiv an TA 100 und TA 98 (TA 98 nur mit 30 % S9-Mix aus Hamsterleber)	negativ	NTP, 1993
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, Präinkubationstest	10 - 1000, bakteriotoxisch bei 1000	S9-Mix aus Phenobarbital- und 5,6-Benzoflavon-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	JETOC, 1996
Präinkubationstest, Escherichia coli WP2 uvrA	10 - 1000, bakteriotoxisch bei 1000	S9-Mix aus Phenobarbital- und 5,6-Benzoflavon-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	JETOC, 1996
Salmonella/Mikrosomen-Test, Salmonella typhimurium TA 98, TA 100, TA 102, TA 104, TA 1535, TA 1537, Präinkubationstest	39,1 - 625, Bakteriotoxizität ab 500	S9-Mix aus Phenobarbital- und 5,6-Benzoflavon-induzierter Ratten- und Hamsterleber	positiv an TA 100 und TA 98	negativ	JETOC, 1997
Präinkubationstest, Escherichia coli WP2 uvrA	39,1 - 625, Bakteriotoxizität ab 500	S9-Mix aus Phenobarbital- und 5,6-Benzoflavon-induzierter Ratten- und Hamsterleber	positiv nur in einem Test und mit S9-Mix aus Hamsterleber	negativ	JETOC, 1997
2. Teste an Säugerzellen					
Chromosomenaberration, Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO), 100 Metaphasen/Konzentration analysiert	10 - 100 µg/ml (- S9; 99,8 % rein), 25 - 250 µg/ml (+ S9; 99,8 % rein)	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	Huntingdon, 1988
Genmutationstest, Lungenzellen des Chinesischen Hamsters (V79), HPRT-Test	100 - 900 µg/ml (- S9), 100 - 1200 µg/ml (+ S9), zelltoxisch bei der jeweils höchsten Konzentration	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	negativ	negativ	TNO, 1989

Tabelle 5. In vitro-Gentoxizitätsteste mit o-Chlornitrobenzol					
Testsystem	geprüfter Konzentrationsbereich* (µg/Platte)	metabolisches Aktivierungssystem	Ergebnis		Literatur
			mit metabolischer Aktivierung	ohne metabolische Aktivierung	
Chromosomenaberration, Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO), 200 Metaphasen/Konzentration analysiert	16 - 216 µg/ml (- S9), 50 - 500 µg/ml (+ S9)	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	in zwei Untersuchungen schwach positiv, in einer negativ	in einer Untersuchung negativ, in einer fraglich	NTP, 1993
Schwester-Chromatid-Austausch-Test (SCE-Test), Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO), 50 Metaphasen/Konzentration analysiert	5 - 75 µg/ml (- S9), 50 - 500 µg/ml (+ S9)	S9-Mix aus Aroclor-induzierter Rattenleber	in zwei Untersuchungen schwach positiv, in einer negativ	in zwei Untersuchungen positiv bzw. schwach positiv, in einer negativ	NTP, 1993
UDS-Test, primäre Rattenhepatozyten	bis zu 100 µg/ml, 500 µg/ml zytotoxisch	Rattenhepatozyten	negativ	-	Monsanto, ohne Jahreszahl
* sofern nicht angegeben, finden sich in den Publikationen keine Angaben zur zytotoxischen Wirkung sowie zur Reinheit und/oder zu eventuellen Verunreinigungen des verwendeten o-Chlornitrobenzols					

Ende Tabelle 5

In zahlreichen Untersuchungen an *Salmonella typhimurium*, die als Standardplatteninkorporationsteste, als Präinkubationsteste bzw. als Fluktuationsteste durchgeführt wurden, zeigte o-Chlornitrobenzol bei den Stämmen TA 102, TA 104, TA 1530, TA 1532, TA 1535, TA 1537, TA 1950, TA 1975, TA 1978 und G46 weder ohne noch mit metabolischer Aktivierung durch S9-Mix eine gentoxische Wirkung. Genmutationen wurden an diesen Stämmen in keinem Fall ausgelöst. Ohne metabolische Aktivierung wurden mit den weiteren geprüften Stämmen TA 98, TA 100 und TA 1538 mit Ausnahme zweier positiver Befunde am Stamm TA 1538 und eines positiven Ergebnisses am Stamm TA 98 nur negative Ergebnisse erhalten (Shimizu et al., 1983; Hoechst, 1984). Diesen positiven Befunden stehen zwei negative Befunde am Stamm TA 1538 bzw. zahlreiche negative Ergebnisse am Stamm TA 98 unter vergleichbaren Versuchsbedingungen entgegen (Gilbert et al., 1980; Graham et al., 1983; sowie weitere Autoren siehe Tabelle 5). Mit metabolischer Aktivierung waren die Untersuchungen am Stamm TA 1538 sämtlich negativ. Von insgesamt 13 Untersuchungen an dem Stamm TA 100, die mit metabolischer Aktivierung durch Zusatz von S9-Mix durchgeführt wurden, verliefen 6 negativ und die anderen 7 positiv. Ein ganz ähnliches Bild ergaben die Untersuchungen an dem Stamm TA 98. Von 12 mit metabolischer Aktivierung durchgeführten Testen hatten 5 positive und 7 negative Ergebnisse. Interessant war in diesem Zusammen-

hang der Befund, dass der Stamm TA 98 in einem Präinkubationstest unter den gegebenen Bedingungen mit Zusatz von S9-Mix keine genotoxischen Effekte bis zur höchsten Konzentration von 100 µg o-Chlornitrobenzol/Platte zeigte, bei zusätzlicher Gabe von Norharman (200 µg/Platte) aber 9600 Revertanten (Kontrolle 39) hervorbrachte (Suzuki et al., 1983). In einer weiteren Arbeit wurde unter Hinzuziehung eines *Salmonella typhimurium*-Stammes TA 98 NR mit Nitroreduktasemangel nachgewiesen, dass o-Chlornitrobenzol zur Entfaltung seiner mutagenen Wirkung zu o-Chlorphenylhydroxylamin reduziert werden muss und dass diese Reduktion im normalen Stamm TA 98 durch die bakterieneigene Nitroreduktase erfolgt. Am Stamm TA 98 NR war o-Chlornitrobenzol deutlich weniger mutagen als an TA 98. Ein weiterer *Salmonella typhimurium*-Stamm TA 98/1,8-DNP₆ mit einem Mangel an esterifizierendem Enzym zeigte eine deutlich höhere mutagene Empfindlichkeit gegenüber o-Chlornitrobenzol als der normale Stamm TA 98, was so interpretiert wurde, dass die im normalen Stamm stattfindende Veresterung eine hemmende Wirkung auf die mutagene Aktivität von o-Chlornitrobenzol hat. Die Autoren schlossen daraus, dass die metabolische Aktivierung durch S9-Mix und der Zusatz von Norharman keinen direkten Einfluss auf die Reduktion von o-Chlornitrobenzol und eine Esterifizierung haben, die für die mutagene Wirkung des Stoffes von Bedeutung sind. Sie vermuteten vielmehr, dass S9-Mix und Norharman eine Ringoxidation am o-Chlornitrobenzol stimulieren, die ebenfalls für die deutliche Ausbildung einer mutagenen Wirkung schon bei niedrigen Konzentrationen von o-Chlornitrobenzol erforderlich ist (Suzuki et al., 1987).

In einer weiterführenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Norharman mit aromatischen Aminen in Gegenwart von S9-Mix ein Addukt bildete, das für die mutagene Wirkung der Amine verantwortlich war. Anilin und Norharman bildeten in Gegenwart von S9-Mix Aminophenylnorharman, das zu Hydroxyaminophenylnorharman oxidiert und zur Bildung von Estern, z. B. mit Essigsäure, aktiviert wurde. In dieser Form reagierte es mit den Basenbausteinen der DNA und erzeugte Mutationen in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA 98 und TA 100 (Totsuka et al., 1998). Im Licht der vorliegenden Befunde sind die unter Zusatz von Norharman erhaltenen positiven Befunde mit den genannten Bakterienstämmen als Nachweis einer mutagenen Wirkung von o-Chlornitrobenzol als zweifelhaft anzusehen, da dieser Stoff metabolisch zur Amino- und Hydroxyamino-

Verbindung umgewandelt wird, die vermutlich wie die aus Anilin gebildete Verbindung reagiert.

In der Gesamtschau der mit o-Chlornitrobenzol im Salmonella/Mikrosomen-Test erhobenen Befunde kann angenommen werden, dass die Verbindung ohne metabolische Aktivierung in diesem Testsystem nicht genmutagen wirkt. Mit metabolischer Aktivierung wurden nur bei den Stämmen TA 98 und TA 100 sowohl positive als auch negative Ergebnisse erhalten. Die Untersuchungen an allen anderen Stämmen verliefen negativ.

Mit *Escherichia coli* WP2 uvrA wurden zwei Präinkubationsteste mit negativem Ergebnis berichtet (JETOC, 1996, 1997). Negativ verlief auch ein SOS-Chromotest mit *Escherichia coli* PQ37 (von der Hude et al., 1988) und ein umu-Test mit *Salmonella typhimurium* mit dem Stamm TA 1535/pSK 1002 auf DNA-schädigende Wirkung (Ono et al., 1992).

An Säugerzellen ergaben sich ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. Ein Genmutationstest an V79-Lungenzellen des Chinesischen Hamsters verlief ohne und mit metabolischer Aktivierung eindeutig negativ (TNO, 1989). SCE-Teste an Ovarzellen des Chinesischen Hamsters zur Bestimmung von DNA-Schäden durch o-Chlornitrobenzol, die parallel von zwei Laboratorien durchgeführt wurden, zeigten in einem Labor ohne metabolische Aktivierung ein positives Ergebnis, das in einem zweiten Versuch reproduzierbar war. Mit metabolischer Aktivierung war das Ergebnis negativ. Das andere Labor fand ohne metabolische Aktivierung keine Zunahme der SCEs (Schwester-Chromatid-Austauschrates), aber mit metabolischer Aktivierung ein schwach positives, in einem zweiten Versuch reproduzierbares Ergebnis (NTP, 1993). In einem Chromosomenaberrationstest an Ovarzellen des Chinesischen Hamsters wurde ohne und mit metabolischer Aktivierung ein negatives Ergebnis erhalten (Huntingdon, 1988). In einem gleichartig durchgeführten Test, der wieder von zwei Laboratorien parallel angesetzt wurde, ergaben sich in einem Labor ein negatives Ergebnis mit metabolischer Aktivierung und ein fragliches Ergebnis ohne metabolische Aktivierung. In dem anderen Labor wurde mit metabolischer Aktivierung ein schwaches, in einem zweiten Test reproduzierbares positives Ergebnis erhalten. Ohne metabolische Aktivierung war das Testergebnis negativ (NTP, 1993). In einem UDS-Test an primären Rattenhepatozyten war o-Chlornitrobenzol bis zur höchsten nicht zytotoxischen Konzentration negativ.

7.6.2 In vivo

In einem alkalischen Elutionstest wurde 8 männlichen Mäusen (Swiss CD1) eine Dosis von 60 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen an Lösemittel appliziert. 4 Stunden später wurden die Tiere getötet, Leber und Nieren entnommen und die Zellkerne isoliert. Daraus wurde die DNA fraktioniert, mit alkalischem Puffer eluiert und mit einer fluorimetrischen Methode analysiert. DNA-Fragmente niederen Molekulargewichtes eluieren schneller als die hochmolekularen DNA-Stränge, sodass man mit dieser Methode Einzelstrangbrüche der DNA nachweisen kann. o-Chlornitrobenzol bewirkte in dieser Untersuchung sowohl in der Niere als auch in der Leber ein deutliches Ansteigen der schnell eluierenden DNA-Fraktion (keine weiteren Angaben; Cesarone et al., 1982).

Die mutagene Wirkung von o-Chlornitrobenzol wurde auch an *Drosophila melanogaster* in einem geschlechtsgebundenen Rezessiv-Letal-Test untersucht. Männliche erwachsene Fliegen (Canton-S Wild Typ, nicht älter als 24 Stunden) wurden in Fütterungsgefäßen über 72 Stunden mit einer 5-prozentigen Zuckernährlösung behandelt, die 125 ppm o-Chlornitrobenzol (99 % rein), gelöst in 10-prozentigem Ethanol, enthielt. Danach wurden die Männchen mit unbehandelten Weibchen verpaart. Eine Erhöhung der Todesfälle bei den Nachkommen konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die Injektion von 10000 ppm o-Chlornitrobenzol (keine Angabe der Injektionsmenge) in das Abdomen 1 bis 3 Tage auf Normalfutter gehaltener männlicher Fliegen und die Verpaarung derselben mit unbehandelten Weibchen nach weiteren 24 Stunden erbrachte keine Erhöhung der Todesraten bei den Nachkommen, sodass o-Chlornitrobenzol in diesem Test keine mutagene Wirkung zeigte. Beide verwendeten o-Chlornitrobenzol-Konzentrationen waren so gewählt, dass 30 % der Tiere unter der Behandlung starben (Zimmering et al., 1985).

In einem weiteren geschlechtsgebundenen Rezessiv-Letal-Test an *Drosophila melanogaster* wurden die Tiere im Larvenstadium mit o-Chlornitrobenzol behandelt. Während der Entwicklung der Fliegen vom Ei zum ausgewachsenen Tier wurde das Standardfutter mit 60 ppm o-Chlornitrobenzol (99 % rein, gelöst in 4-prozentigem Ethanol) verabreicht. Die so aufgezogenen Männchen, die etwa einen Tag alt waren, wurden mit unbehandelten Weibchen verpaart und die Todesfälle bei den Nachkommen beobach-

tet. Die o-Chlornitrobenzol-Konzentration war so gewählt, dass etwa 30 % der eingesetzten Larven durch die Behandlung starben. Eine erhöhte Mortalität der Nachkommen der überlebenden Männchen mit unbehandelten Weibchen war nicht zu beobachten, sodass sich auch hier keine mutagene Wirkung des o-Chlornitrobenzols zeigte (Zimmering et al., 1989).

7.7 Kanzerogenität

In einer Langzeitstudie zur Kanzerogenität wurde männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River CD) und männlichen und weiblichen HaM/ICR-Mäusen (Charles River CD-1) o-Chlornitrobenzol (97 bis 99 % rein) über 18 Monate täglich mit dem Futter verabreicht. Eingesetzt wurden Gruppen von je 25 Tieren, die 4 bis 6 Wochen alt waren. Die mitgeführten Kontrolltiere erhielten Normalfutter. Es wurden jeweils zwei Dosierungen angewendet, von denen die höhere die durch einen 30-tägigen Vorversuch bestimmte maximal tolerierte Dosis war und die niedrige die Hälfte davon (keine weiteren Angaben). Da im Lauf der Untersuchung mit den hohen Dosierungen Verringerungen der Körpergewichtszunahme um $\geq 10\%$ und gehäuft Todesfälle auftraten, wurden bei den Ratten nach 6 Monaten und bei den Mäusen nach 8 Monaten die Dosierungen herabgesetzt. Die Ratten wurden danach während der ersten 6 Monate mit 1000 und 2000 mg o-Chlornitrobenzol/kg Futter behandelt und erhielten während der folgenden 12 Monate 500 und 1000 mg o-Chlornitrobenzol/kg Futter verabreicht. Bei den Mäusen waren es in den ersten 8 Monaten 3000 und 6000 mg o-Chlornitrobenzol/kg Futter und während der folgenden 10 Monate 1500 und 3000 mg o-Chlornitrobenzol/kg Futter. Das entsprach einer täglichen Dosis von 100 bzw. 200 und 50 bzw. 100 mg/kg Körpergewicht für die Ratten und von 300 bzw. 600 sowie 150 und 300 mg/kg Körpergewicht für die Mäuse (bei der Annahme einer Futteraufnahme von 1/10 des Körpergewichtes). Nach Ablauf der 18-monatigen Behandlung wurden die Ratten weitere 6 Monate und die Mäuse weitere 3 Monate mit normalem Futter gehalten und dann getötet. Alle Tiere, die im Versuch nach dem 6. Behandlungsmonat starben, und alle am Ende der Untersuchung getöteten Tiere wurden sezirt und einer umfangreichen Untersuchung unterzogen. Angaben zu Symptomen, zur Mortalität und zum Verlauf der Körpergewichtsentwicklung in den einzelnen Untersuchungsgruppen fehlen. Die vorhandenen Daten zur Tumorfrequenz und zur Art der beobachteten Tumoren sind in Tabelle 6 zusammengefasst:

Tabelle 6. Kanzerogenitätsstudie mit o-Chlornitrobenzol an Ratten und Mäusen, Zahl der tumortragenden Tiere/Gesamtzahl der überlebenden Tiere (Weisburger et al., 1978)

Tierart und Geschlecht	Art der nachgewiesenen Tumoren	Anzahl der nachgewiesenen Tumoren			
		niedrige Dosierung	hohe Dosierung	mitgeführte Kontrolle	gepoolte Kontrolle*
Ratte, männlich	verschiedenartige Tumoren**	7/22	1/19	1/22	14/111
Maus, männlich	Hepatome	7/17	3/16	3/18	7/99
Maus, weiblich	Hepatome	5/22	5/19	0/20	1/102

* Kontrollen aus parallel durchgeführten Versuchen
 ** Adenokarzinom der Schilddrüse, Lymphosarkom und Cholangiosarkom der Leber, Papillom des Magens, Hypophysenadenom und subkutanes Fibrom (keine weiteren Angaben)

Die Tabelle 6 zeigt, dass bei männlichen Ratten unter den angegebenen Versuchsbedingungen die allgemeine Tumorfrequenz in der niedrigen Dosis (100 mg/kg Körpergewicht bzw. später 50 mg/kg Körpergewicht) deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht war, während die hohe Dosierung diese Wirkung nicht hervorbrachte. Bei den Mäusen wurden ausschließlich Hepatome gefunden, wobei die Männchen eine Erhöhung der Häufigkeit auch nur in der niedrigen Dosis (300 mg/kg Körpergewicht bzw. später 150 mg/kg Körpergewicht) aufwiesen. Die hohe Dosis blieb wirkungslos. Bei den weiblichen Mäusen erfolgte der Anstieg der Häufigkeit der Hepatome sowohl bei der hohen als auch bei der niedrigen Dosierung, doch auch hier nicht dosisabhängig. Daten zum Zeitpunkt des Auftretens der Tumoren fehlen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass o-Chlornitrobenzol nicht als sehr aktives Kanzerogen angesehen werden kann, da hohe Dosen und eine lange Latenzzeit benötigt werden, um Tumoren zu erzeugen (Weisburger et al., 1978). Die vorliegende Untersuchung hält den heutigen Anforderungen an eine solche Studie nicht stand, da zu kleine Tierzahlen eingesetzt wurden und die Dokumentation der Ergebnisse unzureichend ist. Das Ergebnis einer mit den geringen Tierzahlen nicht ausreichend sicheren Erhöhung der Tumorzinzidenz nach Gabe sehr hoher Dosen von o-Chlornitrobenzol, die während der Untersuchung gesenkt werden mussten, kann nur den Hinweis auf eine mögliche kanzerogene Wirkung des Stoffes geben.

Zur Untersuchung einer möglichen leberkanzerogenen Wirkung von o-Chlornitrobenzol wurde eine 4-Wochen-Studie an Mäusen mit histochemischer Darstellung präneoplastischer Leberfoci an Leberschnitten durchgeführt (siehe auch Kapitel 7.2). Gruppen von je 12 männlichen und 12 weiblichen Mäu-

sen (keine Angabe des Stammes) wurden mit Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 50, 500 und 5000 ppm o-Chlornitrobenzol im Futter (entsprechend 5, 50 und 500 mg/kg Körpergewicht bei der Annahme einer Futteraufnahme von 1/10 des Körpergewichtes) über eine Woche täglich behandelt. Je 6 Tiere jeder Gruppe wurden dann getötet und die verbliebenen 6 Tiere weitere 3 Wochen mit den gleichen Konzentrationen behandelt und dann auch getötet. Allen Tieren wurde der linke Leberlappen entnommen und 0,5 cm dicke Schnitte davon bei - 140 °C schockgefroren. Nach Auftauen des Materials wurden folgende Parameter histochemisch bestimmt: gespeichertes Glykogen, Glukose-6-phosphatase als Maß für die Glukoneogenese, Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase als Maß für die Glykolyse und Glukose-3-phosphatdehydrogenase als Maß für den Pentosephosphat-Weg. Eine Steigerung der Glykolyse und des Pentosephosphat-Weges mit einer Abnahme der Glukoneogenese und des in den Lebergeweben gespeicherten Glykogens ist ein integraler Bestandteil der Transformation von Hepatozyten und damit ein Anzeichen für einen hepatotoxischen Effekt des zu prüfenden Stoffes. o-Chlornitrobenzol führte unter den Untersuchungsbedingungen nicht zur Ausbildung der sonst typischen Foci (Anhäufung von Zellen mit den genannten Stoffwechseländerungen) im untersuchten Lebergewebe. In Hepatozyten fanden sich jedoch eindeutig dosisabhängige Veränderungen des Kohlenhydratmetabolismus, von denen die Autoren nicht ausschließen wollten, dass diese durch o-Chlornitrobenzol induzierte Foci überdeckten. Eine Zusammenstellung der Befunde ist in Tabelle 7 enthalten.

Tabelle 7. Enzymhistochemisch darstellbare Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels der Mäuseleber nach Gabe von o-Chlornitrobenzol				
Dosis/Geschlecht	Glykolyse*	Pentosephosphat-Weg*	Glukoneogenese*	Glykogengehalt*
0, männlich	-	-	-	1 (+)
0, weiblich	1 (+)	-	1 -, 2 (-)	1 -, 1 (-)
50 ppm, männlich	-	-	-	-
50 ppm, weiblich	-	-	2 (-)	1 -, 3 (-)
500 ppm, männlich	1 (+)	1 +	1 --, 6 -, 2 (-)	3 -, 2 (-)
500 ppm, weiblich	2 (+)	-	7 --, 4 -, 1 (-)	5 --, 3 -, 4 (-)
5000 ppm, männlich	5 ++, 7 +	2 ++, 9 +, 1 (+)	12 --	9 --, 2 -, 1 (+)
5000 ppm, weiblich	2 ++, 8 +	3 ++, 4 +, 3 (+)	11 --	8 --, 3 -
* Anzahl der Tiere mit				
starker Erhöhung	++	starker Erniedrigung	--	
Erhöhung	+	Erniedrigung	-	
grenzwertiger Erhöhung	(+)	grenzwertiger Erniedrigung	(-)	

Die Effekte traten im Allgemeinen bereits nach einer Woche Behandlung auf und waren nach 4 Wochen nicht verstärkt, sodass die Tabelle 7 die zusammengefassten Werte bei den Tötungszeiten enthält. Lediglich die Abnahme des Glykogengehaltes wurde durch die längere Behandlung etwas verstärkt. Die Autoren interpretierten ihre Befunde in dem Sinn, dass unter o-Chlornitrobenzol in Parenchymzellen der Leber eine Stoffwechsellage induziert wurde, die die Entstehung von Tumoren begünstigen könnte. Sie sahen darin den Hinweis auf eine mögliche Promotionswirkung der Testsubstanz (Bayer, 1991, 1993).

7.8 Reproduktionstoxizität

Zur Reproduktionstoxizität von o-Chlornitrobenzol wurde eine Teratogenitäts-/Embryotoxizitätsstudie an weiblichen Ratten (Sprague-Dawley Cr1:CD) durchgeführt. Gruppen von je 25 trächtigen Tieren (12 Wochen alt, 198 bis 298 g schwer) wurden vom 6. bis 15. Tag der Trächtigkeit täglich oral mit der Schlundsonde mit Dosierungen von 0 (Kontrollen), 25, 75 und 150 mg o-Chlornitrobenzol (Handelsware)/kg Körpergewicht in Maiskeimöl behandelt. Als Kontrolle wurde reines Maiskeimöl verabreicht. In der höchsten Dosierung starben alle Tiere der Gruppe innerhalb weniger Tage, sodass eine Auswertung nicht möglich war. Es wurden deshalb in einem zweiten Ansatz 100 mg/kg Körpergewicht in der vorstehend beschriebenen Weise verabreicht und eine zweite Kontrollgruppe mitgeführt. Die Ergebnisse der Dosisgruppen 25, 75 und 100 mg/kg Körpergewicht und der Kontrollgruppe wurden gemeinsam dargestellt. Körpergewicht und Futterverbrauch aller Tiere wurden während der Behandlung und bis zum 21. Tag der Trächtigkeit bestimmt. An diesem Tag wurden alle Tiere getötet und seziiert, die Zahl der Implantationen ermittelt und die Feten aus dem Uterus entnommen. Alle Feten wurden gewogen, ihr Geschlecht bestimmt und eine äußerliche Untersuchung durchgeführt. Die Hälfte jedes Wurfes wurde in Bouin's Fixativ eingelegt, Serienschnitte hergestellt und eine Untersuchung der inneren Organe durchgeführt. Die andere Hälfte wurde nach Eviszeration in Alkohol fixiert und das Skelettsystem nach Anfärbung mit Alizerinrot S untersucht. Bei der Dosierung von 25 und 75 mg/kg Körpergewicht wurden keine maternaltoxischen Effekte beobachtet. Lediglich bei einer Dosis von 75 mg/kg Körpergewicht war die Entwicklung des Körpergewichtes und die Futteraufnahme vom Tag 6 bis 10 der Trächtigkeit gegen-

über der Kontrolle vermindert, normalisierte sich aber im Lauf der weiteren Untersuchung. Je ein Tier starb in der Gruppe mit 75 und mit 100 mg/kg Körpergewicht, jedoch konnte keine toxische Wirkung des o-Chlornitrobenzols nachgewiesen werden. Bei einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht kam es zu einem Körpergewichtsverlust vom 6. bis 10. Tag und reduzierter Futteraufnahme vom 6. bis 16. Tag der Trächtigkeit. In keiner der mit o-Chlornitrobenzol behandelten Tiergruppen gab es eine Abweichung der Rate der Fruchtbarkeit, der mittleren Zahl der lebenden und toten Feten, der gesamten Implantationen, der späten Resorptionen und der Corpora lutea oder der Präimplantationsverluste zu den Werten der Kontrollgruppen. Eine Steigerung der Frühresorptionen, die bei der mit 75 mg/kg Körpergewicht behandelten Gruppe beobachtet wurde, bestätigte sich nicht bei der mit 100 mg/kg Körpergewicht behandelten Gruppe und wurde beim Vergleich mit historischen Kontrollen als nicht relevant angesehen. Keine biologisch relevanten Unterschiede zur Kontrolle wurden in der Zahl der Jungtiere festgestellt, die eine Missbildung an Organen oder dem Skelett aufwiesen. Einzelne Abweichungen bei Dosierungen von 25 und 75 mg/kg Körpergewicht wurden bei 100 mg/kg Körpergewicht nicht beobachtet. Die Autoren schlossen daraus, dass die Behandlung von trächtigen Ratten bis zu einer täglichen maternaltoxischen Dosis von 100 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht weder zu einer teratogenen Wirkung führte noch embryo- oder fetotoxische Effekte hatte (Monsanto, 1986).

In einer nur als Abstract vorliegenden Arbeit wurde an männlichen Ratten (Fischer 344) die Hodentoxizität von o-Chlornitrobenzol nach einmaliger oraler Gabe von 150 mg/kg Körpergewicht untersucht. Die Tiere wurden 1 oder 25 Tage nach Applikation getötet und das Hodengewicht, die tägliche Spermienproduktion und histopathologische Veränderungen im Hoden bestimmt. o-Chlornitrobenzol hatte unter den angegebenen Bedingungen keinerlei Einfluss auf den Hoden der Ratten (keine weiteren Angaben; Mohr und Working, 1988).

In einer subchronischen Toxizitätsstudie, in der Ratten und Mäuse über 13 Wochen der Ganzkörperinhalation von o-Chlornitrobenzol-Dämpfen ausgesetzt wurden, erfolgte am Versuchsende auch eine Untersuchung der Spermien und der Vaginalzytologie zur Bestimmung des Östruszyklus (siehe auch Kapitel 7.5). Behandelt wurden Gruppen von je 10 Tieren mit Konzentrationen von 0 (Kontrollen), 4,5, 9 bzw. 18 ppm o-Chlornitrobenzol (entsprechend 0, 28,8, 57,6 bzw. 115,2 mg/m³) täglich über 6 Stunden und

an 5 Tagen/Woche. In der Gruppe der mit 18 ppm behandelten Ratten, einer Konzentration, die stark systemisch toxisch war (ausgeprägte Methämoglobinämie und Anämie), wurde bei den Männchen eine verminderte Spermatogenese mit vermindertem Hodengewicht nachgewiesen. Das Gewicht der Cauda epididymidis und des gesamten Nebenhodens, die Spermaticköpfe/Hoden und die Anzahl der Spermaticiden war gegenüber der Kontrolle deutlich gesenkt. Die Spermienbeweglichkeit war nicht beeinflusst. Bei den Weibchen wurden keine funktionellen oder morphologischen Veränderungen der befundeten Reproduktionsparameter gegenüber der Kontrolle festgestellt. Die männlichen Mäuse, die mit 18 ppm o-Chlornitrobenzol behandelt worden waren, zeigten lediglich eine deutliche Verringerung der Spermienbeweglichkeit. Auch hier wurde bei den Weibchen keine Veränderung gegenüber der Kontrolle gefunden (NTP, 1993).

Hodengewichte und histopathologische Veränderungen des Hodengewebes wurden auch an B6C3F1-Mäusen untersucht, die 4 Wochen lang mit o-Chlornitrobenzol täglich mit dem Futter behandelt worden waren (siehe auch Kapitel 7.2). Nur in der höchsten deutlich systemisch toxischen Dosis von 5000 ppm (entsprechend tatsächlich aufgenommener Menge: 1120 mg/kg Körpergewicht) wurde eine leichte Erniedrigung der Hodengewichte beobachtet. In keinem Fall konnten histopathologische Befunde an den Hoden erhoben werden (Bayer, 1993).

Eine umfassende Studie zur Reproduktionstoxizität von o-Chlornitrobenzol über 2 Generationen wurde an Mäusen (Stamm VAF Cr1:CD-1(ICR)BR) durchgeführt, die den Stoff täglich mit der Schlundsonde verabreicht erhielten („Reproduction Assessment by Continuous Breeding“). Die Untersuchung in der ersten Generation wurde mit 40 Paaren (je ein Männchen und ein Weibchen) als Kontrollgruppe und 3 Gruppen von je 20 Paaren, die mit 40, 80 und 160 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht behandelt wurden, durchgeführt. Das über 99 % reine o-Chlornitrobenzol war in Maiskeimöl gelöst. Die Kontrolltiere erhielten nur Maiskeimöl. Etwa 11 Wochen alte Tiere wurden zunächst zu zweit für eine Woche gleichgeschlechtlich in Käfigen gehalten und mit den oben angegebenen Dosierungen behandelt. Anschließend wurden die Tiere verpaart, als Paare einzeln gehalten und 98 Tage weiter mit o-Chlornitrobenzol behandelt. Am Ende dieser Behandlung wurden 23 Tiere der Kontrollgruppe mit 21 Tieren der mit 160 mg/kg Körpergewicht behandelten Gruppe zur Entnahme von Blut und zur Bestimmung der Milzgewichte herangezogen. Der letzte Wurf der verpaarten

Tiere der Kontrollgruppe und der 160 mg/kg Körpergewicht-Gruppe wurde am Ende der Behandlungszeit von ihren Muttertieren aufgezogen, nach dem Absetzen gleichgeschlechtlich zu zweit in Käfigen gehalten und wie die Elterntiere mit o-Chlornitrobenzol (160 mg/kg Körpergewicht) bzw. Maiskeimöl (Kontrollen) behandelt. Nach Erreichung der Geschlechtsreife wurden je Gruppe 20 weibliche und 20 männliche Tiere verpaart, einzeln gehalten und über 7 Tage weiter behandelt. Nach der Geburt der ersten Nachkommen wurden die Tiere getötet. Untersucht wurden insgesamt folgende Parameter: klinische Symptome, Körpergewicht und Wasserverbrauch sowie Milzgewicht und Methämoglobingehalt im Blut nur in der Kontrollgruppe und der höchsten Dosisgruppe bei den Elterntieren der ersten Generation (F₀), Fruchtbarkeit in dieser Generation (Zahl der Paare mit Nachkommen, Zahl der Würfe/Paar, Zahl der lebenden Nachkommen/Wurf), Geschlechtsverteilung und Gewicht der Jungtiere direkt nach der Geburt. In der zweiten Generation (F₁) wurden die gleichen Parameter untersucht wie in der ersten Generation, allerdings ohne Zahl der Würfe/Paar, da nur ein Wurf stattfand, aber auch mit Bestimmung der Milzgewichte und des Methämoglobingehaltes des Blutes. Zusätzlich wurde bei allen männlichen F₁-Tieren eine ausführliche Untersuchung der Hoden und Nebenhoden und bei den weiblichen F₁-Tieren der Vaginalzytologie zur Bestimmung des Östruszyklus durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Anfang Tabelle 8

Tabelle 8. Reproduktionstoxikologische Studie an Mäusen mit o-Chlornitrobenzol (NTP, 1992)			
erste Generation (F ₀)	Dosis (mg/kg Körpergewicht)		
	40	80	160
Körpergewichte	unbeeinflusst	unbeeinflusst	leicht erhöht
klinische Zeichen	keine	keine	leichte Inaktivität, Zyanose bei einzelnen weiblichen Tieren
Mortalität (Kontrolle 4/40)	2/20	2/20	3/20
Wasserverbrauch	unbeeinflusst	unbeeinflusst	unbeeinflusst
Zahl der Paare mit Nachkommen	alle	alle	alle
Zahl der Würfe/Paar (Kontrolle 4,9)	Mittelwert 4,9 in allen Dosisgruppen		
Zahl der lebenden Nachkommen/Wurf (Kontrolle 11,2)	12,1	11,9	12,9
Geschlechtsverteilung und Gewicht der Jungtiere direkt nach der Geburt	unbeeinflusst	unbeeinflusst	unbeeinflusst
Milzgewichte	nicht bestimmt	nicht bestimmt	erhöht auf das 1,5- bis 2fache
Methämoglobingehalt im Blut	nicht bestimmt	nicht bestimmt	erhöht auf das 4- bis 6fache

Tabelle 8. Reproduktionstoxikologische Studie an Mäusen mit o-Chlornitrobenzol (NTP, 1992)	
zweite Generation (F ₁), Nachkommen von Kontrollen und mit 160 mg/kg Körpergewicht behandelten Tieren	
Körpergewichte	leicht erhöht in der mit o-Chlornitrobenzol behandelten Gruppe
klinische Zeichen	keine
Mortalität	keine
Wasserverbrauch	kein Unterschied zwischen Kontrollen und der mit o-Chlornitrobenzol behandelten Gruppe
Zahl der Paare mit Nachkommen	Kontrolle 19/20, behandelte Gruppe 19/20
Zahl der lebenden Nachkommen/Wurf	kein Unterschied zwischen Kontrolle und behandelter Gruppe (11,6/11,4)
Geschlechtsverteilung und Gewicht der Jungtiere direkt nach der Geburt	kein Unterschied zwischen Kontrollen und behandelter Gruppe
Milzgewichte	auf das 1,4- bis 1,6fache erhöht gegenüber der Kontrolle
Methämoglobingehalt	auf das 3fache erhöht gegenüber der Kontrolle
Östruszyklus	keine Beeinflussung durch die Behandlung mit o-Chlornitrobenzol
Zahl der Spermien, Prozentzahl abnormer Spermien und Spermienbeweglichkeit im Nebenhoden sowie Hoden und Nebenhodengewichte	keine Beeinflussung durch die Behandlung mit o-Chlornitrobenzol

Ende Tabelle 8

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit o-Chlornitrobenzol weder in der ersten noch in der zweiten Generation auf die Reproduktionsfähigkeit der Mäuse einen Einfluss ausgeübt hatte. Die zur Behandlung der ersten Generation eingesetzten Dosierungen von 40 und 80 mg/kg Körpergewicht ergaben keinerlei Hinweis auf eine toxische Wirkung des o-Chlornitrobenzols, während 160 mg/kg Körpergewicht zu einer deutlichen Erhöhung der Milzgewichte und des Methämoglobingehaltes im Blut sowie bei einzelnen Tieren zu toxischen Zeichen führte. Auch in der zweiten Generation wirkte die Behandlung mit o-Chlornitrobenzol in der gleichen Weise auf die Milz und den Methämoglobingehalt ein. Die Autoren kamen damit zu dem Schluss, dass o-Chlornitrobenzol auch in Gegenwart von systemisch-toxischen Symptomen bei Mäusen keine reproduktionstoxische Wirkung zeigte (NTP, 1992).

7.9 Wirkungen auf das Immunsystem

Keine Information vorhanden.

7.10 Neurotoxizität

Keine Information vorhanden.

7.11 Sonstige Wirkungen

Der Einfluss von o-Chlornitrobenzol auf die Lipidperoxidation, die Stärke der antioxidativen Wirkung und den Gehalt an Vitamin E im Gewebe von Leber und Milz wurde an Ratten untersucht. Männliche weiße Ratten (200 bis 300 g schwer) wurden täglich mit der Schlundsonde mit einer Dosis von 51 mg o-Chlornitrobenzol/kg Körpergewicht in Sonnenblumenöl behandelt. Die Behandlungszeit betrug in einer Gruppe 5 Tage, in einer weiteren Gruppe 30 Tage. Danach wurden die Tiere getötet, Leber und Milz entnommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurde ein 20-prozentiges Homogenat in Phosphatpuffer hergestellt. In diesem wurde der Gehalt an primären Lipidperoxidationsprodukten (Dien-, Trien-, Oxodien- und Tetraenkonjugate) und Malondialdehyd als sekundäres Lipidperoxidationsprodukt bestimmt. Die Stärke der antioxidativen Wirkung wurde unter Verwendung des Modells der Ölsäurethermoautoxidation gemessen und der Vitamin E-Gehalt nach alkalischer Hydrolyse des Homogenats bestimmt. Die Behandlung mit o-Chlornitrobenzol bewirkte nach 30 Tagen in der Leber ein Absinken des Gehaltes an Dien-, Trien- und Oxodienkonjugaten und Malondialdehyd. Nach 5-tägiger Behandlung waren diese Effekte noch nicht zu beobachten. In der Milz wurden weder nach 5 noch nach 30 Tagen Behandlung Änderungen im Gehalt der primären und sekundären Lipidperoxidationsprodukte beobachtet. Der Vitamin E-Gehalt wurde durch die o-Chlornitrobenzol-Behandlung in der Leber gegenüber der Kontrolle nicht verändert, in der Milz jedoch nach 5 Tagen Behandlung deutlich gesenkt. Nach 30-tägiger Behandlung war der Vitamin E-Gehalt in der Milz erhöht. Die Gesamtaktivität der Antioxidation wurde in der Leber nach 5-tägiger Behandlung auf das 1,7fache gegenüber der Kontrolle gesteigert, bewegte sich nach 30-tägiger Behandlung wieder im Kontrollbereich. In der Milz war dieser Parameter nicht beeinflusst. Die Autoren kamen zu dem - sehr spekulativen - Schluss, dass o-Chlornitrobenzol die Lipidoxidation beeinflusst und vermuteten, dass dieses System an der Detoxifikation des o-Chlornitrobenzols besonders in der Leber beteiligt sei (Paranich et al., 1993).

In einer in vitro-Studie wurde der Effekt von o-Chlornitrobenzol auf die Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase und der Ferrochelatase aus Rattenlebern untersucht. Eingesetzt wurde 5-prozentiges Rattenleberhomogenat in Puffer, das zum Aufschluss der Mitochondrienmembranen mit Ultraschall behandelt wurde. o-Chlornitrobenzol, in einer 10^{-3} M Konzentration

(entsprechend 0,16 mg/ml), hatte keine Wirkung auf die Aktivität der δ -Aminolävulinsäure-Synthetase und steigerte die Aktivität der Ferrochelatase leicht, was jedoch nicht statistisch gesichert werden konnte (Johnson et al., 1985).

8 Erfahrungen beim Menschen

Obwohl die Gefährlichkeit von o-Chlornitrobenzol für den Menschen seit langem bekannt ist, fehlen Angaben zur Wirkung des reinen Stoffes in der Literatur fast vollständig. Bei den Berichten über Vergiftungen handelt es sich ausschließlich um Mischexpositionen, häufig mit p-Chlornitrobenzol und/oder Nitrobenzol.

Als wesentliche Befunde einer Vergiftung durch Chlornitrobenzole am Menschen wurden Methämoglobinbildung, Sensibilisierung der Haut, leichte Hautreizung, Nieren- und Leberschäden, leichte Depression des Zentralnervensystems und Hyperthermie genannt. Zwischen den einzelnen Isomeren wurde nicht unterschieden (Dreisbach, 1969).

Linch (1974) versuchte eine Einordnung in ein Klassifizierungssystem, das von einer 10-jährigen Erfahrung und 187 Zyanosefällen ausging und die Wirksamkeit von „1: am meisten wirksam“ bis „13: am wenigsten wirksam“ einteilte. o-Chlornitrobenzol erhielt die Wirkungszahl 7, allerdings nicht unterschieden von p-Chlornitrobenzol und einem Gemisch von Chlornitrobenzolen. Bei der Exposition wurde immer die parallele Aufnahme über die Haut und die Inhalation angenommen (Linch, 1974).

Die Geruchsschwelle von o-Chlornitrobenzol in Wasser wurde mit 0,02 mg/l angegeben. Es wurde jedoch nicht zwischen den Chlornitrobenzolisomeren unterschieden (Davydova, 1967).

Vergiftungen im Arbeitsbereich, an denen o-Chlornitrobenzol maßgeblich beteiligt war, wurden mehrfach berichtet. Schon 1902 wurde eine tödliche Vergiftung mit „Nitrochlorbenzol“ beschrieben sowie schwere Vergiftungen von 4 Arbeitern eines Chlorbenzol-Betriebes, die gegen Nitrochlorbenzol exponiert waren und nach Alkoholgenuss bewusstlos wurden und erst 8 bis 10 Stunden später wieder zu sich kamen. Sie zeigten typische Symptome einer Zyanose (Leymann, 1904).

Bei der Isolierung von o- und p-Chlornitrobenzol kam es zu einer starken Exposition der Arbeiter gegenüber den Dämpfen aus dem erhitzten Gemisch. 2 von 3 Beschäftigten zeigten nach 3 bzw. 3,5 Tagen schwere Vergiftungssymptome mit Kollaps, Erbrechen, Kopfschmerzen und starker Zyanose. Nach Verringerung der Exposition durch Änderung des Arbeitszyklus traten trotzdem noch zwei weitere Vergiftungsfälle mit gleichen Symptomen auf (Renshaw und Ashcroft, 1926).

Eine weitere Vergiftung mit einem Gemisch aus o- und p-Chlornitrobenzol, gegenüber dessen Dämpfen ein Arbeiter in einem heißen Raum über längere Zeit ausgesetzt war, führte nach einer Latenzzeit von einer Stunde zu Ohnmachtsanfällen, heftigen Kopfschmerzen, Erbrechen und Krämpfen. Nach Einlieferung in die Klinik in bewusstlosem Zustand wurde eine Zyanose und Methämoglobinämie diagnostiziert. Am zweiten Kliniktag war bis auf eine leichte Nierenfunktionsstörung eine vollständige Erholung erreicht (Schwanke, 1930).

Zwei Fälle von schwerer Vergiftung mit „Nitrochlorbenzol“ mit Bewusstlosigkeit und starker Zyanose wurden zur Feststellung von Spätschäden über mehrere Monate nachbeobachtet. In einem Fall traten nach 2 Monaten noch Kopfschmerzen und Schwächegefühl auf und eine leichte sekundäre Anämie war nachweisbar. Nach 3 Monaten war eine vollständige Erholung eingetreten. Im zweiten Fall wurden noch nach 9 Monaten Kopfschmerzen, Magenbeschwerden und eine Lymphozytose beobachtet. Es bestand hier allerdings der Verdacht auf Alkoholabusus (Bonzanigo, 1931).

Die Exposition gegenüber einem Gemisch aus o- und p-Chlornitrobenzol führte zu einer schweren Vergiftung, als bei einer Störung in einer Anlage zur Isolierung der Isomeren und der folgenden Reparatur ein Arbeiter reichliche Mengen der Dämpfe einatmete. Es kam zu Kollaps, Symptomen von Zyanose und Absinken des Hämoglobingehaltes auf 65 % der Norm. Der Patient erholte sich nur langsam, klagte über Atemnot und Schwindel und hatte nach 7 Wochen erst 80 % des normalen Hämoglobingehaltes erreicht (Gerbis, 1932).

In einer Übersichtsarbeit, in der 325 in den Jahren 1961 bis 1980 in Großbritannien registrierten Vergiftungsfälle mit Chemikalien, die zu einer Zyanose führten, aufgelistet sind, wurden „Nitrochlorbenzole“ als verantwortliche Agenzien aufgeführt. Mit diesen Stoffen (nicht nach Isomeren aufge-

gliedert) wurden 50 Fälle von Vergiftungen im Berichtszeitraum registriert, von denen 23 „frühe“ Fälle, d. h. die Symptome traten während der Arbeit am gleichen Tag auf, und 27 „verzögerte“ Fälle waren, die erst einige Zeit später in Erscheinung traten. Die Aufnahme erfolgte entweder über die Haut, durch Inhalation oder gemischt über die Haut und durch Inhalation (Sekimpi und Jones, 1986).

Trotz einer jahrzehntelangen Verwendung sind keine Hinweise auf eine allergisierende Wirkung von o-Chlornitrobenzol beim Menschen bekannt geworden (BUA, 1985; Bayer, 1999).

9 Einstufungen und Grenzwerte

Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MAK-Kommission) hat o-Chlornitrobenzol in die Kategorie 3 der Krebs erzeugenden Arbeitsstoffe „Stoffe, die wegen erwiesener oder möglicher Krebs erzeugender Wirkung Anlass zur Besorgnis geben, aber aufgrund unzureichender Informationen nicht endgültig beurteilt werden können“ der MAK- und BAT-Werte-Liste eingestuft und wegen der Gefahr der Hautresorption mit „H“ markiert (DFG, 2000; Greim, 2000).

o-Chlornitrobenzol wurde außerdem in die Kanzerogenitätskategorie K3 „Stoffe, die wegen möglicher Krebs erregender Wirkung beim Menschen Anlass zur Besorgnis geben, über die jedoch nicht genügend Informationen für eine befriedigende Beurteilung vorliegen“ sowie in die Kategorie R_F3 der fortpflanzungsgefährdenden Stoffe „Stoffe, die wegen möglicher Beeinträchtigung der Fortpflanzungsfähigkeit (Fruchtbarkeit) des Menschen zur Besorgnis Anlass geben“ gemäß den EU-Einstufungskriterien in der TRGS 905 legal eingestuft (TRGS 905, 2000).

10 Arbeitsmedizinische Empfehlungen

Arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen nach dem Berufsgenossenschaftlichen Grundsatz G 33 (aromatische Nitro- oder Aminoverbindungen). Auf die Einstufung des Stoffes in die Kategorie K3 und R_F3 nach TRGS 905 und die Gefahr der Hautresorption wird ausdrücklich hingewiesen.

Literatur

Arthur D. Little, Inc., Cambridge, USA
Effect of dose on the disposition and metabolism of 2-chloronitrobenzene in rats after oral administration
unveröffentlichter Bericht, Progress Report No. 6 (1989 a)
im Auftrag des National Institute of Environmental Health Sciences

Arthur D. Little, Inc., Cambridge, USA
Effect of repeated dosing on the disposition and metabolism of 2-chloronitrobenzene in rats after oral administration
unveröffentlichter Bericht, Progress Report No. 8 (1989 b)
im Auftrag des National Institute of Environmental Health Sciences

Arthur D. Little, Inc., Cambridge, USA
Effect of repeated dosing on the disposition and metabolism of 2-chloronitrobenzene in geriatric male rats
unveröffentlichter Bericht, Progress Report No. 11 (1990)
im Auftrag des National Institute of Environmental Health Sciences

Back, K.C., Thomas, A.A., MacEwen, J.D.
Reclassification of materials listed as transportation health hazards
Aerospace Medical Research Laboratory, Wright-Patterson Air Force Base, Ohio, USA,
Report No. TSA-20-72-3 (1972)
NTIS PB 214 270
im Auftrag des US Department of Transportation

Bayer AG, Institut für Toxikologie
2-Chlor-1-nitrobenzol - Untersuchungen zur akuten Toxizität
unveröffentlichter Bericht Nr. 5800 (1976)

Bayer AG, Institut für Toxikologie
o-Nitrochlorbenzol - Untersuchungen zur akuten oralen Toxizität an weiblichen Wistar-Ratten
unveröffentlichter Bericht (1982 a)

Bayer AG, Institut für Toxikologie
o-Nitrochlorbenzol - Untersuchungen zur akuten oralen Toxizität an männlichen Wistar-Ratten
unveröffentlichter Bericht (1982 b)

Bayer AG, Institut für Toxikologie
o-Nitrochlorbenzol - Salmonella/Mikrosomen-Test zur Untersuchung auf punktmutagene Wirkung
unveröffentlichter Bericht Nr. 12848 (1984)

Bayer AG, PH-FE Toxikologie Industriechemikalien
Enzymhistochemisch darstellbare Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels der Mausleber nach Gabe von o-Chlornitrobenzol
unveröffentlichter Bericht Nr. 20209 (F) (1991)

Bayer AG, Fachbereich Toxikologie
o-Chlornitrobenzol - Subakute Toxizitätsstudie an B6C3F1-Mäusen - Schwerpunkt Leberdiagnostik - (Verabreichung im Futter bis zu 5 Wochen)
unveröffentlichter Bericht Nr. 22240 (1993)
im Auftrag der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie

Bayer AG, Organische Chemikalien
Sicherheitsdatenblatt o-Nitrochlorbenzol rein kristallin (1998)

Bayer AG
schriftliche Mitteilung an die Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie vom 15.11.1999

Bonzanigo, A.
Über Spätfolgen nach gewerblichen Vergiftungen mit Anilin und ähnlichen Substanzen
Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med., 16, 242 - 255 (1931)

Booth, G.
Nitro compounds, aromatic
in: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry
5th ed., vol. A17, p. 426 - 429
Verlag Chemie, Weinheim (1991)

Bray, H.G., James, S.P., Thorpe, W.V.
The metabolism of the monochloronitrobenzenes in the rabbit
Biochem. J., 64, 38 - 44 (1956)

BUA (Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe)
o-Chlornitrobenzol - BUA-Stoffbericht 2
Verlag Chemie, Weinheim (1985)

Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E. (eds.)
The Merck index
11th ed., p. 332
Merck & Co., Rahway, New Jersey (1989)

Cesarone, C.F., Bolognesi, C., Santi, L.
Evaluation of damage to DNA after in vivo exposure to different classes of chemicals
Arch. Toxicol., Suppl. 5, 355 - 359 (1982)

D'Addario, A.P., Jagannath, D.R.
Structure and resonance effects on the observed mutagenic response of mononitro halobenzenes
Environ. Mutagen., 3, 325 (1981)

Davydova, S.G.
A comparison of the properties of nitrochlorobenzene isomers for the determination of their permissible concentrations in water bodies
Hyg. Sanit., 32 (8), 161 - 166 (1967)

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe)
MAK- und BAT-Werte-Liste 2000
Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2000)

- Dreisbach, R.H. (ed.)
Handbook of poisoning: diagnosis treatment
6th ed., p. 114 - 116
Lange Medical Publications, Los Altos, California (1969)
- Falbe, J., Regitz, M. (Hrsg.)
Römpp Chemie Lexikon
10. Aufl. Bd. 1, S. 723 - 724
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996)
- Gerbis, H.
Nitrochlorbenzol-Vergiftung, gewerbliche. Reparative Hyperglobulie
in: Fühner, H. (Hrsg.)
Sammlung von Vergiftungsfällen, Bd. 3, S. 125 - 126
Verlag von F.C.W. Vogel, Berlin (1932)
- Gilbert, P., Saint-Ruf, G., Poncelet, F., Mercier, M.
Genetic effects of chlorinated anilines and azobenzenes on *Salmonella typhimurium*
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 9, 533 - 541 (1980)
- Graham, R.C., Snyder, S.W., Montgomery, R.R.
Toxicity summary o-chloronitrobenzene
unpublished summary by Du Pont provided by Dastur (1983)
zitiert in: CHIP (Chemical Hazard Information Profile, Draft Report)
2-Chloronitrobenzene
Office of Toxic Substances, EPA, USA (1983)
- Greim, H. (Hrsg.)
Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen
von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen)
Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (2000)
- Harton, E.E., jr., Rawl, R.R.
Toxicological and skin corrosion testing of selected hazardous materials
NTIS PB-264 975 (1976)
im Auftrag des Department of Transportation, Washington DC, USA
Haskell Laboratory for Toxicology and Industrial Medicine, E. I. Du Pont de Nemours
and Co., Inc.
Inhalation median lethal concentration (LC50) of o-chloronitrobenzene
Bericht, Report No. 82-82, MR No. 3793-001 (1982)
NTIS/OTS 0540655
- Haskell Laboratory for Toxicology and Industrial Medicine, E. I. Du Pont de Nemours
and Co., Inc.
Subchronic inhalation toxicity study of o-chloronitrobenzene (OCNB) in rats
Bericht, Report No. 373-84, MR No. 3793-001 (1984)
NTIS/OTS 0546562
- Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., Zeiger, E.
Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals
Environ. Mutagen., Suppl. 1, 3 - 142 (1983)

- Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Akute orale Toxizität von o-Nitrochlorbenzol an männlichen SPF-Wistar-Ratten
unveröffentlichter Bericht Nr. 491/75 (1975 a)
- Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Akute dermale Toxizität von o-Nitrochlorbenzol an weiblichen SPF-Wistar-Ratten
unveröffentlichter Bericht Nr. 492/75 (1975 b)
- Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Wirkung von o-Nitrochlorbenzol auf das Blutbild weiblicher Katzen
unveröffentlichter Bericht Nr. 494/75 (1975 c)
- Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
Haut- und Schleimhautverträglichkeit von o-Nitrochlorbenzol an Kaninchen
unveröffentlichter Bericht Nr. 493/75 (1975 d)
- Hoechst AG, Pharma Forschung Toxikologie
o-Chlornitrobenzol - Study of the mutagenic potential in strains of *Salmonella typhimurium* (Ames test) and *Escherichia coli*
unveröffentlichter Bericht Nr. 84.0410 (1984)
- Hoechst AG
EG-Sicherheitsdatenblatt o-Nitrochlorbenzol TTR (1997)
- Hude, von der, W., Behm, C., Gürtler, R., Basler, A.
Evaluation of the SOS chromotest
Mutat. Res., 203, 81 - 94 (1988)
- Huntingdon Research Centre Ltd., Huntingdon, Großbritannien
Analysis of metaphase chromosomes obtained from CHO cells cultured in vitro and treated with o-Chlornitrobenzol
unveröffentlichter Bericht BGH 7/88867 (1988)
im Auftrag der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie
- Izmerov, N.F., Sanotsky, I.V., Sidorov, K.K.
Toxicometric parameters of industrial toxic chemicals under single exposure, p. 92
(englische Übersetzung aus dem Russischen)
Centre of International Projects, GKNT, Moscow (1982)
- JETOC (Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & Information Center, Japan)
Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation system of the industrial safety and health law
JETOC (1996)
- JETOC (Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & Information Center, Japan)
Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation system of the industrial safety and health law, supplement
JETOC (1997)
- Johnson, D.J., Williams, H.L., Slater, S., Haut, M.J., Altstatt, L.B.
The in vitro effects of selected environmental toxicants on two heme synthesis enzymes
JEPTO, 6 (2), 211 - 218 (1985)

- Kawai, A., Goto, S., Matsumoto, Y., Matsushita, H.
Mutagenicity of aliphatic and aromatic nitro compounds
Jpn. J. Ind. Health, 29, 34 - 54 (1987)
- Koch, R., Strobel, K., Nagel, M.
Mutagene Aktivität von Umweltschadstoffen: ein Struktur-Wirkungs-Analogie-Modell
Z. Gesamte Hyg., 31, 524 - 526 (1985)
- Leymann
Unfälle bei der Herstellung von Nitrophenolen und Nitrochlorverbindungen
in: Pfeiffer, A. (Hrsg.)
Zwanzigster Jahresbericht über die Fortschritte und Leistungen auf dem Gebiet der Hygiene, S. 371 - 372
Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn, Braunschweig (1904)
- Lide, D.R., Frederikse, H.P.R. (eds.)
CRC Handbook of chemistry and physics
77th ed., p. 3-35
CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo (1996)
- Linch, A.L.
Biological monitoring for industrial exposure to cyanogenic aromatic nitro and amino compounds
Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 35, 426 - 432 (1974)
- Mohr, K.L., Working, P.K.
Testicular toxicity of the chloronitrobenzenes
Toxicologist, 8 (1), 15, Abstract No. 58 (1988)
- Monsanto Company, Environmental Health Laboratory
Orthonitrochlorobenzene - a teratology study in rats
Bericht, Study No. 820124, DMEH Project No. ML-82-090 (1986)
NTIS/OTS 0524332
- Monsanto Company
Monsanto Material safety data ortho-nitrochlorobenzene (1990)
NTIS/OTS 0524332-1
- Monsanto Report BD-83-0208 (ohne Jahreszahl)
zitiert in: EC (European Commission)
European Chemicals Bureau, Joint Research Centre, Ispra, Italien
IUCLID-Datensatz 1-chloro-2-nitrobenzene
CD-ROM, ed. I (1996)
- Nair, R.S., Johannsen, F.R., Levinskas, G.J., Terrill, J.B.
Assessment of toxicity of o-nitrochlorobenzene in rats following a 4-week inhalation exposure
Fundam. Appl. Toxicol., 7, 609 - 614 (1986)
- Nomeir, A.A., Markham, P.M., Mongan, A.L., Silveira, D.M., Chadwick, M.
Effect of dose on the percutaneous absorption of 2- and 4-chloronitrobenzene in rats
Drug Metab. Dispos., 20, 436 - 439 (1992)

- NTP (National Toxicology Program)
Final report on the reproductive toxicity of 2-chloronitrobenzene in CD-1 Swiss mice II
Study RACB90011, PB 92-187608 (1992)
- NTP (National Toxicology Program)
NTP Technical report on toxicity studies of 2-chloronitrobenzene and 4-chloronitrobenzene administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F₁ mice
NTP Toxicity Report Series No. 33, NIH Publication 93-3382 (1993)
- Ono, Y., Somiya, I., Kawaguchi, T.
Genotoxic evaluation on aromatic organochlorine compounds by using umu test
Wat. Sci. Tech., 26, 61 - 69 (1992)
- Paranich, L.I., Paranich, A.V., Vasilenko, N.M., Bugai, E.V., Ortiz, L.
Effect of nitrobenzene and its chloro-substituted derivatives on parameters of antioxidant homeostasis in rat tissues
Bull. Exp. Biol. Med., 116, 1262 - 1265 (1993)
- Renshaw, A., Ashcroft, G.V.
Four cases of poisoning by mononitrochlorobenzene, and one by acetanilide, occurring in a chemical works: with an explanation of the toxic symptoms produced
J. Ind. Hyg., 8, 67 - 73 (1926)
- Rickert, D.E., Held, S.D.
Metabolism of chloronitrobenzenes by isolated rat hepatocytes
Drug Metab. Dispos., 18, 5 - 9 (1990)
- Rusakov, N.V., Korotkova, G.I., Biklubatov, V.S.
Experimentelle Untersuchung der allergenen Wirkung von Ortho- und Paranitrochlorbenzol (deutsche Übersetzung aus dem Russischen)
Gig. Sanit., Heft 3, 13 - 16 (1973)
- Sabbioni, G.
Hemoglobin binding of nitroarenes and quantitative structure-activity relationships
Chem. Res. Toxicol., 7, 267 - 274 (1994)
- Schwanke, W.
Vergiftung mit Nitrotoluol und o-p-Nitrochlorbenzol
Klin. Wochenschr., 9, 2209 - 2210 (1930)
- Sekimpi, D.K., Jones, R.D.
Notifications of industrial chemical cyanosis poisoning in the United Kingdom 1961-80
Br. J. Ind. Med., 43, 272 - 279 (1986)
- Shimizu, M., Yasui, Y., Matsumoto, N.
Structural specificity of aromatic compounds with special reference to mutagenic activity in Salmonella typhimurium - a series of chloro- or fluoro-nitrobenzene derivatives
Mutat. Res., 116, 217 - 238 (1983)
- Suzuki, J., Koyama, T., Suzuki, S.
Mutagenicities of mono-nitrobenzene derivatives in the presence of norharman
Mutat. Res., 120, 105 - 110 (1983)

Suzuki, J., Takahashi, N., Kobayashi, Y., Miyamae, R., Ohsawa, M., Suzuki, S.
Dependence on Salmonella typhimurium enzymes of mutagenicities of nitrobenzene
and its derivatives in the presence of rat-liver S9 and norharman
Mutat. Res., 178, 187 - 193 (1987)

Tatsumi, K., Kitamura, S., Yoshimura, H., Kawazoe, Y.
Susceptibility of aromatic nitro compounds to xanthine oxidase-catalyzed reduction
Chem. Pharm. Bull., 26, 1713 - 1717 (1978)

TNO Division of Technology for Society

An investigation into the possible induction of point mutations at the HGPRT locus of
V79 Chinese hamster lung cells by o-chloronitrobenzene
unveröffentlichter Bericht, Report No. R. 88/114b (1989)
im Auftrag der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie

Totsuka, Y., Hada, N., Matsumoto, K., Kawahara, N., Murakami, Y., Yokoyama, Y.,
Sugimura, T., Wakabayashi, K.
Structural determination of a mutagenic aminophenylnorharman produced by the co-
mutagen norharman with aniline
Carcinogenesis, 19, 1995 - 2000 (1998)

Travlos, G.S., Mahler, J., Ragan, H.A., Chou, B.J., Bucher, J.R.
Thirteen-week inhalation toxicity of 2- and 4-chloronitrobenzene in F344/N rats and
B6C3F1 mice
Fundam. Appl. Toxicol., 30, 75 - 92 (1996)

TRGS (Technische Regeln für Gefahrstoffe) 905

Verzeichnis krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender
Stoffe
Ausgabe Juni 1997/Fassung Februar 2000
Carl Heymanns Verlag KG, Köln (2000)

Vasilenko, N.M., Zvezdai, V.I.

Possibilities of mathematical prediction of certain criteria of the toxicity of nitro and
amino compounds of the benzene series (englische Übersetzung aus dem Russischen)
Gig. Tr. Prof. Zabol., 8, 50 - 52 (1981)

Vernot, E.H., MacEwen, J.D., Haun, C.C., Kinkead, E.R.

Acute toxicity and skin corrosion data for some organic and inorganic compounds and
aqueous solutions
Toxicol. Appl. Pharmacol., 42, 417 - 423 (1977)

Watanabe, T., Ishihara, N., Ikeda, M.

Toxicity of and biological monitoring for 1,3-diamino-2,4,6-trinitrobenzene and other ni-
tro-amino derivatives of benzene and chlorobenzene
Int. Arch. Occup. Environ. Health, 37, 157 - 168 (1976)

Weisburger, E.K., Russfield, A.B., Homburger, F., Weisburger, J.H., Boger, E.,
Van Dongen, C.G., Chu, K.C.

Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term
toxicity or carcinogenicity
J. Environ. Pathol. Toxicol., 2, 325 - 356 (1978)

Younger Laboratories
Toxicological investigation of o-nitrochlorobenzene
Bericht, Project No. Y-73-180 (1973)
im Auftrag der Monsanto Company
NTIS/OTS 0534828

Younger Laboratories
o-Nitrochlorobenzene - acute dermal toxicity (albino rabbits)
Bericht, Project No. YO-83-016 (1983)
im Auftrag der Monsanto Company
NTIS/OTS 0546300

Zimmering, S., Mason, J.M., Valencia, R., Woodruff, R.C.
Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. II. Results of 20 coded compounds tested
for the National Toxicology Program
Environ. Mutagen., 7, 87 - 100 (1985)

Zimmering, S., Mason, J.M., Valencia, R.
Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. VII. Results of 22 coded compounds
tested in larval feeding experiments
Environ. Mol. Mutagen., 14, 245 - 251 (1989)