

# Chloroform

## MAK-Begründung, Nachtrag

A. Hartwig<sup>1,\*</sup>

MAK Commission<sup>2,\*</sup>

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

<sup>2</sup> *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn*

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

### Keywords

Chloroform; Nase; Leber;  
Niere; Kanzerogenität;  
MAK-Wert; maximale  
Arbeitsplatzkonzentration;  
Spitzenbegrenzung;  
Entwicklungstoxizität;  
Hautresorption

## Abstract

The German Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area has re-evaluated chloroform [67-66-3] considering all toxicological end points. There are no human data to derive a maximum concentration at the workplace (MAK value). In 1999, a NOAEC of 5 ml/m<sup>3</sup> was determined in a 13-week inhalation study based on the increased cell proliferation in the kidneys and liver of rats and mice. A MAK value of 0.5 ml/m<sup>3</sup> was established on the basis of these findings. This value has now been confirmed also after taking the increased respiratory volume at the workplace into account (see List of MAK and BAT values, Section Ib and Ic). In a new 2-year inhalation study, respiratory metaplasia of the olfactory epithelium and thickening of the bone in the nasal cavity was observed at the lowest chloroform concentrations tested of 10 ml/m<sup>3</sup> in rats and 5 ml/m<sup>3</sup> in mice. Toxicity in the olfactory epithelium can be a local as well as a systemic effect. After considering the two possible modes of action and the increased respiratory volume at the workplace, the MAK value derived from effects in the nose would correspond to 1 ml/m<sup>3</sup>. The present MAK value of 0.5 ml/m<sup>3</sup> thus protects also against effects in the nose. As the critical effect is systemic, chloroform remains classified in Peak Limitation Category II with an excursion factor of 2. A developmental toxicity study with inhalation exposure of rats determined a NOAEC of 10 ml/m<sup>3</sup>. Additionally, malformations in rats observed in another developmental toxicity study at 100 ml/m<sup>3</sup> are suggestive of teratogenicity. The NOAEC in this study was 30 ml/m<sup>3</sup>. Furthermore, the NOAEL for developmental toxicity after gavage administration was 50 mg/kg body weight and day in rats and 35 mg/kg body weight and day in rabbits. Overall, the margins between the concentrations at the workplace calculated to be without effects and the MAK value are sufficient. Therefore, as damage to the embryo or foetus is unlikely to occur if the MAK value is not exceeded, chloroform remains assigned to Pregnancy Risk Group C. Chloroform causes tumours of the thyroid gland in rats and liver tumours in mice as well as renal tumours in both species. However, chloroform is not expected to induce these tumours via a genotoxic mode of action and has thus been classified in Carcinogen Category 4. There are no data for sensitizing effects in humans and no reliable positive results from animal and in vitro studies. Data for sensitization of the respiratory tract are not available. Uptake via the skin can contribute significantly to systemic toxicity. Therefore, chloroform remains designated with an “H”.

### Citation Note:

Hartwig A, MAK Commission. Chloroform. MAK-Begründung, Nachtrag. MAK Collect Occup Health Saf. 2022 Dez;7(4):Doc070. [https://doi.org/10.34865/mb6766d7\\_4ad](https://doi.org/10.34865/mb6766d7_4ad)

Manuskript abgeschlossen:  
11 Mrz 2021

Publikationsdatum:  
19 Dez 2022

Lizenz: Dieses Werk ist  
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](#).



<b>MAK-Wert (1999)</b>	<b>0,5 ml/m<sup>3</sup> (ppm) <math>\hat{=}</math> 2,5 mg/m<sup>3</sup></b>
<b>Spitzenbegrenzung (2001)</b>	<b>Kategorie II, Überschreitungsfaktor 2</b>
<b>Hautresorption (1999)</b>	<b>H</b>
<b>Sensibilisierende Wirkung</b>	–
<b>Krebserzeugende Wirkung (1999)</b>	<b>Kategorie 4</b>
<b>Fruchtschädigende Wirkung (1999)</b>	<b>Gruppe C</b>
<b>Keimzellmutagene Wirkung</b>	–
<b>BAT-Wert</b>	–
Synonyma	Methyltrichlorid Trichlormethan
Chemische Bezeichnung (IUPAC-Name)	Chloroform
CAS-Nr.	67-66-3
Formel	HCCl <sub>3</sub> CHCl <sub>3</sub>
Molmasse	119,38 g/mol (ECHA 2019)
Schmelzpunkt	–63,5 °C (ECHA 2019)
Siedepunkt	61 °C (ECHA 2019)
Dichte bei 20 °C	1,49 g/cm <sup>3</sup> (ECHA 2019)
Dampfdruck bei 20 °C	211 hPa (ECHA 2019)
log K <sub>OW</sub>	1,97 (ECHA 2019)
Löslichkeit	8700 mg/l Wasser (ECHA 2019)
<b>1 ml/m<sup>3</sup> (ppm) <math>\hat{=}</math> 4,954 mg/m<sup>3</sup></b>	<b>1 mg/m<sup>3</sup> <math>\hat{=}</math> 0,202 ml/m<sup>3</sup> (ppm)</b>

Für Chloroform sind bereits eine Begründung von 1977 sowie ein Nachtrag zur fruchtschädigenden Wirkung von 1989, ein Nachtrag von 1999 und ein Nachtrag zur Spitzenbegrenzung von 2001 und ein Nachtrag zur Genotoxizität von 2003 verfügbar (Greim 1999, 2001, 2003; Henschler 1977, 1989).

Seit dem Jahr 2016 berücksichtigt die Kommission bei Stoffen, deren MAK-Wert auf systemischen Effekten basiert und aus inhalativen Tierversuchen oder Probandenstudien in Ruhe abgeleitet wurde, dass das Atemvolumen am Arbeitsplatz höher als unter diesen experimentellen Bedingungen ist. Dies gilt jedoch nicht für Gase und Dämpfe, wenn deren Blut:Luft-Verteilungskoeffizient < 5 ist (siehe MAK- und BAT-Werte-Liste, Abschnitt Ib und Ic). Der Blut:Luft-Verteilungskoeffizient von Chloroform ist angegeben mit 7,43 (Corley et al. 1990). In diesem Nachtrag wird überprüft, ob aufgrund des höheren Atemvolumens am Arbeitsplatz der MAK-Wert und die Schwangerschaftsgruppe geändert werden müssen. Weiterhin wird der Nachtrag um neue relevante Ergebnisse zu einzelnen Endpunkten ergänzt.

Chloroform wurde bis zum Ende des 19. Jahrhunderts als Inhalationsnarkotikum verwendet und war zeitweise in Europa das am meisten verbreitete Narkosemittel. Heutzutage wird es als Lösungsmittel und in der chemischen Synthese verwendet. Eine Hauptanwendung war die Umsetzung zu Chlordifluormethan, einem Vorläufer von Polytetrafluorethen. Allerdings ist der Import und die Verwendung von Chlordifluormethan seit dem Jahr 2000 in Deutschland und seit 2015 in Europa verboten (EU 2009). Weiterhin ist Chloroform in Reinigungs- und Desinfektionsmitteln ent-

halten oder entsteht dort als Nebenprodukt, so auch bei der Trinkwasseraufbereitung mit Natriumhypochlorit oder Chlordioxid (IARC 1999).

## 1 Allgemeiner Wirkungscharakter

Beim Menschen treten in hohen Konzentrationen von Chloroform, wie sie etwa bei der Anästhesie eingesetzt wurden (12 000–48 000 mg/m<sup>3</sup>), neben den neurologischen Effekten chronische Nieren- und Leberschäden sowie akut Atmungsstörungen und Arrhythmie auf (Greim 1999; Henschler 1977).

Nach oraler und inhalativer Chloroformexposition sind die sensitivsten Zielorgane die Nase, die Nieren sowie die Leber von Ratte und Maus. Chloroform ruft bei der Ratte Tumore in der Schilddrüse und Niere sowie bei der Maus in der Niere und Leber hervor. Hinweise auf einen genotoxischen Wirkungsmechanismus liegen nicht vor. Es gibt weiterhin keine belastbaren Befunde für eine sensibilisierende Wirkung von Chloroform. In Studien zur Entwicklungstoxizität ruft Chloroform nach Inhalation ab 30 ml/m<sup>3</sup> in der Ratte Retardierungen in Form von verringertem Körpergewicht und reduzierter Scheitel-Steiß-Länge bei gleichzeitiger Maternaltoxizität hervor, ab 100 ml/m<sup>3</sup> gibt es Hinweise auf Teratogenität. Nach Schlundsondengabe führt Chloroform bei Ratten ab 126 mg/kg KG und Tag und bei Kaninchen bei 50 mg/kg KG und Tag zu Entwicklungsverzögerungen bei gleichzeitiger Maternaltoxizität. Effekte auf die Fertilität treten nur bei Dosierungen von ca. 1000 mg Chloroform/kg KG und Tag bei gleichzeitiger maternaler Toxizität auf.

## 2 Wirkungsmechanismus

### 2.1 Nierentoxizität

Wie im Nachtrag aus dem Jahr 1999 und in [Abschnitt 3.2](#) beschrieben, entstehen bei der Metabolisierung von Chloroform reaktive Intermediate, wie Phosgen und das Dichlormethyl-Radikal, die mit zellulären Bestandteilen reagieren können. Allerdings wird ein genotoxischer Wirkungsmechanismus für Chloroform nicht angenommen. Eine Tumorentstehung in Leber und Niere wurde nur bei gleichzeitiger Toxizität festgestellt, sodass für Chloroform eine regenerative Hyperplasie als entscheidend für die kanzerogene Wirkung angesehen wird (Greim 1999).

In einer Studie wurde der Wirkungsmechanismus für die Chloroform-assoziierte Nierentoxizität an männlichen Mäusen untersucht, die die NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR) in der Leber nicht exprimieren und somit ca. 95 % der hepatischen mikrosomalen Cytochrom-P450 (CYP)-Aktivität verlieren. Die Leber-CPR-Null-Mäuse zeigten höhere Gehalte an Chloroform in Blut, Niere und Leber sowie eine gesteigerte Nierentoxizität bei 150 mg/kg KG im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Autoren erklären die stärkere Nierentoxizität mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Chloroform im Blut. Weiterhin vermuten die Autoren, dass CYP2E1 in der Niere entscheidend bei der Nierentoxizität durch Chloroform ist und dafür die metabolische Aktivierung von Chloroform in der Leber eine untergeordnete Rolle spielt. Weiterhin wird darauf verwiesen, dass der hochreaktive Metabolit Phosgen sehr schnell mit zellulären Proteinen der Leber reagiert und es unwahrscheinlich ist, dass Phosgen von der Leber in andere Organe wie die Niere transportiert wird (Fang et al. 2008).

### 2.2 Wirkung an der Nase

Der Wirkungsmechanismus für die Toxizität von Chloroform in der Nase von weiblichen B6C3F1-Mäusen und männlichen F344-Ratten wurde nach einer siebentägigen Exposition an sechs Stunden pro Tag gegen 1, 3, 10, 30, 100 und 300 ml Chloroform/m<sup>3</sup> untersucht. Bei weiblichen Mäusen zeigte sich ab 300 ml/m<sup>3</sup> eine Induktion von Knochenwachstum in der proximalen Region des Endoturbinale I (dorsale Nasenmuschel). Ab 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup> stieg in dieser Region die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle signifikant an. Bei männlichen Ratten waren Effekte vor allem in zwei Regionen der Nasenhöhle lokalisiert. Ab 10 ml/m<sup>3</sup> kam es zu einer Vergrößerung der Becherzellen

im Nasengang sowie in der Ethmoidregion (Lamina propria der olfaktorischen Schleimhaut und der unterliegenden Knochen) zu vielfältigen Veränderungen wie Umbau der Knochen der Nasenmuschel, Verlust der Bowmanschen Drüsen oder eine erhöhte Zellproliferation. Die Effekte waren schwerwiegender in den unteren und nicht in der oberliegenden Region der Bowmanschen Drüsen und im oberen olfaktorischen Epithel. Die Zellproliferation zeigte in der proximalen und zentralen Region des Endoturbinale I den stärksten Anstieg, während die distale Region nur eine mäßige Zunahme zeigte. Mittels immunhistochemischer Färbung wurde bei Ratten der Kontrollgruppe CYP2E1 überwiegend im Zytoplasma des olfaktorischen Epithels und in den oberliegenden Bowmanschen Drüsen gemessen. Die Schädigungen durch Chloroform waren in diesen Gewebsschichten nicht zu beobachten und deshalb folgern die Autoren, dass CYP2E1 in der Nase keine kritische Rolle bei der olfaktorischen Toxizität spielt. Die durch Chloroform induzierten Effekte liegen in der olfaktorischen Schleimhaut in den unteren Schichten der Lamina propria und somit nicht im Hauptatemweg der Ratte. Laut den Autoren deutet die Lokalisation der toxischen Effekte darauf hin, dass nicht die inhalative Deposition von Chloroform, sondern dessen Verteilung oder die seiner toxischen Metaboliten über das Blut die adversen Effekte in der Nasenschleimhaut verursachen. Etwa 0,5 % des Herzzeitvolumens gelangt durch die Verteilung über das Blut in den Atemtrakt der Ratte (Méry et al. 1994). Die beschriebenen Effekte deuten an, dass die durch Inhalation von Chloroform induzierten Effekte an der Nase durch eine systemische Verteilung der Substanz und nicht durch eine lokale Wirkung verursacht werden. Dies wird bestätigt durch die Wirkung von Chloroform in der Nase nach oraler Gabe. Nach Schlundsondengabe an F344-Ratten für vier Tage oder drei Wochen zeigten sich Effekte wie neue Knochenbildung und erhöhte Zellreplikation in der olfaktorischen Schleimhaut der Ethmoidregion ab 34 mg Chloroform/kg KG und Tag. Die Effekte an der Leber und Niere waren erst ab 100 mg Chloroform/kg KG und Tag festzustellen (Larson et al. 1995). Der Pathomechanismus der Knochenverdickung lässt sich über eine Degeneration der Bowmanschen Drüsen, welche zu einer Irritation des Periosts führt, und nachfolgender Proliferation der Knochenzellen erklären.

Zum Vergleich von Chloroform mit einem anderen Stoff, der lokal und systemisch an der Nase wirkt, wird eine Untersuchung mit Naphthalin nach inhalativer und intraperitonealer Gabe an Sprague-Dawley-Ratten herangezogen. Nach beiden Verabreichungsformen wurden zelluläre Schädigungen ausschließlich in der olfaktorischen Schleimhaut der Nase beobachtet, die dafürsprechen, dass eine Schädigung nur nach metabolischer Umsetzung im olfaktorischen Epithel eintritt. Nach inhalativer Aufnahme von Naphthalin war die Schädigung auf den medialen Gang beschränkt, in dem hauptsächlich der nasale Atemfluss stattfindet. Bereiche mit weniger Luftfluss, etwa die Ethmoturbinalien (Siebbeinmuscheln), waren nach inhalativer Exposition nicht betroffen. Im Gegensatz dazu zeigten sich nach systemischer intraperitonealer Verabreichung Schädigungen auch in den Gebieten der Ethmoturbinalien (Lee et al. 2005). Das nasale Schädigungsprofil in den Studien von Lee et al. (2005) und Méry et al. (1994) legt somit nahe, dass Chloroform in der Nase der Ratte nicht am Hauptatemweg wirkt, was für eine systemische Wirkung spricht.

Allerdings lassen sich auch Argumente für einen lokalen Wirkungsmechanismus für die Toxizität in der Nase finden. So zeigen die Toxikokinetikdaten für den Nager und den Menschen (siehe [Abschnitt 3.1](#)), dass unverändertes Chloroform nach Inhalation die Atemwege nicht nur nach Einatmung, sondern auch nach Ausatmung passiert. Es ist anzunehmen, dass Chloroform bei Ein- und Ausatmung durch die metabolischen Enzyme in der Nase zu toxischen Metaboliten umgesetzt wird und das Nasenepithel schädigen kann. Ein weiterer Hinweis für einen lokalen Wirkungsmechanismus ist, dass die Effekte an Ratte und Maus nach Chloroforminhalation, wie die Degeneration des olfaktorischen Epithels (siehe [Abschnitt 5.2.1](#)), in das Effektmuster einer lokalen Irritation passen.

**Fazit:** Für die toxischen Effekte an der Nase nach Chloroforminhalation können sowohl systemische (nach Verteilung über den Blutstrom) als auch lokale (durch direkte Wirkung am Auftreffort) Wirkungsmechanismen verantwortlich gemacht werden.

## 3 Toxikokinetik und Metabolismus

### 3.1 Aufnahme, Verteilung, Ausscheidung

Daten zur Toxikokinetik sind bereits in der Begründung von 1977 und im Nachtrag 1999 (Greim 1999; Henschler 1977) aufgeführt.

B6C3F1-Mäuse und Osborn-Mendel-Ratten wurden inhalativ für sechs Stunden gegen [<sup>14</sup>C]-markiertes Chloroform in Konzentrationen von 10, 89 oder 366 ml/m<sup>3</sup> bzw. 93, 356 oder 1041 ml/m<sup>3</sup> exponiert. Bis 48 Stunden nach der Exposition wurden von der gesamten aufgenommenen Radioaktivität (als Chloroform, CO<sub>2</sub>, in Urin, Faeces und Karkasse) 0,3; 0,5 und 8 % von den Mäusen und 2, 20 und 42 % von den Ratten abgeatmet. Die während der Exposition abgeatmete Menge konnte nicht bestimmt werden. Der Großteil wurde als CO<sub>2</sub> abgeatmet, bei den Mäusen bereits während der Exposition. Bei den höheren Konzentration war der Metabolismus zu CO<sub>2</sub> limitiert (Corley et al. 1990; Greim 1999).

Der Blut:Luft-Verteilungskoeffizient von Chloroform bei Ratte, Maus und Mensch wird mit 21,3; 20,8 bzw. 7,43 angegeben (Corley et al. 1990). Das bedeutet, dass bei gleicher äußerer Belastung Ratte und Maus im Vergleich zum Menschen mehr Substanz ins Blut aufnehmen.

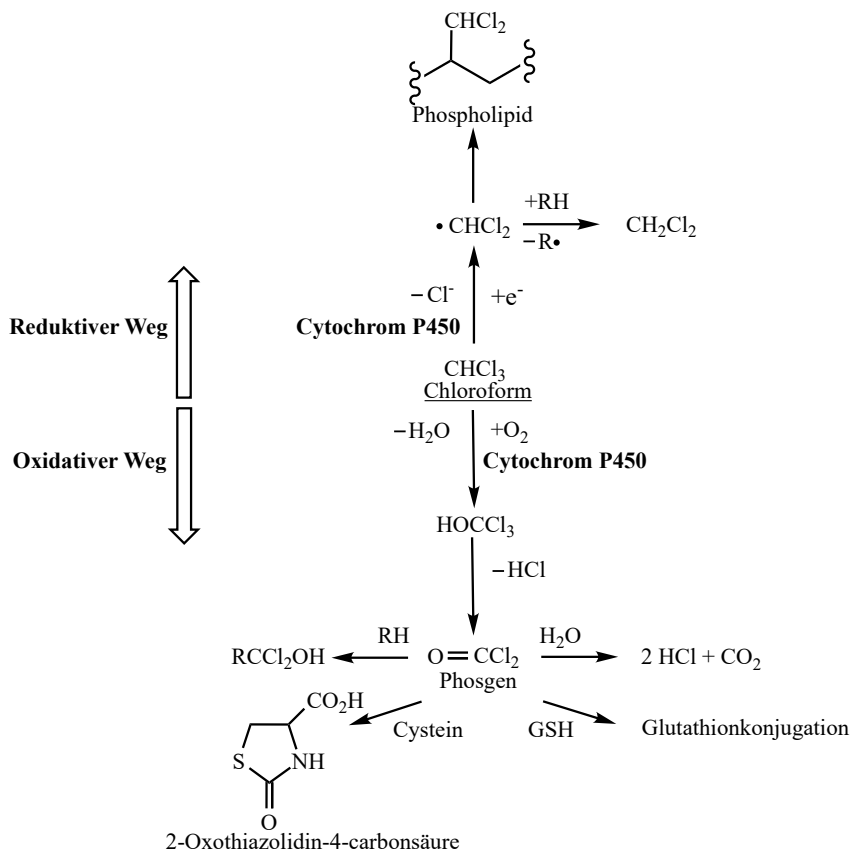
Chloroform wird von Tieren schnell und vollständig über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen. Bei der Maus und der Ratte wurde die Radioaktivität in der Ausatemluft, den Faeces und der Karkasse bis 48 Stunden nach oraler Applikation untersucht. Bei Maus und Ratte war der größte Anteil (85 % bzw. 67 %) als [<sup>14</sup>C]-CO<sub>2</sub>, gefolgt von unverändertem Chloroform (6 % bzw. 20 %) in der Ausatemluft messbar. Dagegen wurden von Affen 79 % unverändert abgeatmet, 18 % als CO<sub>2</sub>. Mit Urin und Faeces wurden 2–10 % ausgeschieden (WHO 1994). Studien an Probanden zeigen, dass nach oraler Aufnahme von 500 mg <sup>13</sup>C-Chloroform innerhalb von acht Stunden 50 % als CO<sub>2</sub> und bis zu 68 % unverändert abgeatmet werden. Nach 1,5 Stunden wurden maximale Blutkonzentrationen von 1–5 mg Chloroform/l erreicht (Fry et al. 1972). Nach einmaligem Einatmen von 5 mg mit [<sup>38</sup>C] markiertem Chloroform (entspricht 200 ml/m<sup>3</sup>) als Dampf und 20-sekündigem Anhalten der Luft wurde bei Probanden eine Retention von 80 % gemessen. Innerhalb einer Stunde nach Exposition wurden 10 % der aufgenommenen Radioaktivität abgeatmet (Greim 1999; Morgan et al. 1970). Eine dermale Aufnahme von Chloroform beim Menschen ist beschrieben (Borzelleca und Carchman 1982; Greim 1999).

Zwölf männliche und weibliche Probanden zwischen 18 und 50 Jahren erhielten oral eine Gelatine kapsel mit 500 mg Chloroform und 1 ml Olivenöl. Bei vier Probanden wurden Halbwertszeiten im Blut bestimmt. Die Autoren beschreiben eine biphasische Elimination mit initialen Halbwertszeiten von 9, 21, 12 und 14 Minuten sowie mit terminalen Halbwertszeiten von 96, 92, 86 und 86 Minuten (k. w. A.) (Fry et al. 1972). Es besteht jedoch eine Diskrepanz zwischen der Abbildung der Konzentrations-Zeit-Verläufe im Blut und den angegebenen Werten für die initiale Halbwertszeit.

### 3.2 Metabolismus

Der Metabolismus von Chloroform (**Abbildung 1**) ist gut untersucht und bereits im Nachtrag 1999 (Greim 1999) beschrieben. Chloroform wird in der Leber metabolisiert, sowohl auf oxidativem als auch auf reduktivem Wege, abhängig von der Substratkonzentration und dem Sauerstoffgehalt in der Zelle. Beim Menschen steht die oxidative Metabolisierung von Chloroform durch CYP zu Trichlormethanol und weiter durch Dehydrochlorierung zu Phosgen im Vordergrund. Phosgen reagiert mit Wasser zu HCl und CO<sub>2</sub> oder bildet instabile Addukte mit biologischen Makromolekülen. Weiterhin kann Phosgen direkt mit Cystein interagieren und 2-Oxothiazolidin-4-carbonsäure bilden oder über Glutathion (GSH) detoxifiziert werden. Ein verminderter GSH-Status kann allerdings zur Reaktion der Metaboliten mit Proteinen führen.

Unter reduktiven Bedingungen wird Chloroform, ebenfalls durch CYP, zum Dichlormethyl-Radikal metabolisiert, das entweder zu Dichlormethan abgebaut wird oder mit Fettsäuren und Phospholipiden reagiert. Der reduktive Metabolismusweg ist allerdings in der humanen Leber von untergeordneter Bedeutung, da er nur bei hohen Substratkonzentrationen und unter sauerstoffarmen Bedingungen stattfindet. Unter In-vivo-Bedingungen läuft in erster Linie der oxidative Metabolismus ab (Borzelleca und Carchman 1982).



**Abb. 1** Metabolismusschema für Chloroform (nach WHO 1994)

Einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung toxischer Metaboliten und somit zur Toxizität von Chloroform in Leber, Niere und Nase leistet CYP2E1, das vor allem kleine planare Moleküle metabolisiert. In Rattenlebermikrosomen wurde die Oxidation zu Phosgen bei geringeren Chloroformkonzentrationen durch CYP2E1 und bei höheren Konzentrationen von 5 mM vor allem durch die Isoenzyme CYP2B1/2 und 2C11 katalysiert (Docks und Krishna 1976; Gemma et al. 2003; Greim 1999; Zanger und Schwab 2013). Ein Nachweis von CYP2E1 in der Leber, der Niere und der Nasenschleimhaut erfolgte auf Protein- und RNA-Ebene (mittels Western- bzw. Northern-Blot) in Sprague-Dawley-Ratten, denen zweimal täglich an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 5 ml Aceton/kg KG mit der Schlundsonde verabreicht wurden. Nach 24 Stunden wurde in allen drei Geweben eine Zunahme an CYP2E1-Protein und CYP2E1-Enzymaktivität im Vergleich zu den Kontrollratten festgestellt (Nachweis durch Hydroxylierung von 4-Nitrophenol). Nur in der Nasenschleimhaut konnte zusätzlich ein statistisch signifikanter Anstieg an CYP2E1-mRNA nachgewiesen werden (Longo und Ingelman-Sundberg 1993). In humanen Lebermikrosomen fand unter oxidativen Bedingungen bei der Sättigung von CYP2E1 die Bildung von Phosgen aus Chloroform hauptsächlich durch das Enzym CYP2A6 statt (Gemma et al. 2003; Guengerich et al. 1991). In humanen Nierenmikrosomen konnte das Protein von CYP2E1 nicht detektiert werden (Amet et al. 1997; Cummings et al. 2000).

Männliche Mäuse haben im Vergleich zu den weiblichen Tieren eine ausgeprägtere Nephrotoxizität nach Chloroformgabe, da sie einen höheren CYP-Gehalt in der Niere aufweisen (Smith et al. 1984). Mittels Immunblot wurde bestätigt, dass CYP-Isoenzyme, wie CYP2B1, CYP2C6, CYP2E1 oder CYP4A1, bei männlichen C57Bl/6 und DBA/2N-Mäusen stärker exprimiert wurden als bei weiblichen (Wolf 1991). Dieser Unterschied zeigt sich auch in den in diesem Nachtrag aufgeführten Studien (Abschnitt 5), jedoch nicht bei Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen, sodass diese Wirkung speziesspezifisch zu sein scheint (ATSDR 1997). Im Allgemeinen ist die Regulierung von CYP2E1 komplex und die Expression von vielfältigen Faktoren wie Fremdstoffen, Hormonen (v.a. Wachstumshormonen, Testosteron, Schilddrüsenhormone und Insulin) oder auch Krankheiten wie Entzündungen, Übergewicht und Diabetes beeinflussbar

(Overton et al. 2008). Für einen nennenswerten Einfluss von Testosteron spricht, dass mit Testosteron behandelte weibliche ICR-Mäuse nach subkutaner Chloroforminjektion eine erhöhte Nierentoxizität zeigten, wohingegen sich bei kastrierten männlichen Mäusen keine Nierentoxizität mehr feststellen ließ (Smith et al. 1984).

### 3.2.1 Unterschiede im Nasengewebe von Nager und Mensch

Untersuchungen zum Metabolismus im Nasengewebe liegen vor allem für Nager vor. Die Daten zur menschlichen Nasenschleimhaut sind limitiert, was auch auf eine erschwerte Probenahme von humanem Nasengewebe zurückzuführen ist.

Der unterschiedliche nasale Metabolismus bei Nager und Mensch, der insbesondere auf der unterschiedlichen Enzymausstattung der Nase beruht, wird sowohl durch die Anatomie als auch die Physiologie beeinflusst. Ratte und Maus sind im Unterschied zum Menschen ausschließliche Nasenatmer und, wie in [Abschnitt 3.1](#) beschrieben, nehmen bei gleicher äußerer Belastung im Vergleich zum Menschen mehr Chloroform ins Blut auf (Corley et al. 1990; Morris et al. 2010). Insgesamt ist somit die Nase des Nagers einer höheren Konzentration von Chloroform ausgesetzt.

Ein weiterer Unterschied in der Nase von Nager und Mensch ist, dass der Luftstrom über das olfaktorische Epithel bei Ratten ca. 15 % beträgt, während es beim Menschen 7 % sind (Harkema et al. 2006; Morris et al. 2010).

Die Nasenhöhle der Ratte bzw. der Maus ist zu etwa 50 % bzw. 47 % mit olfaktorischem Epithel belegt, wohingegen der Anteil beim Menschen nur 3 % beträgt. Die Bowmanschen Drüsen liegen in der Lamina propria des gesamten olfaktorischen Epithels. Da die Ratte im Vergleich zum Menschen zu einem deutlich höheren Prozentsatz olfaktorisches Epithel besitzt, ist auch der Anteil an Bowmanschen Drüsen bei der Ratte im Verhältnis zum Menschen sichtbar erhöht. Substanzen, die in diesem Gewebe der Nase Effekte verursachen, sind deshalb für die Ratte besonders wirkungsvoll (Gross et al. 1982; Harkema und Morgan 1996).

Beim Nager besitzt auch das respiratorische Epithel metabolisches Potential, da dieses Gewebe im Unterschied zum Menschen zusätzlich ein nicht zilientragendes Übergangsepithel aufweist, welches metabolisch aktiver ist. Das respiratorische Epithel des Menschen wird deshalb als geringer metabolisch kompetent angesehen als das der Ratte (Morris et al. 2010).

Im olfaktorischen Epithel ist im Vergleich zum respiratorischen Epithel ein besonders hoher Gehalt an metabolisierenden Enzymen enthalten, was in verschiedenen Spezies, wie Javaneraffe (*Macaca fascicularis*), Hund und Ratte, gezeigt wurde (Kassinova et al. 1981; Mehta und von Borstel 1982; Scheel und Zimmermann 1981). Neben der Proteinmenge ist auch die katalytische Aktivität der CYP-Enzyme im olfaktorischen Epithel erhöht. Die katalytische Aktivität der CYP-Enzyme im Nasenepithel ist sogar höher als die anderer Gewebe inklusive der Leber (Sarkar 1992). Vermutet wird, dass dies mit dem Gehalt der NADPH-Reduktase im Zusammenhang steht, dem Enzym, das für den Elektronentransfer im CYP-Reaktionszyklus verantwortlich und somit geschwindigkeitsbestimmend ist. In einer Untersuchung an Ratten, Mäusen und Hamstern betrug bei allen Spezies das Verhältnis von NADPH-Reduktase zu CYP im olfaktorischen Epithel 1:2 bis 1:3 im Vergleich zu 1:11 bis 1:15 in der Leber (Reed et al. 1986). Das für die Toxifizierung von Chloroform relevante Enzym CYP2E1 wurde bei männlichen F344-Ratten vor allem in den Bowmanschen Drüsen, den Stützzellen des olfaktorischen Epithels, sowie in den zilientragenden Zellen des respiratorischen Epithels und in den nichtsekretorischen Zellen des Übergangsepithels nachgewiesen (Reed 1993). Für das humane Nasengewebe liegen bisher keine Untersuchungen vor, die eine Expression von CYP2E1 auf Proteinebene zeigen. Auf Transkriptionsebene wurde mittels qualitativer Polymerase Chain Reaction in der Nasenschleimhaut humaner Feten *CYP2E1* identifiziert (Zhang et al. 2005). In verschiedenen Studien wurde in der humanen Nasenschleimhaut von Erwachsenen die Genexpression von *CYP2A6*, *2A13*, *2C* und *3A*, nicht aber von *CYP2E1* detektiert (Ding und Kaminsky 2003). Für CYP2E1 ist die Korrelation zwischen den Transkriptions- und Proteinlevel gering (Zanger und Schwab 2013). Erklärt werden kann dies durch die kurze Halbwertszeit von CYP2E1 sowie dessen Substratstabilisierung. Bei Anwesenheit von Substrat wird die Halbwertszeit verlängert und der proteasomale Abbau verhindert.

In einer älteren Studie wurde nur eine geringe Enzymaktivität von CYP2E1 anhand der Deethylierung von Diethylnitrosamin in der humanen Nasenschleimhaut gemessen (Longo et al. 1989). In einer neueren Studie wurde keine

Enzymaktivität von CYP2E1 in humanem Nasengewebe identifiziert. Hierbei wurde die Rate der durch CYP2E1 und CYP2F2 katalysierten Metabolisierung von Styrol zu Styroloxid an Mikrosomen aus respiratorischem und olfaktorischem Gewebe von Ratte, Maus und Mensch getestet. Die Metabolisierungsrate zu Styroloxid lag bei Ratte und Maus in beiden Geweben in der gleichen Größenordnung, allerdings war die Rate im olfaktorischen Epithel etwa doppelt so hoch wie die im respiratorischen Epithel. Weiterhin war die metabolische Umsetzung zu Styroloxid bei Ratte und Maus im respiratorischen und olfaktorischen Epithel höher als in der Leber. Im humanen Nasengewebe konnte keine Umsetzung von Styrol zu Styroloxid detektiert werden (Green et al. 2001).

### 3.2.2 Fazit

Der Mensch dürfte im Vergleich zum Nager gegenüber einer metabolischen Aktivierung von Chloroform zu toxischen Metaboliten in der Nase weniger sensitiv sein. Dies ist mit Unterschieden in der Anatomie und Physiologie der Nase des Nagers zu erklären, wodurch flüchtige Stoffe beim Nager in größerem Umfang über die Nase aufgenommen werden und somit auch vermehrt mit der metabolisch aktiven Region, dem olfaktorischen Epithel, in Kontakt kommen, das darüber hinaus bei der Ratte einen größeren Anteil am Nasenepithel ausmacht als beim Menschen. Für eine weitaus stärkere Metabolisierung in der Rattennase spricht die höhere Aktivität von CYP-Enzymen, darunter auch das für die metabolische Umsetzung von Chloroform zu Phosgen relevante Enzym CYP2E1. Beim Nager wird die Aktivität von CYP2E1 in der Nase sogar höher als in der Leber angesehen. Da die Ratte im Verhältnis zum Menschen mehr Bowmansche Drüsen besitzt, ist der Ratte für Effekte an diesem Gewebe eine höhere Empfindlichkeit zuzuschreiben.

## 4 Erfahrungen beim Menschen

### 4.1 Einmalige Exposition

Hierzu liegen keine neuen Daten vor.

### 4.2 Wiederholte Exposition

Untersuchungen zu diesem Endpunkt sind in der Begründung 1977 sowie im Nachtrag 1999 beschrieben (Greim 1999; Henschler 1977). Weiterhin sind Erfahrungen nach wiederholter Chloroformexposition beim Menschen eingehend im Bericht der US EPA (2001) dargestellt. Hierbei werden Studien nach einer Exposition gegen Chloroform im Trinkwasser beschrieben, wobei auf die Koexposition mit anderen Trihalogenmethanen sowie weiteren Desinfektionsmitteln verwiesen wird. Weiterhin wird auf Arbeitsplatzstudien eingegangen, bei denen Angaben zu Chloroformkonzentrationen fehlen und ebenfalls eine Koexposition mit anderen Chemikalien stattgefunden hat (US EPA 2001). Für die Bewertung der Effekte nach wiederholter Exposition sind die Studien daher nicht geeignet.

### 4.3 Wirkung auf Haut und Schleimhäute

Hierzu liegen keine neuen Daten vor.

### 4.4 Allergene Wirkung

Hierzu liegen keine neuen Daten vor.

### 4.5 Reproduktionstoxizität

In einem Übersichtsartikel (Williams et al. 2018) wurden nach umfangreichen Recherchen 30 Studien zum Zusammenhang zwischen reproduktionstoxischen Effekten und Chloroformexposition identifiziert. In 29 Studien wurde die Exposition über selbst berichtete Verhaltensweisen zum Duschen, Baden, Händewaschen, Gebrauch eines Wasser-



filters, Menge des Leitungswasserverbrauchs oder regionale Daten zu Chloroformkonzentrationen im Trinkwasser bestimmt. In einer Studie wurden Chloroformkonzentrationen im Blut mit einem Median von 50,7 ng/l angegeben. In etwa der Hälfte der 30 Studien wurde kein Zusammenhang zwischen der Chloroformexposition und dem Geburtsgewicht gefunden. Aufgrund der unzureichenden Expositionserfassung ist eine eindeutige Aussage allerdings nicht möglich. In 13 von 17 Studien, die den Parameter „zu klein für das Gestationsalter“ untersuchten, ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Chloroformexposition und dem fetalen Wachstum. In den anderen vier Studien fand sich ein marginal statistisch signifikant erhöhtes Risiko für „zu klein für das Gestationsalter“ und hoher Chloroformexposition. Die Autoren geben an, dass wegen der uneinheitlichen Ergebnisse und des Fehlens von signifikanten Befunden in Studien mit höherer Qualität bezüglich der analytisch erfassten Chloroformexpositionen, ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Chloroformexposition und einem Effekt auf das fetale Wachstum nicht ableitbar ist. Ebenso ließ sich keine Assoziation zwischen Chloroformexposition und Frühgeburten ableiten.

Aus einer Studie ergaben sich Hinweise auf mögliche Assoziationen zwischen einer Chloroformexposition und Defekten der Herzscheidewand oder des Neuralrohres. Jedoch blieben die Befunde ohne klare Dosis-Wirkungs-Beziehung und wurden auch durch die anderen epidemiologischen Studien nicht unterstützt (Williams et al. 2018). Da keine quantitativen Angaben zur Chloroformexposition in den Studien vorliegen, werden diese für die Bewertung der Reproduktionstoxizität nicht herangezogen.

## 4.6 Genotoxizität

Hierzu liegen keine neuen Daten vor.

## 4.7 Kanzerogenität

Hierzu liegen keine neuen Daten vor.

# 5 Tierexperimentelle Befunde und In-vitro-Untersuchungen

## 5.1 Akute Toxizität

### 5.1.1 Inhalative Aufnahme

Effekte nach einmaliger inhalativer Aufnahme sind im Nachtrag 1999 (Greim 1999) beschrieben. In der Literatur wird ein 4-Stunden-LC<sub>50</sub>-Wert von 10 500 mg/m<sup>3</sup> angegeben (ECHA 2019).

### 5.1.2 Orale Aufnahme

Die oralen LD<sub>50</sub>-Werte betragen 36 bis 1366 mg/kg KG für verschiedene Mäusestämme und 894 bis 2000 mg/kg KG für Sprague-Dawley-Ratten. Vergiftungssymptome waren Müdigkeit, verminderter Muskeltonus, Ataxie, Piloarrektion und Prostration (Greim 1999).

### 5.1.3 Dermale Aufnahme

Nach einmaliger Applikation von 1000 oder 4000 mg Chloroform/kg KG okklusiv über 24 Stunden wurden nach zwei Wochen bei zwei Kaninchen dosisabhängig starke degenerative Veränderungen an den Nierentubuli beobachtet. Effekte an der Leber zeigten sich nicht (Torkelson et al. 1976).

## 5.2 Subakute, subchronische und chronische Toxizität

### 5.2.1 Inhalative Aufnahme

Studien zur chronischen Toxizität von Chloroform wurden bereits im Nachtrag aus dem Jahr 1999 ausführlich dargestellt (Greim 1999). Chloroform wirkt leber- und nierentoxisch. Unklar war bisher, wie die minimalen Effekte am olfaktorischen Epithel der Nase zu bewerten sind. Nochmals dargestellt und diskutiert werden im Folgenden Inhalationsstudien, die für die Bewertung relevant sind und nach 1999 publizierte Ergebnisse. Weiterhin liegen neue Daten zu Effekten von Chloroform auf die Nasenhöhle vor.

#### 5.2.1.1 Zwei-Wochen-Studie

Je zehn männliche und weibliche F344-Ratten und je zehn männliche und weibliche BDF1-Mäuse wurden gegen 0, 500, 1000, 2000, 4000 oder 8000 ml Chloroform/m<sup>3</sup> an sechs Stunden pro Tag für fünf Tage pro Woche zwei Wochen lang exponiert. Alle männlichen und weiblichen Mäuse und Ratten starben ab einer Expositionskonzentration von 2000 ml Chloroform/m<sup>3</sup>. Bei den überlebenden männlichen Mäusen wurden bei 500 und 1000 ml Chloroform/m<sup>3</sup> Nekrosen und zytoplasmatische Basophilie des proximalen Tubulus der Niere und leichte Schwellung und Vakuolisierung der Leber beobachtet. Im olfaktorischen Epithel zeigten sich Atrophie und respiratorische Metaplasie. Bei diesen Konzentrationen traten bei weiblichen Mäusen Nekrosen und Vakuolisierung in der Zentralregion der Leber sowie Degeneration, Nekrosen und Umstrukturierungen im olfaktorischen und respiratorischen Epithel der Nase auf. Bei den überlebenden weiblichen und männlichen Ratten der 500-ml/m<sup>3</sup>- und 1000-ml/m<sup>3</sup>-Gruppen waren Vakuolisierungen im proximalen Tubulus der Niere und in der Zentralregion der Leber zu erkennen. In der Nasenhöhle wurden Abschuppung, Atrophie und Umstrukturierungen im olfaktorischen Epithel sowie Ödeme der Lamina propria beobachtet (Kasai et al. 2002).

#### 5.2.1.2 13-Wochen-Studien

Je zehn männliche und weibliche F344-Ratten und je zehn männliche und weibliche BDF1-Mäuse wurden gegen 0, 12, 25, 50, 100 oder 200 ml Chloroform/m<sup>3</sup> an sechs Stunden pro Tag für fünf Tage pro Woche 13 Wochen lang in einer Expositionskammer exponiert. Bei den männlichen Mäusen kam es zu einer hohen Mortalität kurz nach Beginn der Exposition (siehe [Tabelle 1](#)), vermutlich durch Nekrosen des proximalen Nierentubulus. Alle weiblichen Mäuse sowie alle Ratten überlebten die 13-wöchige Expositionszeit. Die histopathologischen Befunde an Leber, Niere und Nasenhöhle sind in [Tabelle 2](#) und [Tabelle 3](#) dargestellt.

**Tab. 1** Mortalität der BDF1-Mäuse bei 13-wöchiger Exposition gegen Chloroform (Kasai et al. 2002)

	♂	♀
Tierzahl	10	10
<b>Konzentration (ml/m<sup>3</sup>)</b>		
0	0	0
12	2 (1/1)(1/3.)	0
25	9 (8/1)(1/3.)	0
50	10 (7/1)(3/2.)	0
100	8 (8/1)	0
200	10 (10/1)	0

1., 2., 3.: Tag der Exposition

**Tab. 2** Histopathologische Befunde bei BDF1-Mäusen nach 13-wöchiger Exposition gegen Chloroform (Kasai et al. 2002)

		Konzentration (ml/m <sup>3</sup> )					
		0	12	25	50	100	200
Tierzahl	♂	10	10	10	10	10	10
	♀	10	10	10	10	10	10
<b>Nasenhöhle</b>							
Degeneration des o. E.	♂	0	2	5**	7**	6**	9**
	♀	0	0	0	0	0	0
Vergrößerung des Knochens	♂	0	7**	1	0	1	0
	♀	0	7**	10**	9**	9**	9**
Eosinophile Veränderungen des o. E.	♂	0	0	0	0	1	0
	♀	0	7**	9**	8**	9**	10**
Eosinophile Veränderungen des r. E.	♂	0	0	0	0	1	0
	♀	0	8**	8**	7**	7**	8**
<b>Leber</b>							
Schwellung	♂	0	0	0	0	0	10**
	♀	0	0	0	0	0	0
Zellatypie	♂	0	0	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0	10**	10**
Nekrosen	♂	0	0	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0	0	10**
Vakuolisierung	♂	0	0	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0	0	2
<b>Niere (proximaler Tubulus)</b>							
Tubuläre Nekrose	♂	0	7**	10**	10**	9**	10**
	♀	0	0	0	0	0	0
Degeneration	♂	0	2	9**	10**	8**	10
	♀	0	0	0	0	0	0
Zytoplasmatische Basophilie	♂	0	8**	1	0	2	0
	♀	0	0	0	0	1	0

\*\*p &lt; 0,01 nach Chi-Quadrat-Test

o. E.: olfaktorisches Epithel; r. E.: respiratorisches Epithel

**Tab. 3** Histopathologische Befunde bei F344-Ratten nach 13-wöchiger Exposition gegen Chloroform (Kasai et al. 2002)

		Konzentration (ml/m <sup>3</sup> )					
		0	25	50	100	200	400
Tierzahl	♂	10	10	10	10	10	10
	♀	10	10	10	10	10	10
<b>Nasenhöhle</b>							
Mineralisierung	♂	0	10**	10**	10**	10**	10**
	♀	0	10**	10**	10**	10**	10**
Atrophie des o. E.	♂	0	7**	10**	10**	9**	10**
	♀	0	10**	10**	10**	10**	10**
Nekrosen des o. E.	♂	0	0	0	0	8**	10**
	♀	0	0	0	0	0	1
<b>Leber (zentral)</b>							
Ceroidansammlung	♂	0	0	0	0	0	10**
	♀	0	0	0	0	8**	10**

Tab. 3 (Fortsetzung)

		Konzentration (ml/m <sup>3</sup> )					
		0	25	50	100	200	400
Strukturverfall	♂	0	0	0	0	10**	10**
	♀	0	0	0	8**	9**	9**
Vakuolisierung	♂	0	0	0	0	1	0
	♀	0	0	0	0	2	0
<b>Niere (proximaler Tubulus)</b>							
Vakuolisierung	♂	0	0	0	0	3	4*
	♀	0	0	0	2	6**	5**

\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01 nach Chi-Quadrat-Test

o. E.: olfaktorisches Epithel; r. E.: respiratorisches Epithel

Bei weiblichen **Mäusen** ließen sich in der Nasenhöhle ab 12 ml Chloroform/m<sup>3</sup> Vergrößerung des Knochens und eosinophile Veränderungen des olfaktorischen und respiratorischen Epithels erkennen. Bei männlichen Mäusen war in der Nasenhöhle bei 12 ml/m<sup>3</sup> eine Knochenvergrößerung zu beobachten, allerdings ohne Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. In der Leber kam es bei den männlichen Tieren zu Schwellungen ab 200 ml/m<sup>3</sup> und bei den weiblichen Tieren zeigte sich eine Zellatypie ab 100 ml/m<sup>3</sup>. In der Niere fanden sich nur bei den männlichen Tieren Veränderungen. Ab 12 ml Chloroform/m<sup>3</sup> traten tubuläre Nekrosen und eine zytoplasmatische Basophilie auf. Signifikante Degenerationen im proximalen Tubulus waren ab 25 ml/m<sup>3</sup> nur bei männlichen Mäusen zu beobachten. Bei den männlichen und weiblichen **Ratten** war der empfindlichste Effekt ab 25 ml Chloroform/m<sup>3</sup> eine veränderte Mineralisation sowie Atrophie des olfaktorischen Epithels. Nur bei den männlichen Ratten waren ab 200 ml/m<sup>3</sup> Nekrosen des olfaktorischen Epithels erkennbar. In der Leber männlicher Ratten trat ab 200 ml/m<sup>3</sup> und bei weiblichen Ratten ab 100 ml/m<sup>3</sup> ein Strukturverfall auf. Ceroidansammlungen traten bei männlichen Ratten ab 400 ml Chloroform/m<sup>3</sup> und bei weiblichen Ratten ab 200 ml/m<sup>3</sup> auf. Die Niere zeigte signifikant veränderte Vakuolisierungen ab 400 ml Chloroform/m<sup>3</sup> bei männlichen und ab 200 ml/m<sup>3</sup> bei weiblichen Tieren (Kasai et al. 2002). Zusammenfassend erwies sich bei **Ratten** die **Nase** als empfindlichstes Organ mit einer **LOAEC** von 25 ml/m<sup>3</sup>. Gleichfalls traten bei **Mäusen** Effekte in der **Nase** und **Niere** bei der **LOAEC** von **12 ml Chloroform/m<sup>3</sup>** auf. Es kann keine **NOAEC** abgeleitet werden. Auffallend ist bei den Befunden in der Nase der Maus ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Effektmuster. So sind Degenerationen des olfaktorischen Epithels nur bei männlichen Mäusen sichtbar, während Knochenvergrößerungen und eosinophile Veränderungen des olfaktorischen und respiratorischen Epithels fast ausschließlich bei den weiblichen Mäusen auftreten. Eine Erklärung hierfür könnte die hohe Mortalität kurz nach Beginn der Chloroformexposition der männlichen Mäuse liefern, wodurch eine Knochenvergrößerung nicht sichtbar wird, da sich dieser Effekt nur bei Tieren mit einer längeren Lebensdauer zeigt. Bei weiblichen Mäusen hingegen kann eine Degeneration des olfaktorischen Epithels bereits zu einem frühen Expositionszeitpunkt aufgetreten sein, allerdings ist am Ende der Expositionszeit eine Regeneration des olfaktorischen Epithels möglich. Hinweise auf eine solche Regeneration zeigen sich in den eosinophilen Veränderungen. Die Mortalität der männlichen Mäuse, laut Autoren aufgrund von Nephrotoxizität verursacht, ist im Einklang mit der erhöhten Sensitivität der männlichen Mäuse gegenüber Chloroform und eine daraus resultierende Nephrotoxizität (siehe [Abschnitt 3.2](#)) (ATSDR 1997).

In einer weiteren Inhalationsstudie wurden je acht männliche und weibliche BDF1-Mäuse gegen 0, 5, 30 oder 90 ml Chloroform/m<sup>3</sup> für sechs Stunden pro Tag an fünf Tagen pro Woche 13 Wochen lang exponiert. Zusätzlich wurden männliche Mäuse gegen 1 ml Chloroform/m<sup>3</sup> exponiert. Die Nase wurde bei dieser Studie nicht untersucht (Greim 1999; Templin et al. 1998). Die **NOAEC** für die **Leber** und **Niere** der **Maus** liegt bei **5 ml Chloroform/m<sup>3</sup>** aufgrund zentrilobulärer Schwellungen in der Leber sowie einer signifikanten Zunahme der Zellproliferation und einer Tubulusregeneration in der Nierenrinde der männlichen Tiere bei 30 ml Chloroform/m<sup>3</sup>.

Je 5–15 weibliche B6C3F1-Mäuse wurden sechs Stunden pro Tag für vier Tage, drei, sechs oder 13 Wochen an fünf oder sieben Tagen pro Woche gegen 0,3; 2; 10; 30 oder 90 ml Chloroform/m<sup>3</sup> exponiert. In [Tabelle 9](#) sind die Ergebnisse der 13-Wochen-Studie dargestellt (Greim 1999; Larson et al. 1996). Aus dieser Studie lässt sich für die **Leber** der **Maus** eine **NOAEC** von **2 ml Chloroform/m<sup>3</sup>** aufgrund der zunehmenden Schwellung und Vakuolisierung der zentrilobulären

Hepatozyten und der Nephropathie (vergrößerte Nuklei in den proximalen Tubuluszellen und signifikante Zunahme der Zellproliferation in der Niere) bei 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup> für die Maus ableiten. Die Nase blieb ohne Befund. Dies stellt einen Gegensatz zu der 13-Wochen-Studie an BDF1-Mäusen dar (Kasai et al. 2002), in der bei 12 ml Chloroform/m<sup>3</sup> bei beiden Geschlechtern Effekte an der Nase beschrieben wurden. Dieser Unterschied könnte mit einer höheren Empfindlichkeit der BDF1-Maus erklärt werden.

In einer 13-Wochen-Studie wurden weibliche und männliche F344-Ratten gegen 0, 2, 10, 30, 90 oder 300 ml Chloroform/m<sup>3</sup> für sechs Stunden pro Tag an sieben oder fünf Tagen pro Woche exponiert (Tabelle 10, Greim 1999; Templin et al. 1996). Für die Zellproliferation in der **Niere** ergab sich eine **NOAEC** von **10 ml Chloroform/m<sup>3</sup>**. Ab 2 ml/m<sup>3</sup> traten bei kontinuierlicher Exposition in der Nase leichte Schädigung der Bowmanschen Drüsen, respiratorische Metaplasie (von den Autoren als olfaktorische Metaplasie bezeichnet), Mineralisierung der basalen Lamina und generalisierte Atrophie der Ethmoturbinalien auf. Daher lässt sich für die **Nase** keine NOAEC, sondern nur eine **LOAEC** von **2 ml Chloroform/m<sup>3</sup>** für die **Ratte** ableiten.

### 5.2.1.3 104-Wochen-Studien

In einer Studie zur Kanzerogenität und chronischen Toxizität auf die Nieren wurden je 50 männliche F344-Ratten inhalativ für sechs Stunden am Tag an fünf Tagen pro Woche 104 Wochen lang exponiert. Weitere Gruppen wurden inhalativ und mittels Trinkwassergabe kombiniert gegen Chloroform exponiert. Die abgeschätzte Chloroformaufnahme durch Inhalation und Trinkwasseraufnahme ist in Tabelle 4 dargestellt. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen war das Körpergewicht aller exponierten Tiere vermindert. Der Trinkwasserverbrauch sank deutlich bei allen Tieren, die Chloroform mit dem Trinkwasser verabreicht bekamen. Die Mortalität war nicht unterschiedlich. Ausgewählte Inzidenzen von prä- und nichtneoplastischen Veränderungen (k. w. A.) sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tab. 4** Histopathologische Befunde in den Nieren von männlichen F344-Ratten nach zweijähriger Exposition gegen Chloroform (Nagano et al. 2006)

	Konzentration im Trinkwasser (mg/l)							
	0				1000			
Inhalationskonzentration (ml/m <sup>3</sup> )	0	25	50	100	0	25	50	100
Abgeschätzte Chloroformaufnahme (mg/kg KG und Tag)	0	20	39	78	45	73	93	135
Tierzahl	50	50	50	50	49	50	50	50
<b>Niere</b>								
Atypische tubuläre Hyperplasie	1	0	0	0	2	4	7 <sup>c)</sup>	15 <sup>a),b),c)</sup>
Zytoplasmatische Basophilie	0	3	7 <sup>a)</sup>	8 <sup>a)</sup>	9 <sup>a)</sup>	26 <sup>a),b),c)</sup>	35 <sup>a),b),c)</sup>	36 <sup>a),b),c)</sup>
Vergrößerter lumulärer Tubulus	0	3	11 <sup>a)</sup>	27 <sup>a)</sup>	28 <sup>a)</sup>	46 <sup>a),b),c)</sup>	48 <sup>a),b),c)</sup>	49 <sup>a),b),c)</sup>
Nukleare Vergrößerung im p. T.	0	0	6 <sup>a)</sup>	33 <sup>a)</sup>	0	34 <sup>a),b),c)</sup>	47 <sup>a),b),c)</sup>	50 <sup>a),b),c)</sup>
CPN Schweregrad +	7	21 <sup>a)</sup>	21 <sup>a)</sup>	30 <sup>a)</sup>	21 <sup>a)</sup>	2 <sup>a),b),c)</sup>	13 <sup>a),b),c)</sup>	17 <sup>a),b),c)</sup>
CPN Schweregrad 2+	16	15	16	10	11	1	2	1
CPN Schweregrad 3+	26	5	3	2	2	0	0	1

CPN: chronisch progressive Nephropathie; p. T.: proximaler Tubulus

a), b), c) jeweils statistisch signifikant mit  $p \leq 0,05$  nach dem Chi-Quadrat-Test

a) zur unbehandelten Kontrollgruppe

b) zur Inhalationskontrollgruppe

c) zu den nur per Inhalation behandelten Gruppen

Weiterhin zeigte sich bei den Gruppen der kombiniert behandelten Tiere eine hohe Inzidenz positiver Glukosebefunde im Urin (> 80 %), während die Tiere, die nur inhalativ oder oral behandelt wurden, eine geringere Inzidenz (< 15 %) aufwiesen (Nagano et al. 2006).

In einer Inhalationsstudie wurde Chloroform in Konzentrationen von 0, 5, 30 oder 90 ml/m<sup>3</sup> an je 50 männliche und weibliche BDF1-Mäuse und 0, 10, 30 oder 90 ml/m<sup>3</sup> an je 50 männliche und weibliche F344-Ratten für sechs Stunden pro Tag an fünf Tagen pro Woche 104 Wochen lang verabreicht (Yamamoto et al. 2002). Aufgrund der akuten Toxizität in den Vorstudien wurden für die Mäuse der 30- und der 90-ml/m<sup>3</sup>-Gruppe die Konzentrationen wie folgt schrittweise angepasst (siehe Tabelle 5).

**Tab. 5** Expositionsdesign bei Mäusen der 104-Wochen-Inhalationsstudie (Yamamoto et al. 2002)

	Konzentrationsgruppe	
	30 ml/m <sup>3</sup>	90 ml/m <sup>3</sup>
1. und 2. Woche	5 ml Chloroform/m <sup>3</sup>	5 ml Chloroform/m <sup>3</sup>
3. und 4. Woche	10 ml Chloroform/m <sup>3</sup>	10 ml Chloroform/m <sup>3</sup>
5. und 6. Woche	30 ml Chloroform/m <sup>3</sup>	30 ml Chloroform/m <sup>3</sup>
7. bis 104. Woche	30 ml Chloroform/m <sup>3</sup>	90 ml Chloroform/m <sup>3</sup>

Die Daten aus dieser Studie zur Kanzerogenität wurden bereits in der Publikation von Matsushima (1994) veröffentlicht und sind in Greim (1999) ausführlich dargestellt. In der neuen Publikation von Yamamoto (2002) wurden weitere Daten zu nichtneoplastischen Veränderungen in Leber und Niere sowie der klinischen Chemie und Urinanalyse veröffentlicht (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7).

**Tab. 6** Nicht-neoplastische Befunde in Niere und Leber bei Maus und Ratte nach 104-wöchiger Exposition gegen Chloroform (Yamamoto et al. 2002)

BDF1-Maus		Konzentration (ml/m <sup>3</sup> )			
		0	5	30	90
Tierzahl	♂	50	50	50	48
	♀	50	49	50	48
<b>Leber</b>					
Nekrosen zentral	♂	0	0	0	3
	♀	1	0	1	2
Nekrosen fokal	♂	1	2	6	2
	♀	0	0	2	3
Verfettung	♂	4	2	6	24**
	♀	0	0	0	6*
Veränderte Zellfoci	♂	10	1**	1**	5
	♀	0	1	2	6*
<b>Niere</b>					
Zellvergrößerungen im proximalen Tubulus	♂	0	3	43**	42**
	♀	0	0	0	4
Zytoplasmatische Basophilie					
+	♂	33	40	8**	9**
	♀	0	4	3	5*
2+	♂	7	1	36	34
	♀	0	0	0	2
3+	♂	0	0	2	0
	♀	0	0	0	0
Untypische tubuläre Hyperplasie	♂	0	0	11**	14**
	♀	0	0	0	0
Nekrose im proximalen Tubulus	♂	0	0	1	2
	♀	1	0	0	0

Tab. 6 (Fortsetzung)

F344-Ratte	Konzentration (ml/m <sup>3</sup> )				
	0	10	30	90	
Tierzahl	♂	50	50	50	50
	♀	50	49	50	49
<b>Leber</b>					
Veränderte Zellfoci	♂	11	16	16	18
	♀	15	9	20	26
<b>Niere</b>					
Zellvergrößerungen im proximalen Tubulus	♂	0	0	5*	32**
	♀	0	0	6*	34**
Ausdehnungen des tubulären Lumens	♂	0	0	9*	27**
	♀	0	0	5*	38**
<b>Chronische progressive Nephropathie</b>					
+	♂	3	11*	10**	17**
	♀	8	19**	27**	15**
2+	♂	6	10	24	14
	♀	15	7	5	3
3+	♂	19	15	8	2
	♀	14	3	3	1
4+	♂	19	8	2	1
	♀	4	2	0	2

\*p ≤ 0,05; \*\* ≤ 0,01 nach Chi-Quadrat-Test

Schweregrade zytoplasmatische Basophilie: +: wenige Läsionen in einzelnen Tubuli, 2+: mehr als vier Läsionen in zwei oder mehr Tubuli, 3+: zahlreiche Läsionen innerhalb der gesamten Sektion

Schweregrad Nephropathie: +: leicht, 2+: mäßig, 3+: deutlich, 4+: schwer

Weiterhin erhielt die Kommission für die histopathologischen Befunde der Nasenhöhle eine persönliche Mitteilung der Autoren (Nagano und Matsumoto 2019). Eine Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde für die Effekte an der Nase von den Autoren nicht vorgenommen (siehe Tabelle 8).

Bei **Mäusen** war nach 104 Wochen ab 5 ml Chloroform/m<sup>3</sup> die alkalische Phosphatase (ALP) im Serum signifikant erhöht, was auf eine beginnende Schädigung der Leber hindeuten könnte. Bei 90 ml Chloroform/m<sup>3</sup> waren bei männlichen und weiblichen Mäusen statistisch signifikant erhöhte Inzidenzen für Verfettung und bei weiblichen Mäusen die für veränderte Zellfoci zu erkennen. Die männlichen Mäuse zeigten in der Niere ab 5 ml/m<sup>3</sup> beginnend und ab 30 ml/m<sup>3</sup> statistisch signifikant erhöhte Zellvergrößerungen im proximalen Tubulus. Ab 30 ml/m<sup>3</sup> ließen sich zudem untypische tubuläre Hyperplasien bei den männlichen Tieren beobachten. Ab 30 ml Chloroform/m<sup>3</sup> nahm der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Wert der männlichen Mäuse ab, was auf eine Beeinträchtigung der Nieren hinweist.

Bei männlichen und weiblichen Mäusen kam es mit hoher Inzidenz zu leichten respiratorischen Metaplasien des olfaktorischen Epithels (43 % der untersuchten Tiere) und leichten Verdickungen der Knochen (75 % der untersuchten Tiere) ab 5 ml Chloroform/m<sup>3</sup>. Beim Vergleich mit der nächsten Konzentrationsgruppe (30 ml Chloroform/m<sup>3</sup>) zeigte sich bei der männlichen Maus für die Wirkung auf das olfaktorische Epithel eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die Verdickung der Knochen bei männlichen Mäusen und alle Effekte in der Nase weiblicher Mäuse waren bei 30 ml Chloroform/m<sup>3</sup> von geringerer Inzidenz im Vergleich zur Konzentrationsgruppe von 5 ml/m<sup>3</sup>.

**Tab. 7** Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung und der Urinanalyse bei Mäusen und Ratten nach 104-wöchiger Exposition gegen Chloroform (Yamamoto et al. 2002)

BDF1-Maus		Konzentration (ml/m <sup>3</sup> )			
		0	5	30	90
Tierzahl	♂	33	38	36	35
	♀	28	34	24	24
<b>Klinische Chemie</b>					
Gesamtprotein (g/dl)	♂	5,6	5,8	5,9	6,1**
	♀	5,5	5,5	5,6	6,0
Triglyceride (mg/dl)	♂	83	82	101	80
	♀	82	72	81	58**
BUN (mg/dl)	♂	25,8	22,5	26,3*	30,8**
	♀	17,2	21,4	19,3	21,4**
GOT (IU/l)	♂	85	58	115	111*
	♀	144	148	125	175*
GPT (IU/l)	♂	29	16	40	44**
	♀	28	47	39	50**
ALP (IU/l)	♂	171	184*	219**	205**
	♀	264	322	235	303
F344-Ratte		Konzentration (ml/m <sup>3</sup> )			
		0	10	30	90
Tierzahl	♂	27	39	36	38
	♀	37	35	40	34
<b>Klinische Chemie</b>					
Gesamtprotein (g/dl)	♂	6,7	7,1	7,0	6,9
	♀	7,0	7,4*	7,3	7,2
Gesamtcholesterol (mg/dl)	♂	173	164	153	125**
	♀	142	131	135	149
Triglyceride (mg/dl)	♂	222	167	146*	87**
	♀	191	126	109	94**
Phospholipide (mg/dl)	♂	289	268	241*	196**
	♀	280	252	255	271
Kreatinin (mg/dl)	♂	0,9	0,6	0,6**	0,7**
	♀	0,5	0,5	0,5	0,5
BUN (mg/d/l)	♂	28,6	20,6**	18,3**	23,2**
	♀	17,9	18,5	18,5	18,6
GOT (IU/l)	♂	67	79	81	98*
	♀	128	113	124	144
GPT (IU/l)	♂	21	25*	24	26*
	♀	37	40	39	48
Gamma-GT (IU/l)	♂	4	8*	10**	7*
	♀	4	4	5	6**
LDH (IU/l)	♂	164	239	179	311
	♀	297	245	239*	344
<b>Urinanalyse</b>					
Glukose <sup>a)</sup>	♂	0/27	0/39	2/37	29/39**
	♀	2/41	8/37*	29/41**	24/34**

\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01 mit dem Dunnett-Test für klinische Chemie und Chi-Quadrat-Test für die Urinanalyse

<sup>a)</sup> Anzahl der Tiere mit positivem Glukosetest/Gesamtzahl der untersuchten Tiere

ALP: Alkalische Phosphatase; BUN: Blut-Harnstoff-Stickstoff; Gamma-GT: Gamma-Glutamyltransferase; GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase; LDH: Laktatdehydrogenase



**Tab. 8** Nicht-neoplastische Veränderungen der Nasenhöhle bei Maus und Ratte nach 104-wöchiger Exposition gegen Chloroform (Nagano und Matsumoto 2019)

BDF1-Maus		Konzentration (ml/m <sup>3</sup> )			
		0	5	30	90
Tierzahl	♂	50	50	50	48
	♀	50	49	50	48
<b>Nasenhöhle</b>					
Verdickung der Knochen					
leicht	♂	0	49	37	41
	♀	0	37	32	33
mäßig	♂	0	0	0	1
	♀	0	0	0	1
deutlich	♂	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0
schwer	♂	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0
<b>Respiratorische Metaplasie des o.E.</b>					
leicht	♂	12	15	20	21
	♀	4	21	14	25
mäßig	♂	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0
deutlich	♂	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0
schwer	♂	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0
<b>F344-Ratte</b>		<b>Konzentration (ml/m<sup>3</sup>)</b>			
		<b>0</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>90</b>
Tierzahl	♂	50	50	50	50
	♀	50	49	50	49
<b>Nasenhöhle</b>					
Verdickung der Knochen					
leicht	♂	0	35	44	33
	♀	0	39	40	25
mäßig	♂	0	0	0	5
	♀	0	0	3	3
deutlich	♂	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0
schwer	♂	0	0	0	0
	♀	0	0	0	0
<b>Respiratorische Metaplasie des o.E.</b>					
leicht	♂	0	29	19	8
	♀	0	29	27	15
mäßig	♂	0	11	22	16
	♀	0	14	10	11
deutlich	♂	0	2	7	19
	♀	0	0	10	17
schwer	♂	0	0	2	0
	♀	0	0	1	1

keine Signifikanzberechnung angegeben

o.E.: olfaktorisches Epithel

Die Leber der weiblichen und männlichen **Ratten** zeigte keine statistisch signifikante Veränderung. Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase und die Gamma-Glutamyltransferase waren signifikant erhöht, jedoch ohne klare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Aufgrund der hohen Anzahl lebergeschädigter Tiere der Kontrollgruppe waren die Lebereffekte im unteren Konzentrationsbereich schwer zu bewerten und fraglich substanzbedingt. Bei weiblichen Ratten war Glukose im Urin ab 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup> erhöht, was auf eine verringerte Aufnahme von Glukose über die Nierentubuli und somit auf eine Schädigung der Nieren hindeutete. Bei beiden Geschlechtern zeigte sich die rattentypische chronische progressive Nephropathie (CPN) ab 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup>. Dieser Effekt ist für die Bewertung nicht bedeutsam, da er nicht als humanrelevant angesehen wird (Hard et al. 2009). Ab 30 ml Chloroform/m<sup>3</sup> waren bei weiblichen und männlichen Ratten eine signifikante Zunahme der Zellvergrößerung im proximalen Tubulus und eine Ausdehnung des tubulären Lumens zu erkennen. Bei den Kontrolltieren traten diese Effekte nicht auf.

Die Nasen der Ratten der Kontrollgruppen waren ohne Befund. Im Gegensatz dazu kam es schon ab 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup> bei beiden Geschlechtern mit hoher Inzidenz zu einer leichten Verdickung der Knochen sowie einer respiratorischen Metaplasie des olfaktorischen Epithels (Nagano und Matsumoto 2019; Yamamoto et al. 2002).

Der empfindlichste Endpunkt dieser **104-Wochen-Studie** ist bei Ratte und Maus die **Nase** aufgrund leichter respiratorischer Metaplasien des olfaktorischen Epithels und leichter Verdickungen der Knochen mit hoher Inzidenz. Da diese Effekte bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration auftraten, ist für beide Spezies keine NOAEC, sondern nur eine LOAEC ableitbar. Für die **Ratte** ergibt sich damit eine **LOAEC von 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup>** und für die **Maus** eine **LOAEC von 5 ml Chloroform/m<sup>3</sup>**.

Auffallend ist bei Ratte und Maus, dass die Knochenverdickung in der Nase bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration mit einer hohen Inzidenz auftritt, ihr Schweregrad jedoch mit steigender Konzentration nicht zunimmt. Der Pathomechanismus der Knochenverdickung lässt sich über eine Degeneration der Bowmanschen Drüsen, welche zu einer Irritation des Periosts führt, und nachfolgender Proliferation der Knochenzellen erklären. Für die Ratte ist beschrieben, dass diese für Schädigungen an den Bowmanschen Drüsen besonders empfindlich ist (siehe [Abschnitt 3.2](#)). Daraus folgt, dass die Verdickung der Knochen einen Effekt darstellt, für den die Ratte im Vergleich zum Menschen besonders empfindlich ist.

Die respiratorische Metaplasie, die über eine Degeneration der Bowmanschen Drüsen, aber auch allein durch eine Reizwirkung ausgelöst werden kann, ist bei der Maus ohne Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Bei der Ratte nimmt der Schweregrad mit der Konzentration zu.

#### 5.2.1.4 Gesamtfazit

Die relevanten Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen von Leber, Niere und Nase nach inhalativer 13- bzw. 104-wöchiger Chloroformexposition von Maus und Ratte sind in den [Tabellen 9](#) und [10](#) gegenübergestellt. In diesen Studien ergibt sich bei beiden Spezies als sensitivstes Organ die Nase. Für die **Ratte** lässt sich nach 13-wöchiger Exposition eine LOAEC von 2 ml Chloroform/m<sup>3</sup> ableiten (Templin et al. 1996). Bei den Effekten handelt es sich um eine leichte Schädigung der Bowmanschen Drüsen, respiratorische Metaplasie im olfaktorischen Epithel, Mineralisierung der basalen Lamina und generalisierte Atrophie der Ethmoturbinalien. Bei der Bewertung dieser Befunde ist zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um eine kontinuierliche Exposition handelt, wobei die Tiere keine Zeit hatten, sich zu erholen. Ein Vergleich zwischen Studien mit einem 5-Tage-pro-Woche-Rhythmus und mit einem 7-Tage-pro-Woche-Rhythmus lässt erkennen, dass bei kontinuierlicher Exposition die Effekte immer stärker waren. Studien mit einem für den Arbeitsplatz relevanteren Expositionsrythmus von fünf Tagen pro Woche sind deshalb besser geeignet für die Ableitung eines Arbeitsplatzgrenzwertes. Ebenso ist die 2-Jahre-Studie an der **Ratte** mit einer **LOAEC von 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup>** bzw. bei der **Maus** mit einer **LOAEC von 5 ml Chloroform/m<sup>3</sup>** relevant (Yamamoto et al. 2002). In dieser traten respiratorische Metaplasie und Knochenverdickung in der Nase von Ratten und Mäusen auf. Dabei ist die respiratorische Metaplasie für die Bewertung relevanter, da der Mensch für die Verdickung der Knochen wohl weniger sensitiv ist ([Abschnitt 3.2](#)). Für die Ratte ist die Metaplasie aufgrund einer erkennbaren Konzentrations-Wirkungs-Beziehung plausibler als für die Maus.

**Tab. 9** Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung der Leber, Niere und Nase bei der Maus nach 13- und 104-wöchiger inhalativer Exposition gegen Chloroform

Konzentration	Dauer Tierstamm Literatur			
	13 Wochen, 5 d/Wo B6C3F1-Maus Larson et al. 1996	13 Wochen, 7 d/Wo B6C3F1-Maus Larson et al. 1996	13 Wochen, 5 d/Wo BDF1-Maus Kasai et al. 2002	104 Wochen, 5 d/Wo BDF1-Maus Nagano und Matsumoto 2019 <sup>a</sup> ), Yamamoto et al. 2002
0 ml/m <sup>3</sup>	<b>Leber:</b> Schwellung u. Vakuolisierung der zentrilobulären Hepatozyten (♀ 1/15, S: 1,0; ♂ 5/15, S: 1,0), <b>Niere:</b> o.B., <b>Nase:</b> o.B.	<b>Leber:</b> Schwellung u. Vakuolisierung der zentrilobulären Hepatozyten (♀ 1/15, S: 1,0; ♂ 5/15, S: 1,08), <b>Niere:</b> o.B., <b>Nase:</b> o.B.	<b>Leber, Niere, Nase:</b> o.B.	<b>Leber:</b> ♀ zentrale Nekrose (1/50), ♂ Verfettung (4/50), veränderte Zellfoci (10/50), fokale Nekrosen (1/50), <b>Niere:</b> ♀ tubuläre Nekrose (1/50), ♂ zytoplasmatische Basophilie (40/50), <b>Nase:</b> ♀ leichte resp. Metaplasie des o.E. (4/50), ♂ leichte resp. Metaplasie des o.E. (12/50)
0,3 ml/m <sup>3</sup>	n. u.	<b>Leber:</b> Schwellung u. Vakuolisierung der zentrilobulären Hepatozyten (♀ 1/15, S: 1,0; ♂ 4/15, S: 1,5)	n. u.	n. u.
2 ml/m <sup>3</sup>	n. u.	<b>Leber:</b> NOAEC, Schwellung u. Vakuolisierung der zentrilobulären Hepatozyten (♀ 5/14, S: 1,4; ♂ 5/14, S: 1,0), <b>Niere:</b> o.B., <b>Nase:</b> o.B.	n. u.	n. u.
5 ml/m <sup>3</sup>	n. u.	n. u.	n. u.	<b>Leber:</b> NOAEC, ♀ veränderte Zellfoci (1/49), ♂ Verfettung (2/50), veränderte Zellfoci (1/50), fokale Nekrosen (2/50), <b>Niere:</b> NOAEC, zytoplasmatische Basophilie (♀ 4/49; ♂ 41/50), ♂ Zellvergrößerung im proximalen Tubulus (3/50), <b>Nase:</b> LOAEC, leichte resp. Metaplasie des o.E. (♀ 21/49; ♂ 15/50), leichte Verdickung der Knochen (♀ 37/49; ♂ 49/50)

Tab. 9 (Fortsetzung)

Konzentration	Dauer Tierstamm Literatur			
	13 Wochen, 5 d/Wo B6C3F1-Maus Larson et al. 1996	13 Wochen, 7 d/Wo B6C3F1-Maus Larson et al. 1996	13 Wochen, 5 d/Wo BDF1-Maus Kasai et al. 2002	104 Wochen, 5 d/Wo BDF1-Maus Nagano und Matsumoto 2019 <sup>a)</sup> , Yamamoto et al. 2002
10 ml/m <sup>3</sup> bzw. 12 ml/m <sup>3</sup> (Kasai et al. 2002)	<b>Leber:</b> LOAEC, Schwellung u. Vakuolisierung der zentrilobulären Hepatozyten (♀ 2/13, S: 1,0; ♂ 4/13, S: 1,5), <b>Niere:</b> LOAEC, ♂ Nephropathie (1/13, S: 1,0), vergrößerte Nuklei in PCT, sig. ↑ Zellproliferation in C (LI: 7,6 ± 3,0; Kontrolle: 1,6 ± 0,6) und M (LI: 1,6 ± 0,8; Kontrolle: 0,8 ± 0,3), <b>Nase:</b> o.B.	<b>Leber:</b> Schwellung u. Vakuolisierung der zentrilobulären Hepatozyten (♀ 4/14, S: 2,0; ♂ 5/15, S: 1,0), <b>Niere:</b> ♂ vergrößerte Nuklei in PCT, <b>Nase:</b> o.B.	<b>Leber:</b> o.B., <b>Niere:</b> LOAEC, sig. tubuläre Nekrose (♂ 7/10), Degeneration (♂ 2/10), sig. zytoplasmatische Basophilie (♂ 8/10), <b>Nase:</b> LOAEC, Degeneration des o.E. (♂ 2/10), sig. Vergrößerung des Knochens (♂ 7/10; ♀ 7/10), sig. eosinophile Veränderungen des o.E. (♀ 7/10) bzw. des r.E. (♀ 8/10)	n. u.
25 ml/m <sup>3</sup> (Kasai et al. 2002) bzw. 30 ml/m <sup>3</sup>	n. u.	<b>Leber:</b> ♀ Schwellung u. Vakuolisierung der zentrilobulären Hepatozyten (10/15, S: 1,2), ♂ wie ♀ (12/12, S: 1,2), <b>Niere:</b> ♂ Nephropathie (11/12, S: 1,0), vergrößerte Nuklei in PCT, sig. ↑ Zellproliferation in C (LI: 2,4 ± 1,2; Kontrolle: 0,8 ± 0,3), <b>Nase:</b> o.B.	<b>Leber:</b> o.B., <b>Niere:</b> sig. tubuläre Nekrose (♂ 10/10), sig. Degeneration (♂ 9/10), zytoplasmatische Basophilie (♂ 1/10), <b>Nase:</b> sig. Degenerierung des o.E. (♂ 5/10), Vergrößerung des Knochens (♂ 1/10; sig. ♀ 10/10), sig. eosinophile Veränderungen des o.E. (♀ 9/10) bzw. des r.E. (♀ 8/10)	<b>Leber:</b> ♀ zentrale u. fokale Nekrose (1/50 bzw. 2/50), veränderte Zellfoci (2/50), ♂ Verfettung (6/50), veränderte Zellfoci (1/50), fokale Nekrosen (6/50), <b>Niere:</b> zytoplasmatische Basophilie (♀ 3/50; ♂ 46/50), ♂ sig. ↑ Zellvergrößerung im proximalen Tubulus (43/50), sig. ↑ untypische tubuläre Hyperplasie (11/50), tubuläre Nekrose (1/50), <b>Nase:</b> leichte resp. Metaplasie des o. E. (♀ 14/50; ♂ 20/50), leichte Verdickung der Knochen (♀ 32/50; ♂ 37/50)

<sup>a)</sup> keine Signifikanzberechnung in Publikation angegeben

C: Cortex; LI: Labeling Index; M: Medulla; n. u.: nicht untersucht; o.B.: ohne Befund; o.E.: olfaktorisches Epithel; PCT: proximale Tubuluszellen in der Nierenrinde; r.E.: respiratorisches Epithel; resp.: respiratorisch; S: Schweregrad mit 1: minimal, 2: leicht, 3: mäßig, 4: schwer; sig.: signifikant

**Tab. 10** Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung der Leber, Niere und Nase bei der Ratte nach 13- und 104-wöchiger Exposition gegen Chloroform

Konzentration	Dauer Tierstamm Literaturquelle			
	13 Wochen, 5 d/Wo F344-Ratte Templin et al. 1996	13 Wochen, 7 d/Wo F344-Ratte Templin et al. 1996	13 Wochen, 5 d/Wo F344-Ratten Kasai et al. 2002	104 Wochen, 5 d/Wo F344 Ratte Nagano und Matsumoto 2019 <sup>a)</sup> ; Yamamoto et al. 2002
0 ml/m <sup>3</sup>	<b>Leber:</b> Schädigung (♀ S <sup>b)</sup> : 0,1; 1/15; ♂ S <sup>b)</sup> : 0,1; 1/15), <b>Niere:</b> Schädigung (♀ S <sup>b)</sup> : 0,4; 6/14; ♂ S <sup>b)</sup> : 0,6; 8/14), <b>Nase:</b> o.B.	<b>Leber:</b> Schädigung (♀ S <sup>b)</sup> : 0,1; 1/15; ♂ S <sup>b)</sup> : 0,1; 1/15), <b>Niere:</b> Schädigung (♀ S <sup>b)</sup> : 0,4; 6/14; ♂ S <sup>b)</sup> : 0,6; 8/14), <b>Nase:</b> o.B.	<b>Leber, Niere, Nase:</b> o. B.	<b>Leber:</b> veränderte Zellfoci (♀ 15/50; ♂ 11/50), <b>Niere:</b> o. B. <sup>c)</sup> , <b>Nase:</b> o. B.
2 ml/m <sup>3</sup>	n. u.	<b>Leber:</b> Schädigung (♀ S <sup>b)</sup> : 0,1; 1/15; ♂ S <sup>b)</sup> : 0,2; 3/15), <b>Niere:</b> Schädigung (♀ S <sup>b)</sup> : 0,7; 10/15; ♂ S <sup>b)</sup> : 0,8; 10/15), <b>Nase:</b> LOAEC, Schädigung (♂ S <sup>b)</sup> : 1,1; 10/10), ♀ wie ♂ (k. w. A.)	n. u.	n. u.
10 ml/m <sup>3</sup>	n. u.	<b>Leber:</b> o. B., <b>Niere:</b> NOAEC, Schädigung (♀ S <sup>b)</sup> : 0,7; 10/15; ♂ S <sup>b)</sup> : 0,5; 7/15), <b>Nase:</b> Schädigung (♂ S <sup>b)</sup> : 2,0; 10/10), ↑ Zellproliferation* (ULLI: 4-fach über Kontrolle), ♀ wie ♂ (k. w. A.)	n. u.	<b>Leber:</b> veränderte Zellfoci (♀ 9/49; ♂ 16/50), <b>Niere:</b> NOAEC, <b>Nase:</b> LOAEC, leichte Verdickung der Knochen (♀ 39/49, ♂ 35/50), resp. Metaplasie des o. E. (♀ leicht 29/49, mäßig 14/49; ♂ leicht 29/50, mäßig 11/50, deutlich 2/50)
25 ml/m <sup>3</sup> (Kasai et al. 2002) bzw. 30 ml/m <sup>3</sup>	<b>Leber:</b> o. B., <b>Niere:</b> LOAEC, ♀ Schädigung (S <sup>b)</sup> : 1,8; 13/13), ↑ nicht sig. Zellproliferation in C (LI: 2-fach über Kontrolle), ♂ Schädigung (S <sup>b)</sup> : 0,1; 2/15), <b>Nase:</b> LOAEC, ♂ Schädigung (S <sup>b)</sup> : 1,8; 8/8) ↑ Zellproliferation* (ULLI: 2-fach über Kontrolle), ♀ wie ♂ (k. w. A.)	<b>Leber:</b> Schädigung (♂ S <sup>b)</sup> : 0,1; 2/15), <b>Niere:</b> Schädigung (♀ S <sup>b)</sup> : 0,8; 12/15, ♂ S <sup>b)</sup> : 0,6; 9/14), ↑ Zellproliferation* in C (♀ LI: 3-fach über Kontrolle; ♂ LI: 2-fach über Kontrolle), <b>Nase:</b> Schädigung (♂ S <sup>b)</sup> : 2,0; 10/10), ↑ Zellproliferation* (ULLI: 4-fach über Kontrolle), ♀ wie ♂ (k. w. A.)	<b>Leber:</b> o. B., <b>Niere:</b> o. B., <b>Nase:</b> LOAEC, sig. Mineralisierung (♀ 10/10 <sup>**</sup> ; ♂ 10/10 <sup>**</sup> ), sig. Atrophie des o. E. (♀ 10/10 <sup>**</sup> ; ♂ 7/10 <sup>**</sup> )	<b>Leber:</b> veränderte Zellfoci (♀ 20/50; ♂ 16/50), <b>Niere:</b> ♀ Zellvergrößerung im proximalen Tubulus (♀ 6/50 <sup>*</sup> ; ♂ 5/50 <sup>*</sup> ), Ausdehnung des tubulären Lumens (♀ 5/50 <sup>*</sup> ; ♂ 9/50 <sup>*</sup> ), <b>Nase:</b> Verdickung der Knochen (♀ leicht 40/50, mäßig 3/50; ♂ leicht 44/50), resp. Metaplasie des o. E. (♀ leicht 27/50, mäßig 10/50, deutlich 10/50, schwer 1/50; ♂ leicht 19/50, mäßig 22/50, deutlich 7/50, schwer 2/50)

\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01

<sup>a)</sup> keine Signifikanzberechnung in Publikation angegeben<sup>b)</sup> Mittelwert über die ganze Gruppe betroffener Tiere. **Niere:** Vakuolisierungen der proximalen Tubulusepithelzellen, vergrößerte proximale Tubuluszellkerne, pyknotische (verdichtete) proximale Tubuluszellkerne sowie vereinzelt Tubuluszellnekrosen; **Leber:** Vakuolisierung der Hepatozyten, degenerative Veränderungen in den Hepatozyten und Nekrose der Hepatozyten; **Nase:** Schädigung der Bowmanschen Drüsen von Ödemen bis zum Verlust der Drüse, olfaktorische Metaplasie, Mineralisierung der basalen Lamina, generalisierte Atrophie der Ethmoturbinalien<sup>c)</sup> ohne Befund mit Ausnahme der nicht humanrelevanten chronischen progressiven Nephropathie

C: Cortex; LI: Labeling Index; n. u.: nicht untersucht; o. B.: ohne Befund; resp.: respiratorisch; S: Schweregrad der Schädigung mit 0: innerhalb der üblichen Grenzen, 1: minimal, 2: leicht, 3: mäßig, 4: schwer; sig.: statistisch signifikant; ULLI: unit length labeling index

### 5.2.2 Orale Aufnahme

Die Wirkung von Chloroform nach oraler Gabe ist in Greim (1999) ausführlich dargestellt. Bei Ratten wurde ein NOAEL von 3,5 mg/kg KG und Tag nach 3-wöchiger Applikation von Chloroform mit dem Trinkwasser ermittelt, bei Mäusen einer von 10 mg/kg KG und Tag per Schlundsondengabe. Für die Beurteilung der Ergebnisse der Inhalationsexperimente ist es von Bedeutung, dass bei der Ratte nach Verabreichung von 34 mg Chloroform/kg KG und Tag per Schlundsonde Nasenläsionen beobachtet wurden (Greim 1999; Larson et al. 1995). Es liegen keine neuen relevanten Daten vor.

## 5.3 Wirkung auf Haut und Schleimhäute

### 5.3.1 Haut

Chloroform wirkt irritierend an der Haut von Kaninchen (Greim 1999). Es liegen keine neuen relevanten Daten vor.

### 5.3.2 Auge

Chloroform wirkt irritierend am Kaninchenauge (Greim 1999). Es liegen keine neuen relevanten Daten vor.

### 5.3.3 Allergene Wirkung

Im Datenbestand der ECHA ist ein negativer Local Lymph Node Assay (LLNA) an weiblichen CBA/J-Mäusen mit einer 10%igen Zubereitung in Aceton/Olivenöl (4:1) aufgeführt. Der für diese Konzentration ermittelte Stimulationsindex betrug 2,48 (ECHA 2019).

Der ebenfalls im ECHA-Datenbestand aufgeführte Maximierungstest ist für die Bewertung nicht heranziehbar, da bei den fünf zur intradermalen und topischen Induktion mit unverdünntem Chloroform behandelten Tieren und den drei Kontrolltieren gleichartige Reaktionen beobachtet wurden (ECHA 2019).

Mit einem Chloroform/Methanol-Gemisch (2:1) wurde in einer älteren Untersuchung mit dem LLNA ein positives Resultat erzielt. Nach dreimaliger Applikation des unverdünnten Gemisches wurden in zwei Experimenten Stimulationsindices in Höhe von 8,5 bzw. 10,2 ermittelt. In dieser Untersuchung wurden aber auch mit mehreren anderen irritativen Stoffen (z. B. Oxalsäure und Natriumdodecylsulfat) positive Ergebnisse erzielt (Montelius et al. 1994).

## 5.4 Reproduktionstoxizität

### 5.4.1 Fertilität

Eine Multigenerationenstudie an ICR-Mäusen mit oraler Chloroformgabe ist ausführlich im Nachtrag von 1999 (Greim 1999) beschrieben. In der höchsten Dosisgruppe von 5 mg Chloroform/ml Trinkwasser (entspricht 1000 mg Chloroform/kg KG und Tag bei 6 ml Trinkwasserverbrauch pro Tag und 30 g KG) traten bei allen F1- und F2-Tieren statistisch signifikante Effekte auf die Fortpflanzung, wie Reduktion der Fertilität, Wurfgröße sowie Gestations- und Lebensfähigkeit, auf. Gleichzeitig war die Mortalität erhöht und die Körpergewichtsentwicklung verzögert (WHO 1994).

Zur Fertilität sind drei weitere Studien verfügbar, die bislang noch nicht in den verschiedenen Nachträgen enthalten sind und deshalb im Folgenden dargestellt werden.

In einer Studie mit kontinuierlicher Verpaarung erhielten männliche und weibliche CD-1 Mäuse (20 Paare pro Dosisgruppe, 40 Paare in der Kontrollgruppe) mittels Schlundsonde 6,6; 16 oder 41 mg Chloroform/kg KG und Tag. Als Lösungsmittel und Kontrollsubstanz diente Maiskeimöl. Die F0-Tiere wurden täglich für insgesamt 18 Wochen exponiert (eine Woche vor der Verpaarung, 14 Wochen Verpaarungszeit und drei Wochen nach der Verpaarung). Die F0-Tiere wurden auf klinische Zeichen, Körpergewicht, Trinkwasserverbrauch, Fertilität (Anzahl der Nachkom-

men generierenden Paare/Anzahl der Zuchtpaare), Wurfgröße, Lebendtiere pro Wurf und Verteilung der überlebenden Nachkommen untersucht, die Nachkommen auf Geschlecht und Gewicht unmittelbar nach der Geburt. In der F1-Generation wurden nur die Tiere der Kontrollgruppe und der höchsten Dosisgruppe so weiter behandelt wie ihre Eltern. Die Dosierung der F1-Tiere startete am Postnataltag 22, nachdem der letzte Wurf geboren und die Tiere entwöhnt waren. Die männlichen und weiblichen F1-Tiere verschiedener Würfe derselben Behandlungsgruppe wurden für sieben Tage verpaart. Die Tiere der F1-Generation wurden auf die gleichen Endpunkte der Fertilität untersucht wie die F0-Tiere. Nach der Geburt wurden die Tiere der F1-Generation getötet und auf Organgewichte, Körpergewicht, Spermienmotilität der Nebenhoden, Spermienmorphologie, Spermiengehalt und Estruszyklus untersucht. Weiterhin wurde eine pathologische Untersuchung von Hoden, Nebenhoden, Eierstöcken sowie von Leber, Lunge, Niere und der Schilddrüse durchgeführt. In der F0-Generation ließ sich kein substanzbedingter Effekt beobachten. Bei den F1-Tieren, die Chloroform erhielten, traten folgende Befunde auf: Bei den weiblichen Tieren nahm das Körpergewicht ab der 31. Woche signifikant stärker zu, Fertilitätsindex, Anzahl der weiblichen Nachkommen pro Wurf und gesamte Wurfgröße waren statistisch signifikant erhöht. Bei weiblichen Tieren waren die absoluten und relativen Lebergewichte statistisch signifikant erhöht und es ließen sich akzentuierte lobuläre Musterungen in der Leber bei 13 Tieren (1 Kontrolltier) erkennen. Es kam bei allen weiblichen Tieren zu zentrilobulären Degenerationen der Hepatozyten. Bei den männlichen Tieren waren eine statistisch signifikante Zunahme des Gewichtes des rechten Nebenhodens (absolut und relativ) festzustellen und bei 8 von 20 Tieren (3 von 20 Tieren der Kontrollgruppe) minimale bis leichte vakuoläre Degenerationen im Epithel des Nebenhodengangs. Der NOAEL für Fertilität liegt bei 41 mg/kg KG und Tag, der höchsten Dosis (NTP 1988).

In einer modifizierten Multigenerationenstudie an zehn männlichen und 30 weiblichen ICR-Swiss-Mäusen wurde Chloroform in Konzentrationen von 0,1; 1 oder 5 mg/ml Trinkwasser verabreicht. Nach 35 Tagen wurden je eine männliche F0-Maus mit je drei weiblichen F0-Mäusen für sieben Tage verpaart. Zwei Wochen nach Entwöhnung der F1a-Nachkommen wurden die F0-Mäuse zur Generierung der F1b-Generation verpaart. Die Generierung der F1c-Generation wurde nach demselben Schema durchgeführt. Zusätzlich wurden für eine integrierte Teratogenitätsstudie weibliche Mäuse der F1b- und F0-Generation mit unbehandelten männlichen Mäusen zur Gewinnung der F2-Generation verpaart. Mit Ausnahme der F1b-Generation wurde bei allen Nachkommen sowie bei allen adulten Tieren nach der Entwöhnung eine Nekropsie durchgeführt. Bei der Hochdosisgruppe der F0- und F1b-Generation bestand eine signifikante maternale Toxizität. Effekte auf die Fertilität, die Wurfgröße, den Gestationsindex und das postnatale Überleben waren nur in der höchsten Dosisgruppe bei gleichzeitig auftretender maternaler Toxizität zu beobachten. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Effekte in der Teratogenitätsstudie (Borzelleca und Carchman 1982). In der nicht nach gültigen Standards durchgeführten Studie sind erhebliche Mängel bei Methoden- und Ergebnisdarstellung vorhanden.

Jeweils fünf (C57B1/C3H)F1-Mäuse wurden inhalativ für je vier Stunden an fünf Tagen gegen 0, 400 oder 800 ml Chloroform/m<sup>3</sup> exponiert. Die Morphologie der Nebenhodenspermien wurde 28 Tage nach der Exposition untersucht. Die Anzahl der abnormalen Spermien war mit  $3,48 \pm 0,66$  bzw.  $2,76 \pm 0,31$  nach Chloroforminhalation statistisch signifikant erhöht (Land et al. 1981). Die Anzahl der Spermien sowie der Anteil beweglicher Spermien wurden nicht ermittelt. Daher wird die Studie nicht zur Bewertung herangezogen.

**Fazit:** Effekte auf die Fertilität traten nur bei hohen Dosierungen von ca. 1000 mg Chloroform/kg KG und Tag bei gleichzeitiger Maternaltoxizität auf.

#### 5.4.2 Entwicklungstoxizität

Studien zur Entwicklungstoxizität sind ausführlich im Sammelkapitel MAK-Werte und Schwangerschaft von 1989 (Henschler 1989) sowie im Nachtrag von 1999 (Greim 1999) beschrieben. Neue Informationen liegen nicht vor.

In zwei pränatalen Entwicklungstoxizitätsstudien (eine davon nach OECD-Prüfrichtlinie 414) mit inhalativer Ganzkörperexposition an Wistar-Ratten hatte Chloroform bei bzw. ab 30 ml/m<sup>3</sup> Retardierungen in Form von verringertem Körpergewicht und reduzierter Scheitel-Steiß-Länge zur Folge. Gleichzeitig trat bereits Maternaltoxizität wie erniedrigte Körpergewichtszunahme sowie reduzierte Futteraufnahme auf. Die NOAEC für Entwicklungstoxizität

betrug  $10 \text{ ml/m}^3$  (Hoechst AG 1988, 1990 a, b). Die NOAEC für Entwicklungstoxizität von  $10 \text{ ml/m}^3$  wurde anhand der Originalstudien bestätigt.

Bei einem anderen Rattenstamm (Sprague Dawley) kam es in einer validen Studie mit inhalativer Ganzkörperexposition bei  $100 \text{ ml/m}^3$  zu externen Fehlbildungen, wie verkürzte oder fehlende Schwänze und nicht angelegte Anusöffnungen, und skelettalen Fehlbildungen (fehlende Rippen) in drei Würfen. Die NOAEC für diese Effekte lag bei  $30 \text{ ml/m}^3$  (Schwetz et al. 1974). Diese Studie wird als valide angesehen. Bei den Feten wurden bei  $30 \text{ ml/m}^3$  ein erniedrigtes Körpergewicht/Wurf und eine leicht verkürzte Scheitel-Steiß-Länge festgestellt, wobei beide Effekte nicht konzentrationsabhängig auftraten. Die leicht verkürzte Scheitel-Steiß-Länge könnte auch mit der bei dieser Konzentration auftretenden höchsten Wurfgröße zusammenhängen. Bei  $100 \text{ ml/m}^3$  kam es in drei Würfen zu Fehlbildungen, die als Hinweis auf Teratogenität zu werten sind.

## 5.5 Genotoxizität

Daten zur Genotoxizität sind umfassend in den Nachträgen von 1999 und 2003 dargestellt (Greim 1999, 2003). In diesem Nachtrag wird die bisherige Datenlage zusammengefasst und durch neue Studien ergänzt. Studien, die vor 2003 veröffentlicht wurden und noch nicht in den bisherigen Nachträgen aufgeführt sind, werden nur dann ausführlich dargestellt, wenn deren Ergebnis im Widerspruch zu der bisherigen Einschätzung steht.

### 5.5.1 In vitro

In einem bereits in Greim (1999) aufgeführten Rec-Assay mit *Bacillus subtilis* ergab Chloroform unter Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems ein negatives Ergebnis (Kada 1981), in einem weiteren ein positives wobei die Flüchtigkeit der Testsubstanz im Studiendesign berücksichtigt wurde (Matsui et al. 1989). Wichtige Untersuchungsdetails, wie die Chloroformkonzentration, bei der die Schädigung auftrat, oder Angaben zur Reinheit fehlen, sodass die Aussagekraft dieser Untersuchung stark eingeschränkt ist.

Ein Test auf Induktion der SOS-Antwort in *Salmonella typhimurium* TA1536/pSK1002 (umu-Test) wurde nach 2-, 4-, 6- und 20-stündiger Inkubation mit Chloroform mit und ohne Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems durchgeführt. Chloroform zeigte bei  $1000 \text{ mg/l}$  nach sechs Stunden ohne den Zusatz von S9-Mix sowie nach 20 Stunden mit dem Zusatz von metabolischer Aktivierung ein positives Ergebnis. Angaben zur Reinheit und zum Lösungsmittel fehlen (Ono et al. 1991). Chloroform ist erst bei sehr hoher Konzentration positiv, wobei anhand der untersuchten Wachstumskurven davon auszugehen ist, dass die SOS-Antwort-auslösende Konzentration auch stark zytotoxisch wirkt.

Bisher wurde Chloroform als nicht mutagen in Bakterien beschrieben (Greim 1999). Bestätigend hierzu zeigte Chloroform keine Mutagenität in den *Salmonella-typhimurium*-Stämmen TA98, TA100, TA1535, TA1537 und in *E. coli* WP2uvrA/pKM101. Allerdings ließ sich im *E. coli*-Stamm WP2/pKM101 nach Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems und GSH für Chloroform in Konzentrationen von 0,05–2 % eine geringe, aber dennoch statistisch signifikante Erhöhung der Zahl der Revertanten-Kolonien bis auf das 2,1-Fache im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Ohne GSH zeigte sich diese Zunahme nicht. Die höchste Konzentration von 5 % war zytotoxisch. Die Untersuchung wurde mittels Gasphasenexposition durchgeführt, bei der ein Gasexpositionsbeutel zum Einsatz kam, um das Verflüchtigen von Chloroform zu vermeiden (Araki et al. 2004). *E. coli* WP2/pKM101 detektiert Mutationen an einem A:T-Basenpaar, ist im Gegensatz zu WP2uvrA/pKM101 kompetent für Exzisionsreparatur und wird nach OECD-Prüfrichtlinie 471 neben dem *Salmonella-typhimurium*-Stamm TA102 zum Nachweis von DNA-vernetzenden (cross-linking) oder oxidierenden Substanzen empfohlen. In dieser Untersuchung wurde Ethanol in Konzentrationen von 0,3–1 % zur Stabilisierung von Chloroform verwendet. Der Zusatz von Ethanol zu Chloroform kann zur Bildung der potenten Alkylanzien Ethyl- oder Diethylcarbonat führen und somit das Ergebnis beeinflussen (US EPA 2001). Weiterhin wurde Chloroform im *E. coli*-Stamm WP2/pKM101 in einer anderen Untersuchung mit und ohne Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems in Konzentrationen von 0,1 bis  $1000 \text{ µg/Platte}$  negativ getestet (Kirkland et al. 1981).



An den *Salmonella-typhimurium*-Stämmen TA98, TA100, TA1535 und TA1537 und war Chloroform bei 0,2 µmol/Platte ohne Zusatz einer metabolischen Aktivierung stark mutagen. In Anwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems war die Anzahl der Revertanten-Kolonien und damit die Mutagenität wesentlich geringer (Varma et al. 1988). Auch in dieser Untersuchung wurde Ethanol eingesetzt, was das Ergebnis beeinflussen kann (siehe oben). Es trat eine höhere Mutagenität ohne metabolische Aktivierung als mit metabolischer Aktivierung auf. Im Hinblick auf den Wirkungsmechanismus scheint dies unstimmig, da eine Toxifizierung nach metabolischer Aktivierung stattfindet. Allerdings ist es möglich, dass Substanzen am metabolischen Aktivierungssystem binden und dadurch die Aufnahme in die Zelle behindert wird. Weiterhin waren positive Ergebnisse, sowohl mit als auch ohne Zusatz von metabolischer Aktivierung, nur bei der niedrigsten Konzentration zu beobachten. Es fehlt somit eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Insgesamt sind die Ergebnisse nicht plausibel.

Tests auf Genotoxizität mit Hefestämmen verliefen negativ (Kassinova et al. 1981; Mehta und von Borstel 1982; Scheel und Zimmermann 1981). In einem Test auf Induktion von Deletionen (DEL) durch intrachromosomale Rekombinationen in *Saccharomyces cerevisiae* zeigte Chloroform ein positives Ergebnis ab 0,75 mg/ml und bis 5,6 mg/ml. Die DEL-Rekombinationshäufigkeit war auf das 5,6-Fache erhöht. Der Zusatz von N-Acetylcystein (NAC) als Radikalfänger führte zu einer reduzierten Induktion der DEL-Rekombinationen (außer bei der höchsten Konzentration) sowie zu geringerer Zytotoxizität. Weiterhin oxidierte Chloroform Dichlorfluoresceindiacetat, ein Indikator für freie Radikale, was als Hinweis gewertet wurde, dass Chloroform intrazellulär freie Radikale generieren kann (Brennan und Schiestl 1998). Bereits ab der niedrigsten eingesetzten Konzentration wurde Zelltod festgestellt mit einer Überlebensrate von max. 64 % mit dem Zusatz von NAC bzw. max. 52 % ohne Zusatz von NAC, sodass alle Ergebnisse unter zytotoxischen Bedingungen erhalten wurden. Weiterhin wurde kein metabolisches Aktivierungssystem eingesetzt.

In Eukaryontenzellen zeigte Chloroform nur bei zytotoxischen Konzentrationen ein mutagenes und klastogenes Potential (Greim 1999, 2003). In einer neueren Studie wurde untersucht, ob Chloroform durch oxidativen Stress zur Induktion sekundärer Genotoxizität in Hepatozyten von weiblichen Wistar-Ratten führen kann. Zytotoxizität wurde durch die Messung der Laktatdehydrogenase-Freisetzung nach zwei Stunden bestimmt und zeigte sich erst ab 20 mM Chloroform. Weiterhin wurde mittels MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Test ab 8 mM (12 % verminderte Aktivität) eine signifikant erhöhte Zytotoxizität festgestellt. Ein statistisch signifikant verminderter GSH-Gehalt wurde erst bei zytotoxischen Konzentrationen von 20 mM beobachtet. Eine statistisch signifikante Zunahme an DNA-Einzelstrangbrüchen ließ sich im Comet-Assay nach zweistündiger Inkubation mit Chloroform erst ab 8 mM feststellen. 8-Oxodeoxyguanosin wurde nach einer zweistündigen Inkubationszeit mit Chloroform in Konzentrationen von 4, 8 oder 20 mM untersucht und war nicht statistisch signifikant erhöht. Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal wurden zur Bestimmung der Lipidperoxidation herangezogen. Ab Konzentrationen von 4 mM und einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde eine statistisch signifikante Zunahme der Lipidperoxidationsprodukte sowie eine konzentrationsabhängige statistisch signifikante Steigerung von Malondialdehyddeoxyguanosin (M1dG)-Addukten beobachtet (Beddowes et al. 2003). Die Autoren geben widersprüchliche Angaben zum Beginn der Zytotoxizität an. Beschrieben, aber nicht abgebildet, ist ein MTT-Assay mit einer signifikanten Zytotoxizität ab 8 mM. Demnach treten die beobachteten Einzelstrangbrüche bei beginnender Zytotoxizität auf. Der GSH-Gehalt war nicht vermindert und eine Erhöhung von 8-Oxodeoxyguanosin wurde nicht festgestellt, was als Hinweis auf eine nicht ROS-vermittelte Genotoxizität gewertet wurde. Zur Untersuchung des GSH-Status ist anzumerken, dass keine Messung von GSSG durchgeführt wurde, wodurch eine Induktion der GSH-Bildung durch GSSG ersichtlich gewesen wäre. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass eine eventuelle Abnahme von GSH maskiert ist.

V79-Zellen wurden gegen Chloroform in Konzentrationen von 6, 10 oder 12 mM inkubiert und danach auf Aneuploidie untersucht. Chloroform verursachte eine Störung des Spindelapparates, z. T. bei zytotoxischen Konzentrationen (Önfelt 1987).

### 5.5.2 In vivo

Nach bisheriger Datenlage zeigte Chloroform in Soma- bzw. Keimzellen von *Drosophila melanogaster* keine mutagene Wirkung. Die Untersuchung von transgenen LacI-Mäusen auf Chloroform-induzierte Genmutationen in der Leber war negativ. In-vivo-Genotoxizitätstests bei Säugern hatten auf ein klastogenes Potential hingewiesen, allerdings nur bei hohen, meist toxischen Dosierungen (Greim 1999, 2003). Die Klastogenität und Aneugenität von Chloroform wurde nun in einer Studie untersucht. Weiterhin gibt es eine Untersuchung zur DNA-Bindungsaktivität von Chloroform. Beide neueren Studien sind im Folgenden dargestellt.

In einem Mikronukleustest in Knochenmarkserythrozyten nach OECD-Prüfrichtlinie 474 wurden je sechs männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit 120, 240 oder 480 mg Chloroform/kg KG und Tag an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mittels Schlundsonde behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente Maiskeimöl, als klastogene Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid und als aneugene Positivkontrolle wurde Carbendazim eingesetzt. Alle Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Dosierung getötet. In der höchsten Dosisgruppe von 480 mg/kg KG und Tag wurden klinische Zeichen wie Störungen der Bewegungskoordination, verminderte und erhöhte Atmung, gekrümmte Körperhaltung, verminderte Körpertemperatur, Lethargie, Reibung der Schnauze, verminderte Aktivität, Ptosis, Piloarreaktion und Tremor festgestellt. Die Körpergewichtsentwicklung der behandelten Tiere war im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle dosisabhängig verringert. Die Positivkontrollen sowie die Lösungsmittelkontrollen zeigten die erwarteten Ergebnisse. Das Verhältnis von polychromatischen zu normochromatischen Erythrozyten, ausgedrückt als % polychromatische Erythrozyten, sank dosisabhängig und betrug bei der 480-mg/kg-Gruppe 38 % (♂) bzw. 27 % (♀) und bei der Kontrollgruppe 62 % (♂) bzw. 44 % (♀). Dies wurde von den Autoren als Hinweis auf Knochenmarkstoxizität und Erreichen des Zielorgans gewertet und belegt zusammen mit den klinischen Zeichen, dass ausreichend hohe Dosen gewählt wurden. In 2000 ausgezählten polychromatischen Erythrozyten war der individuelle Anteil mit Mikronuklei in der gleichen Größenordnung wie in der Lösungsmittelkontrolle. Der Gruppenmittelwert jeder Dosisgruppe an polychromatischen Erythrozyten mit Mikronuklei unterschied sich nicht statistisch signifikant von der Kontrolle. Zusammenfassend zeigte die Studie, dass Chloroform in Konzentrationen bis 480 mg/kg KG und Tag weder klastogen noch aneugen bei Ratten wirkt (Covance Laboratories Ltd 2009).

In einer Studie zur Untersuchung der kovalenten Bindung von Chloroform an DNA, RNA und Proteine wurde radioaktiv markiertes [ $^{14}\text{C}$ ]-Chloroform sechs männlichen Wistar-Ratten und männlichen Balb/c-Mäusen i.p. injiziert. Die Dosis betrug 500  $\mu\text{Ci}/\text{kg KG}$ . Nach 22 Stunden wurden die Tiere getötet und Leber, Lunge, Niere und Magen entnommen und auf Bindung untersucht. Zusätzlich wurde die enzymatisch in 5'-Mononukleotide verdaute DNA der Leber der Maus mittels HPLC auf Bindung untersucht. In einem weiteren Versuchsansatz wurden sechs Ratten und 18 Mäuse zwei Tage vor der Chloroforminjektion zur Enzyminduktion i.p. mit Phenobarbital oder beta-Naphthoflavon vorbehandelt. In beiden Spezies war die Bindung an RNA und Proteine höher im Vergleich zur DNA, was von den Autoren als Hinweis auf eine schwach ausgeprägte DNA-Bindungsaktivität von Chloroform gewertet wurde. Mit Ausnahme des Magens zeigten die Organe der Maus höhere DNA-Bindungswerte als die der Ratte. Die HPLC-Untersuchung ergab, dass die gesamte kovalent gebundene Radioaktivität in einem einzelnen Peak gemessen wurde und nicht mit den Peaks der unmodifizierten Nukleotide übereinstimmte. Dies wurde als Hinweis auf ein durch Chloroform induziertes DNA-Addukt gewertet, ohne genauere Adduktidentifikation. Die Vorbehandlung mit den CYP450-Induktoren Phenobarbital oder beta-Naphthoflavon ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied bei der Bindung von Chloroform an die DNA der Mausleber, jedoch eine Abnahme bei der Leber der Ratte (Colacci et al. 1991). In dieser Untersuchung wurde keine Identifizierung des DNA-Addukts durchgeführt. Anzumerken ist, dass für die Untersuchung der Bindung in Niere, Lunge und Magen die Organproben von je 18 Mäusen oder sechs Ratten gepoolt analysiert wurden. Für die Analyse der DNA-Bindung in der Leber wurden bei den Ratten die sechs Einzeltiere separat ausgewertet, während bei den Mäusen drei gepoolte Proben von je sechs Tieren verwendet wurden, was eine vergleichende Betrachtung, sowohl der vier Organe als auch der zwei Spezies, beeinträchtigt.

### 5.5.3 Fazit

Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen mit Bakterien und Hefen zeigten sich in einigen neu aufgeführten Studien Hinweise auf ein mutagenes Potential von Chloroform. Allerdings wurde die Studie an Hefen unter zytotoxischen Bedingungen und ohne den Zusatz eines metabolischen Aktivierungssystems durchgeführt. Bei den vier Studien mit Bakterien sind bei drei die Ergebnisse nicht plausibel oder die Studienbeschreibung unzureichend. Die Studie von Araki (2004) erfüllt im Wesentlichen die derzeit gültigen Anforderungen der OECD-Prüfrichtlinie 471. In einem Stamm, *E. coli* WP2/pKW101, wurde eine mutagene Wirkung von Chloroform festgestellt. In dieser Untersuchung wurde allerdings Ethanol zur Stabilisierung von Chloroform verwendet, was zu den potenten Alkylanzien Ethyl- oder Diethylcarbonat führen kann. In einer anderen Studie ergab Chloroform mit *E. coli* WP2/pKW101 ein negatives Ergebnis. Genmutationen traten bei einer Untersuchung an LacI-transgenen B6C3F1-Mäusen in vivo nicht auf. Das Ergebnis der In-vitro-Untersuchung zur mutagenen Wirkung wurde somit in vivo nicht bestätigt.

Dass DNA-Einzelstrangbrüche in Rattenhepatozyten nur bei zytotoxischen Konzentrationen auftreten (Beddowes et al. 2003) geht konform mit der bisherigen Datenlage, wonach Genotoxizität bei beginnender Zytotoxizität eintritt. Weiterhin wurde Lipidperoxidation bei der nicht zytotoxischen Konzentration von 4 mM festgestellt. Wie in Abschnitt 3.2 dargestellt, ist eine Lipidperoxidation durch die Bildung des Dichlormethyl-Radikals unter reduktiven Bedingungen, d. h. bei hohen Konzentrationen und geringem Sauerstoffgehalt, beschrieben. Der Blut:Luft-Verteilungskoeffizient wird für den Menschen mit 7,43 angegeben (Abschnitt 3.1), wodurch sich nach Inhalation von 2,5 mg/m<sup>3</sup> (MAK-Wert) eine Chloroformkonzentration im Blut von 18 µg/l ergeben würde. Verglichen mit der in vitro eingesetzten Konzentration von 4 mM (477 mg/l) ist die bei der Exposition in Höhe des MAK-Werts erreichte Konzentration im Blut weitaus geringer und eine Lipidperoxidation wird deshalb bei Einhaltung des MAK-Wertes nicht von Relevanz sein. In einer neu aufgeführten In-vitro-Studie wurden für Chloroform aneugene Effekte beschrieben. Im Gegensatz dazu zeigten die bisherigen In-vivo-Genotoxizitätstests an Säugern keine Klastogenität oder Aneugenität in nichtzytotoxischen Dosierungen. Dieses Ergebnis wird in einem nach aktueller Prüfrichtlinie durchgeführten Mikronukleustest an Ratten bestätigt.

## 5.6 Kanzerogenität

### 5.6.1 Kurzzeitstudien

Chloroform ist nicht initiiierend, jedoch ergeben sich Hinweise auf eine Tumorpromotion (Greim 1999). In einer bisher noch nicht aufgeführten Kurzzeitstudie wurde Chloroform mit dem Trinkwasser männlichen C57 BL/10ScSn/01a- und Theiller-Original-Mäusen verabreicht und verschiedene Tumorzellarten (Ehrlich-Lettré-Aszites-Karzinom, B16-Melanom, Lewis-Lungenkarzinom) intraperitoneal oder subkutan injiziert bzw. intramuskulär in die Flanke transplantiert (Capel et al. 1979).

Das Studiendesign ist nicht bewertungsrelevant, daher wird die Untersuchung nicht ausführlicher dargestellt. Weitere neue Studien sind nicht verfügbar.

### 5.6.2 Langzeitstudien

Die kanzerogene Wirkung von Chloroform ist im Nachtrag 1999 ausführlich dargestellt. Nach Gabe per Schlundsonde erzeugt Chloroform bei männlichen Ratten Nierentumoren und bei weiblichen Ratten Schilddrüsentumoren sowie bei beiden Geschlechtern der Maus Lebertumoren. Nach Applikation im Trinkwasser lassen sich bei männlichen Ratten Nierentumoren feststellen. Nach Inhalation von Chloroform sind bei männlichen Mäusen ebenfalls erhöhte Nierentumorinzidenzen zu beobachten (Greim 1999).

In einer Studie zur Kanzerogenität wurde nur die Niere untersucht. Je 50 männliche F344-Ratten wurden inhalativ für sechs Stunden am Tag an fünf Tagen pro Woche 104 Wochen lang exponiert. Zusätzlich wurde weiteren Gruppen kombiniert Chloroform inhalativ und mittels Trinkwassergabe verabreicht (siehe Abschnitt 5.2.1). Es zeigten sich

nur in der kombinierten Expositionsgruppe Nierenzellkarzinome (Nagano et al. 2006). Die Anzahl der Adenome und Karzinome ist in [Tabelle 11](#) dargestellt. Detaillierte Angaben fehlen.

**Tab. 11** Adenome und Karzinome der Niere bei männlichen F344-Ratten (Nagano et al. 2006)

	Konzentration im Trinkwasser (mg/l)							
	0				1000			
Inhalationskonzentration (ml/m <sup>3</sup> )	0	25	50	100	0	25	50	100
Abgeschätzte Chloroformaufnahme (mg/kg KG und Tag)	0	20	39	78	45	73	93	135
Nierenzelladenome	0	0	0	1	0	2	0	4
Nierenzellkarzinome	0	0	0	0	0	2	4	14

Zwei weitere, bisher noch nicht aufgeführte Langzeitstudien (Eschenbrenner und Miller 1945; Habs et al. 1983) sind aufgrund ihrer Beschreibung oder des Studiendesigns (zu geringe Tierzahl, vor Applikation Bestrahlung mit Neutronen, rudimentäre Studienbeschreibung) nicht zur Bewertung heranzuziehen.

## 6 Bewertung

Sensitivste Effekte sind die Verdickung des Knochens in der Nasenhöhle, zelluläre Veränderungen des olfaktorischen Epithels sowie eine erhöhte Zellproliferation in der Leber und Niere bei Mäusen und Ratten nach inhalativer Exposition.

**MAK-Wert.** In den Studien am Menschen (siehe [Abschnitt 1](#)) sind die Konzentrationen von Chloroform sehr hoch, sodass daraus kein MAK-Wert abgeleitet werden kann.

Der bisher gültige MAK-Wert wurde aus subchronischen Studien abgeleitet, bei denen sich für die erhöhte Zellproliferation in Niere und Leber eine NOAEC von 5 ml/m<sup>3</sup> für die Maus bzw. in der Niere eine NOAEC von 10 ml/m<sup>3</sup> für die Ratte ergeben hatte (Greim 1999; Templin et al. 1996). Seit dem Jahr 2016 berücksichtigt die Kommission bei systemischen Effekten aus inhalativen Tierversuchen das erhöhte Atemvolumen am Arbeitsplatz im Vergleich zum Atemvolumen unter experimentellen Bedingungen durch Halbierung der entsprechenden Konzentration. Bei Berücksichtigung der möglichen Wirkungsverstärkung bei chronischer Exposition (1:2) und da die NOAEC aus tierexperimentellen Untersuchungen stammt (1:2 für die Übertragung auf den Menschen), ergibt sich eine Konzentration von 0,63 ml/m<sup>3</sup>. Mit dem Preferred Value Approach kann ein MAK-Wert von 0,5 ml/m<sup>3</sup> abgeleitet werden. Dieser Wert entspricht dem bisher gültigen MAK-Wert.

Bereits im Nachtrag 1999 (Greim 1999) wurde auf minimale durch Chloroform induzierte Effekte am olfaktorischen Epithel der Ratte hingewiesen. Neue Daten nach chronischer Inhalation von Chloroform in einer 2-Jahre-Studie bestätigen, dass die Nase zu den empfindlichsten Zielorganen zählt. Es zeigen sich respiratorische Metaplasie des olfaktorischen Epithels sowie leichte Verdickung der Knochen bei der jeweils niedrigsten getesteten Konzentration von 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup> bei Ratten bzw. von 5 ml Chloroform/m<sup>3</sup> bei Mäusen. Für die Knocheneffekte ist der Mensch weniger empfindlich als der Nager und für die Metaplasie sind die Befunde an der Ratte plausibler als die an der Maus (vergleiche [Abschnitt 5.2.1.4](#) und [Abschnitt 3.2.2](#)). Außerdem weisen Nager im olfaktorischen Epithel eine deutlich höhere Metabolisierung durch CYP2E1 auf als Menschen. Für die metabolische Umsetzung zu Phosgen und somit für die toxische Wirkung von Chloroform an der Nase wird deshalb vermutet, dass der Nager sensitiver ist als der Mensch.

Die Effekte nach Inhalation von Chloroform auf das olfaktorische Epithel können sowohl systemisch als auch lokal bedingt sein (siehe [Abschnitt 2.2](#)), weshalb im Folgenden hierfür zwei Ableitungswege dargestellt werden.

Ausgehend davon, dass die Naseneffekte über die systemische Aufnahme und Verteilung entstanden sind, wird aus der LOAEC von 10 ml Chloroform/m<sup>3</sup> aus der chronischen Inhalationsstudie der Ratte eine NAEC (LOAEC dividiert

durch 3) von 3,3 ml Chloroform/m<sup>3</sup> abgeschätzt. Unter Berücksichtigung des erhöhten Atemvolumens am Arbeitsplatz im Vergleich zu inhalativen Tierversuchen in Ruhe (1:2) ergibt sich eine Konzentration von 1,6 ml/m<sup>3</sup>. Da der Mensch nicht empfindlicher ist als die Ratte, könnte mit dem Preferred Value Approach ein MAK-Wert von 1 ml/m<sup>3</sup> abgeleitet werden.

Unter der Annahme eines lokalen Effekts im olfaktorischen Epithel (Übertragung der Tierversuchsdaten auf den Menschen 1:2 nach Brüning et al. (2014)) würde sich ausgehend von der NAEC von 3,3 ml/m<sup>3</sup> und mit dem Preferred Value Approach auch ein MAK-Wert von 1 ml/m<sup>3</sup> errechnen. Zusammenfassend liegen die systemischen Effekte an Niere bzw. Leber und die Naseneffekte im gleichen Konzentrationsbereich, wobei allerdings angenommen werden kann, dass das olfaktorische Epithel des Menschen weniger sensitiv ist, da der zur Toxifizierung notwendige Metabolismus in der Nase des Nagers wesentlich ausgeprägter stattfindet. Dies stellt einen zusätzlichen Sicherheitsabstand zwischen MAK-Wert und den auftretenden Effekten in der Nase dar. Somit schützt der bestehende MAK-Wert von 0,5 ml/m<sup>3</sup> (2,5 mg/m<sup>3</sup>) auch vor Effekten an der Nase und kann daher beibehalten werden.

**Spitzenbegrenzung.** Der MAK-Wert wurde aufgrund von systemischen Wirkungen abgeleitet, deshalb verbleibt Chloroform in Spitzenbegrenzungskategorie II. Zur Halbwertszeit liegt eine Studie (Fry et al. 1972) nach oraler Gabe an Probanden mit initialen Halbwertszeiten von unter einer Stunde vor, was für einen Überschreitungsfaktor von 1 sprechen würde. Zur Studie ist allerdings anzumerken, dass in den dargestellten Ergebnissen eine Diskrepanz zwischen der Abbildung und im Text angegebenen Werten besteht. Die aus dem Tierversuch aus den Leber- und Niereneffekten abgeleitete NOAEC (0,625 ml/m<sup>3</sup>) ist 1,25-fach so hoch wie der MAK-Wert. Bei einer Halbwertszeit von 15 Minuten beträgt die Spitzenkonzentration bei einem Überschreitungsfaktor von 2 das 1,5-Fache der Blutkonzentration bei kontinuierlicher Exposition in Höhe des MAK-Werts (berechnet aus Hartwig 2011), also nur 20 % (1,5/1,25) über der Blutkonzentration, die sich aus der NOAEC ergibt. Da der Blut:Luft-Verteilungskoeffizient für den Menschen deutlich geringer (etwa 1/3) im Vergleich zum Nager (Corley et al. 1990) ist, ist bei gleicher äußerer Belastung der Mensch weniger belastet und auch deshalb ein Überschreitungsfaktor von 2 vertretbar.

**Fruchtschädigende Wirkung.** In zwei pränatalen Entwicklungstoxizitätsstudien (eine davon nach OECD-Prüfrichtlinie 414) mit inhalativer Ganzkörperexposition traten folgende Effekte auf: An Wistar-Ratten hatte Chloroform bei bzw. ab 30 ml/m<sup>3</sup> Retardierungen in Form von verringertem Körpergewicht und reduzierter Scheitel-Steiß-Länge zur Folge. Gleichzeitig trat bereits Maternaltoxizität wie erniedrigte Körpergewichtszunahme sowie reduzierte Futteraufnahme auf. Die NOAEC für Entwicklungstoxizität beträgt 10 ml/m<sup>3</sup> (Greim 1999; Hoechst AG 1988, 1990 a, b). Bei Sprague-Dawley-Ratten kam es bei 100 ml/m<sup>3</sup> zu externen (verkürzte bzw. fehlende Schwänze und nicht angelegte Anusöffnungen) und skelettalen Fehlbildungen (fehlende Rippen) in drei Würfen. Die NOAEC für derartige Effekte lag bei 30 ml/m<sup>3</sup> (Henschler 1989; Schwetz et al. 1974). Die Fehlbildungen in drei Würfen bei 100 ml/m<sup>3</sup> sind als Hinweis auf Teratogenität zu werten. Nach Schlundsondengabe führte Chloroform bei Sprague-Dawley-Ratten und Dutch-Belted-Kaninchen zu Entwicklungsverzögerungen bei gleichzeitiger Maternaltoxizität. Erste Effekte traten bei Ratten ab 126 mg/kg KG und Tag und bei Kaninchen bei 50 mg/kg KG und Tag auf. Die entsprechenden NOAEL für Entwicklungstoxizität liegen bei 50 mg/kg KG und Tag (Ratten) bzw. bei 35 mg/kg KG und Tag (Kaninchen). Teratogene Effekte wurden nicht beobachtet (Henschler 1989; Thompson et al. 1974).

Die NOAEC für Entwicklungstoxizität von 10 ml/m<sup>3</sup> bei Ratten entspricht unter Berücksichtigung des erhöhten Atemvolumens einem 10-fachen Abstand zum MAK-Wert von 0,5 ml/m<sup>3</sup> (2,5 mg/m<sup>3</sup>). Zur toxikokinetischen Übertragung der NOAEL für Entwicklungstoxizität von 50 mg/kg KG und Tag (Ratten) bzw. 35 mg/kg KG und Tag (Kaninchen) in eine Konzentration in der Luft am Arbeitsplatz werden berücksichtigt: die den toxikokinetischen Unterschieden zwischen Ratte bzw. Kaninchen und dem Menschen entsprechenden speziesspezifische Korrekturwerte (1:4 bzw. 1:2,4), die experimentell bestimmte Resorption (100 %; praktisch vollständige Resorption bei Mäusen und Ratten nach 48 bzw. 96 Stunden (ATSDR 1997)), das Körpergewicht (70 kg) und das Atemvolumen (10 m<sup>3</sup>) des Menschen sowie die angenommene 100%ige inhalative Resorption. Damit errechnen sich entsprechende Konzentrationen von 17,6 bzw. 20,4 ml/m<sup>3</sup> (88 mg/m<sup>3</sup> bzw. 102 mg/m<sup>3</sup>), was einem 36- bzw. 41-fachen Abstand zum MAK-Wert von 0,5 ml/m<sup>3</sup> (2,5 mg/m<sup>3</sup>) entspricht. Aufgrund der ausreichend großen Abstände der umgerechneten NOAEC/NOAEL für Entwicklungstoxizität

zum MAK-Wert und der bei einem Rattenstamm aufgetretenen Fehlbildungen, deren NOAEC einen 30-fachen Abstand zum MAK-Wert hat, wird die Zuordnung von Chloroform zur Schwangerschaftsgruppe C bestätigt.

**Krebserzeugende Wirkung.** Chloroform wirkt kanzerogen auf die Leber von Mäusen, die Schilddrüse von Ratten und die Niere bei beiden Spezies. Der Kanzerogenität geht eine zytotoxische Wirkung voraus (Greim 1999). Seit dem Nachtrag 1999 liegen keine neuen bewertungsrelevanten Untersuchungen zur krebserzeugenden Wirkung vor. Chloroform wird deshalb weiterhin in die Kategorie 4 für Kanzerogene eingestuft.

**Keimzellmutagene Wirkung.** In einer neuen Untersuchung wurde im Gegensatz zur bisherigen Datenlage in *E. coli* WP2/pKW101 eine mutagene Wirkung von Chloroform festgestellt. Eine Beeinflussung durch das Lösungsmittel ist hierbei nicht auszuschließen. Das Vorkommen von Genmutationen wurde in einer Untersuchung an LacI-transgenen B6C3F1-Mäusen *in vivo* getestet (Greim 1999), für Chloroform ergab der Test einen negativen Befund. Das Ergebnis der neuen *In-vitro*-Untersuchung zur mutagenen Wirkung wurde somit *in vivo* nicht bestätigt. Ein Indikatorstest auf DNA-Strangbrüche sowie ein Test auf die Induktion von Lipidperoxidation *in vitro* zeigt sich nur in hohen, meist zytotoxischen Konzentrationen positiv. *In vivo* wurde in einer Studie nach aktueller Prüfrichtlinie im Mikronukleustest keine Klastogenität oder Aneugenität festgestellt. Insgesamt ergibt sich für Chloroform kein Verdacht auf eine keimzellmutagene Wirkung und es erfolgt daher keine Einstufung in eine der Kategorien für Keimzellmutagene.

**Hautresorption.** Chloroform wurde bereits 1999 aufgrund von *In-vitro*-Daten, die durch Modellrechnungen gestützt wurden, mit „H“ markiert. Die berechneten dermalen Aufnahmemengen liegen mit ca. 2000 mg weit höher als die bei Einhaltung des MAK-Werts aufgenommene Menge (Greim 1999). Chloroform bleibt deshalb mit „H“ markiert.

**Sensibilisierende Wirkung.** Zur sensibilisierenden Wirkung liegen weiterhin keine Befunde beim Menschen und keine validen positiven Ergebnisse aus experimentellen Untersuchungen am Tier oder aus *In-vitro*-Untersuchungen vor. Chloroform wird daher weiterhin weder mit „Sh“ noch mit „Sa“ markiert.

## Anmerkungen

### Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten ([www.dfg.de/mak/interessenkonflikte](http://www.dfg.de/mak/interessenkonflikte)) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

## Literatur

- Amet Y, Berthou F, Fournier G, Dréano Y, Bardou L, Clédes J, Ménez J-F (1997) Cytochrome P450 4A and 2E1 expression in human kidney microsomes. *Biochem Pharmacol* 53(6): 765–771. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(96\)00821-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(96)00821-0)
- Araki A, Kamigaito N, Sasaki T, Matsushima T (2004) Mutagenicity of carbon tetrachloride and chloroform in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, and TA1537, and *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 and WP2/pKM101, using a gas exposure method. *Environ Mol Mutagen* 43(2): 128–133. <https://doi.org/10.1002/em.20005>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1997) Toxicological profile for chloroform. Atlanta, GA: ATSDR. <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp6.pdf>, abgerufen am 29 Aug 2019
- Beddowes EJ, Faux SP, Chipman JK (2003) Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology* 187(2–3): 101–115. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00058-1)
- Borzelleca F, Carchman RA (1982) Effects of selected organic drinking water contaminants on male reproduction. PB82259847. Alexandria, VA: NTIS. <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/PB82259847.xhtml>, abgerufen am 17 Sep 2019
- Brennan RJ, Schiestl RH (1998) Chloroform and carbon tetrachloride induce intrachromosomal recombination and oxidative free radicals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 397(2): 271–278. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00225-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00225-x)

- Brüning T, Bartsch R, Bolt HM, Desel H, Drexler H, Gundert-Remy U, Hartwig A, Jäckh R, Leibold E, Pallapies D, Rettenmeier AW, Schlüter G, Stropp G, Sucker K, Triebig G, Westphal G, van Thriel C (2014) Sensory irritation as a basis for setting occupational exposure limits. *Arch Toxicol* 88(10): 1855–1879. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1346-z>
- Capel ID, Dorrell HM, Jenner M, Pinnock MH, Williams DC (1979) The effects of chloroform ingestion on the growth of some murine tumours. *Eur J Cancer* (1965) 15(12): 1485–1490. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(79\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0014-2964(79)90028-8)
- Colacci A, Bartoli S, Bonora B, Guidotti L, Lattanzi G, Mazzullo M, Niero A, Perocco P, Silingardi P, Grilli S (1991) Chloroform bioactivation leading to nucleic acids binding. *Tumori* 77(4): 285–290. <https://doi.org/10.1177/030089169107700401>
- Corley RA, Mendrala AL, Smith FA, Staats DA, Gargas ML, Conolly RB, Andersen ME, Reitz RH (1990) Development of a physiologically based pharmacokinetic model for chloroform. *Toxicol Appl Pharmacol* 103(3): 512–527. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(90\)90324-n](https://doi.org/10.1016/0041-008x(90)90324-n)
- Covance Laboratories Ltd (2009) Evaluation of micronuclei in the bone marrow of treated rats following 5 days of repeat oral dosing. 3025/001, Jun 2009, North Yorkshire: Covance Laboratories, unveröffentlicht
- Cummings BS, Lasker JM, Lash LH (2000) Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 293(2): 677–685
- Ding X, Kaminsky LS (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140251>
- Docks EL, Krishna G (1976) The role of glutathione in chloroform-induced hepatotoxicity. *Exp Mol Pathol* 24(1): 13–22. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(76\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0014-4800(76)90053-8)
- ECHA (European Chemicals Agency) (2019) Chloroform (CAS Number 67-66-3). Registration dossier. Joint submission, first publication 02 May 2011, last modification 28 April 2020. Helsinki: ECHA. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/14963>, abgerufen am 07 Mai 2020
- Eschenbrenner AB, Miller E (1945) Induction of hepatomas in mice by repeated oral administration of chloroform, with observations on sex differences. *J Natl Cancer Inst* 5(4): 251–255. <https://doi.org/10.1093/jnci/5.4.251>
- EU (Europäische Union) (2009) Verordnung (EG) Nr. 1005/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. September 2009 über Stoffe, die zum Abbau der Ozonschicht führen (Neufassung) (Text von Bedeutung für den EWR). *ABl L* (286): 1–30
- Fang C, Behr M, Xie F, Lu S, Doret M, Luo H, Yang W, Aldous K, Ding X, Gu J (2008) Mechanism of chloroform-induced renal toxicity: non-involvement of hepatic cytochrome P450-dependent metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 227(1): 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.10.014>
- Fry BJ, Taylor T, Hathway DE (1972) Pulmonary elimination of chloroform and its metabolite in man. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 196(1): 98–111
- Gemma S, Vittozzi L, Testai E (2003) Metabolism of chloroform in the human liver and identification of the competent P450s. *Drug Metab Dispos* 31(3): 266–274. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.3.266>
- Green T, Lee R, Toghiani A, Meadowcroft S, Lund V, Foster J (2001) The toxicity of styrene to the nasal epithelium of mice and rats: studies on the mode of action and relevance to humans. *Chem Biol Interact* 137(2): 185–202. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(01\)00236-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(01)00236-8)
- Greim H, Hrsg (1999) Chloroform (Trichlormethan). In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. 28. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb6766d0028>
- Greim H, Hrsg (2001) Chloroform (Trichlormethan). In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. 33. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb6766d0033>
- Greim H, Hrsg (2003) Chloroform (Trichlormethan). In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. 37. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb6766d0037>
- Gross EA, Swenberg JA, Fields S, Popp JA (1982) Comparative morphometry of the nasal cavity in rats and mice. *J Anat* 135(Pt 1): 83–88
- Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M (1991) Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 4(2): 168–179. <https://doi.org/10.1021/tx00020a008>
- Habs H, Künstler K, Schmähl D, Tomatis L (1983) Combined effects of fast-neutron irradiation and subcutaneously applied carbon tetrachloride or chloroform in C57Bl6 mice. *Cancer Lett* 20(1): 13–20. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(83\)90181-7](https://doi.org/10.1016/0304-3835(83)90181-7)
- Hard GC, Johnson KJ, Cohen SM (2009) A comparison of rat chronic progressive nephropathy with human renal disease – implications for human risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 39(4): 332–346. <https://doi.org/10.1080/10408440802368642>
- Harkema JR, Morgan KT (1996) Normal morphology of the nasal passages in laboratory rodents. In: Jones TC, Dungworth DL, Mohr U, Hrsg. *Respiratory system. Monographs on pathology of laboratory animals*, 2. Aufl. New York, NY: Springer. S. 3–17. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-61042-4>
- Harkema JR, Carey SA, Wagner JG (2006) The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 34(3): 252–269. <https://doi.org/10.1080/01926230600713475>
- Hartwig A, Hrsg (2011) Spitzenbegrenzung. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. 51. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mbpeakexpd0051>

- Henschler D, Hrsg (1977) Chloroform. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 5. Lieferung. Weinheim: VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb6766d0005>
- Henschler D, Hrsg (1989) Sammelkapitel MAK-Werte und Schwangerschaft. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 15. Lieferung. Weinheim: VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb0pregd0015>
- Hoechst AG (1988) Initial submission: inhalation embryotoxicity study of chloroform in Wistar rats with cover letter dated 07/24/92. NTIS/OTS0544564. Alexandria, VA: NTIS. <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/OTS0544564.xhtml>, abgerufen am 15 Okt 2020
- Hoechst AG (1990 a) Initial submission: chloroform: supplementary inhalation embryotoxicity study in Wistar rats (final report) with attachments and cover letter dated 122491. NTIS/OTS0535017. Alexandria, VA: NTIS. <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/OTS0535017.xhtml>, abgerufen am 12 Aug 2020
- Hoechst AG (1990 b) Support: supplementary inhalation embryotoxicity study of chloroform in Wistar rats – study amendments, with cover letter dated 062593. NTIS/OTS05350171. Alexandria, VA: NTIS. <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/OTS05350171.xhtml>, abgerufen am 12 Aug 2020
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1999) Chloroform. In: Some chemicals that causes tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Band 73. Lyon: IARC Press. S. 131–182. [https://publications.iarc.fr/\\_publications/media/download/2435/eabe702c13ae4828853cb8fdb7fa652ae1d3b627.pdf](https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/2435/eabe702c13ae4828853cb8fdb7fa652ae1d3b627.pdf), abgerufen am 29 Aug 2019
- Kada T (1981) The DNA-damaging activity of 42 coded compounds in the rec-assay. In: Ashby J, de Serres F, Hrsg. Evaluation of short-term tests for carcinogens: Report of the International Collaborative Program. Progress in mutation research. Band 1. New York, NY: Elsevier. S. 175–182
- Kasai T, Nishizawa T, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T, Kawamoto T (2002) Acute and subchronic inhalation toxicity of chloroform in rats and mice. *J Occup Health* 44(4): 193–202. <https://doi.org/10.1539/joh.44.193>
- Kassinova G, Kovaltsova SV, Marfin SV, Zakharov IA (1981) Activity of 40 coded compounds in differential inhibition and mitotic crossing-over assays in yeast. In: de Serres F, Ashby J, Hrsg. Evaluation of short-term tests for carcinogens: Report of the International Collaborative Program. Progress in mutation research. Band 1. New York, NY: Elsevier. S. 434–455
- Kirkland DJ, Smith KL, Van Abbé NJ (1981) Failure of chloroform to induce chromosome damage or sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes and failure to induce reversion in *Escherichia coli*. *Food Cosmet Toxicol* 19(5): 651–656. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(81\)90517-4](https://doi.org/10.1016/0015-6264(81)90517-4)
- Land PC, Owen EL, Linde HW (1981) Morphologic changes in mouse spermatozoa after exposure to inhalational anesthetics during early spermatogenesis. *Anesthesiology* 54(1): 53–56. <https://doi.org/10.1097/00000542-198101000-00010>
- Larson JL, Wolf DC, Méry S, Morgan KT, Butterworth BE (1995) Toxicity and cell proliferation in the liver, kidneys and nasal passages of female F-344 rats, induced by chloroform administered by gavage. *Food Chem Toxicol* 33(6): 443–456. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00013-r](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00013-r)
- Larson JL, Templin MV, Wolf DC, Jamison KC, Leininger JR, Méry S, Morgan KT, Wong BA, Conolly RB, Butterworth BE (1996) A 90-day chloroform inhalation study in female and male B6B3F1mice: implications for cancer risk assessment. *Fundam Appl Toxicol* 30(1): 118–137. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0049>
- Lee MG, Phimister A, Morin D, Buckpitt A, Plopper C (2005) In situ naphthalene bioactivation and nasal airflow cause region-specific injury patterns in the nasal mucosa of rats exposed to naphthalene by inhalation. *J Pharmacol Exp Ther* 314(1): 103–110. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084517>
- Longo V, Ingelman-Sundberg M (1993) Acetone-dependent regulation of cytochromes P450E1 and P450B1 in rat nasal mucosa. *Biochem Pharmacol* 46(11): 1945–1951. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90635-a](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90635-a)
- Longo V, Pacifici GM, Panattoni G, Ursino F, Gervasi PG (1989) Metabolism of diethylnitrosamine by microsomes of human respiratory nasal mucosa and liver. *Biochem Pharmacol* 38(11): 1867–1869. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90424-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90424-3)
- Matsui S, Yamamoto R, Yamada H (1989) The *Bacillus subtilis*/microsome rec-assay for the detection of DNA damaging substances which may occur in chlorinated and ozonated waters. *Water Sci Technol* 21(8–9): 875–887. <https://doi.org/10.2166/wst.1989.0290>
- Matsushima T (1994) An inhalation carcinogenesis study of chloroform. Initial report. Kanagawa: Japan Bioassay Laboratory, Japan Industrial Safety and Health Association
- Mehta RD, von Borstel RC (1982) Genetic activity of diethylstilbestrol in *Saccharomyces cerevisiae*: enhancement of mutagenicity by oxidizing agents. *Mutat Res* 92(1–2): 49–61. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(82\)90209-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90209-3)
- Méry S, Larson JL, Butterworth BE, Wolf DC, Harden R, Morgan KT (1994) Nasal toxicity of chloroform in male F-344 rats and female B6C3F1 mice following a 1-week inhalation exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 125(2): 214–227. <https://doi.org/10.1006/taap.1994.1067>
- Montelius J, Wahlkvist H, Boman A, Fernström P, Gråbergs L, Wahlberg JE (1994) Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Derm Venereol* 74(1): 22–27
- Morgan A, Black A, Belcher DR (1970) The excretion in breath of some aliphatic halogenated hydrocarbons following administration by inhalation. *Ann Occup Hyg* 13(4): 219–233. <https://doi.org/10.1093/annhyg/13.4.219>



- Morris JB, Asgharian B, Kimbell JS (2010) Upper airway dosimetry of gases, vapors, and particulate matter in rodents. In: Morris JB, Shusterman JB, Hrsg. Toxicology of the nose and upper airways. Boca Raton, FL: CRC Press. S. 99–115. <https://doi.org/10.3109/9781420081886>
- Nagano K, Matsumoto M (2019) Angaben zur Histopathologie. E-Mail-Anhang, 18 Apr 2019
- Nagano K, Kano H, Arito H, Yamamoto S, Matsushima T (2006) Enhancement of renal carcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to chloroform in male rats. *J Toxicol Environ Health A* 69(20): 1827–1842. <https://doi.org/10.1080/15287390600630146>
- NTP (National Toxicology Program) (1988) Chloroform reproduction and fertility assessment in CD-1 mice when administered by gavage. PB89148639. Alexandria, VA: NTIS. <https://ntrl.ntis.gov/NTRL/dashboard/searchResults/titleDetail/PB89148639.xhtml>, abgerufen am 20 Okt 2020
- Önfelt A (1987) Spindle disturbances in mammalian cells IV. The action of some glutathione-specific agents in V79 Chinese hamster cells, changes in levels of free sulphydryls and ATP, c-mitosis and effects on DNA metabolism. *Mutat Res* 182(3): 155–172. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(87\)90068-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(87)90068-9)
- Ono Y, Somiya I, Kawamura M (1991) The evaluation of genotoxicity using DNA repairing test for chemicals produced in chlorination and ozonation processes. *Water Sci Technol* 23(1–3): 329–338. <https://doi.org/10.2166/wst.1991.0431>
- Overton LC, Hudder A, Novak RF (2008) The CYP2E subfamily. In: Ioannides C, Hrsg. Cytochromes P450: role in the metabolism and toxicity of drugs and other xenobiotics. Issues in toxicology. Cambridge: Royal Society of Chemistry. S. 276–308. <https://doi.org/10.1039/9781847558428>
- Reed CJ (1993) Drug metabolism in the nasal cavity: relevance to toxicology. *Drug Metab Rev* 25(1–2): 173–205. <https://doi.org/10.3109/03602539308993975>
- Reed CJ, Lock EA, De Matteis F (1986) NADPH: cytochrome P-450 reductase in olfactory epithelium. Relevance to cytochrome P-450-dependent reactions. *Biochem J* 240(2): 585–592. <https://doi.org/10.1042/bj2400585>
- Sarkar MA (1992) Drug metabolism in the nasal mucosa. *Pharm Res* 9(1): 1–9. <https://doi.org/10.1023/a:1018911206646>
- Scheel I, Zimmermann F (1981) Induction of mitotic gene conversion in strain D7 of *Saccharomyces cerevisiae* by 42 coded chemicals. In: de Serres F, Ashby J, Hrsg. Evaluation of short-term tests for carcinogens: Report of the International Collaborative Program. Progress in mutation research. Band 1. New York, NY: Elsevier. S. 481–490
- Schwetz BA, Leong BKJ, Gehring PJ (1974) Embryo- and fetotoxicity of inhaled chloroform in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 28(3): 442–451. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(74\)90229-4](https://doi.org/10.1016/0041-008X(74)90229-4)
- Smith JH, Maita K, Sleight SD, Hook JB (1984) Effect of sex hormone status on chloroform nephrotoxicity and renal mixed function oxidases in mice. *Toxicology* 30(4): 305–16. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(84\)90141-0](https://doi.org/10.1016/0300-483x(84)90141-0)
- Templin MV, Larson JL, Butterworth BE, Jamison KC, Leininger JR, Méry S, Morgan KT, Wong BA, Wolf DC (1996) A 90-day chloroform inhalation study in F-344 rats: profile of toxicity and relevance to cancer studies. *Fundam Appl Toxicol* 32(1): 109–125. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0113>
- Templin MV, Constan AA, Wolf DC, Wong BA, Butterworth BE (1998) Patterns of chloroform-induced regenerative cell proliferation in BDF1 mice correlate with organ specificity and dose-response of tumor formation. *Carcinogenesis* 19(1): 187–193. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.1.187>
- Thompson DJ, Warner SD, Robinson VB (1974) Teratology studies on orally administered chloroform in the rat and rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol* 29(3): 348–357. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(74\)90107-0](https://doi.org/10.1016/0041-008x(74)90107-0)
- Torkelson TR, Oyen F, Rowe VK (1976) The toxicity of chloroform as determined by single and repeated exposure of laboratory animals. *Am Ind Hyg Assoc J* 37(12): 697–705. <https://doi.org/10.1080/0002889768507551>
- US EPA (US Environmental Protection Agency) (2001) Toxicological review of chloroform (CAS No. 67-66-3). EPA/635/R-01/001. Washington, DC: US EPA. [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/toxreviews/0025tr.pdf](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0025tr.pdf), abgerufen am 09 Jul 2020
- Varma MM, Ampy FR, Verma K, Talbot WW (1988) In vitro mutagenicity of water contaminants in complex mixtures. *J Appl Toxicol* 8(4): 243–248. <https://doi.org/10.1002/jat.2550080404>
- WHO (World Health Organization) (1994) Chloroform. In: International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria, No. 163. Geneva: WHO. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40319/9241571632-eng.pdf>, abgerufen am 19 Jul 2022
- Williams AL, Bates CA, Pace ND, Leonhard MJ, Chang ET, DeSesso JM (2018) Impact of chloroform exposures on reproductive and developmental outcomes: A systematic review of the scientific literature. *Birth Defects Res* 110(17): 1267–1313. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1382>
- Wolf CR (1991) Individuality in cytochrome P450 expression and its association with the nephrotoxic and carcinogenic effects of chemicals. In: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H, Hrsg. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC scientific publications, No. 115. Lyon: IARC. S. 281–287. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Scientific-Publications/Mycotoxins-Endemic-Nephropathy-And-Urinary-Tract-Tumours-1991>, abgerufen am 18 Okt 2022
- Yamamoto S, Kasai T, Matsumoto M, Nishizawa T, Arito H, Nagano K, Matsushima T (2002) Carcinogenicity and chronic toxicity in rats and mice exposed to chloroform by inhalation. *J Occup Health* 44(5): 283–293. <https://doi.org/10.1539/joh.44.283>
- Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138(1): 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zhang X, Zhang Q-Y, Liu D, Su T, Weng Y, Ling G, Chen Y, Gu J, Schilling B, Ding X (2005) Expression of cytochrome P450 and other biotransformation genes in fetal and human nasal mucosa. *Drug Metab Dispos* 33(10): 1423–1428. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005769>