

# Kieselsäuren, amorphe: a) synthetische amorphe Kieselsäure

## 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

synthetische amorphe  
Kieselsäure; Lunge; Entzündung;  
MAK-Wert; maximale  
Arbeitsplatzkonzentration;  
Spitzenbegrenzung;  
Entwicklungstoxizität;  
Genotoxizität

## Abstract

The German Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area has re-evaluated synthetic amorphous silica [7631-86-9] considering all toxicological end points. The critical effects are the inflammatory effects in the lungs. A NOAEC cannot be established for these effects. In a 90-day study, one form of nanoscale synthetic amorphous silica induced inflammatory effects in the lungs of rats at the lowest concentration tested of 0.5 mg/m<sup>3</sup> and above. Based on this LOAEC, a maximum concentration at the workplace (MAK value) of 0.02 mg/m<sup>3</sup> has been derived for the respirable fraction and the substance has been classified in Peak Limitation Category II with an excursion factor of 8. The NOAEL for developmental or perinatal toxicity in rats was 1000 mg/kg body weight and day after gavage; this corresponds to concentrations of 1750 or 2450 mg/m<sup>3</sup> at the workplace. As the margins between these values and the MAK value are sufficiently large, synthetic amorphous silica has been assigned to Pregnancy Risk Group C. Studies in animals did not show a carcinogenic potential of synthetic amorphous silica, which is relevant for humans. Synthetic colloidal amorphous silica is not mutagenic in vitro or in vivo. The DNA strand breaks and micronuclei that were observed in vitro were not confirmed by the results in vivo. Synthetic colloidal amorphous silica is not absorbed through the skin in toxicologically relevant amounts and there is no evidence that it induces contact sensitization.

### Citation Note:

Hartwig A, MAK Commission.  
Kieselsäuren, amorphe:  
a) synthetische amorphe  
Kieselsäure. MAK-Begründung,  
Nachtrag. MAK Collect Occup  
Health Saf. 2023 Sep;8(3):Doc054.  
[https://doi.org/10.34865/  
mb763186d8\\_3ad](https://doi.org/10.34865/mb763186d8_3ad)

Manuskript abgeschlossen:  
24 Feb 2021

Publikationsdatum:  
29 Sep 2023

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



<b>MAK-Wert (2022)</b>	<b>0,02 mg/m<sup>3</sup> A</b>
<b>Spitzenbegrenzung (2021)</b>	<b>Kategorie II, Überschreitungsfaktor 8</b>
<b>Hautresorption</b>	–
<b>Sensibilisierende Wirkung</b>	–
<b>Krebserzeugende Wirkung</b>	–
<b>Fruchtschädigende Wirkung (1994)</b>	<b>Gruppe C</b>
<b>Keimzellmutagene Wirkung</b>	–
<b>BAT-Wert</b>	–
CAS-Nr.	7631-86-9; 112945-52-5; 112926-00-8; 61790-53-2; 63231-67-4

Zu amorphen Kieselsäuren liegt eine Begründung aus dem Jahr 1989 vor (Henschler 1989).

## Allgemeine Charakterisierung

Zu den synthetischen amorphen Kieselsäuren (synthetisches amorphes Siliciumdioxid; CAS-Nr. 7631-86-9 für Siliciumdioxid) zählen die im Nassverfahren hergestellten Kieselsäuren wie Fällungskieselsäure, kolloidale Kieselsäure oder Kieselgel sowie die in thermischen Prozessen hergestellte pyrogene Kieselsäure (CAS-Nr. 112945-52-5). Außerdem gilt diese Begründung auch für die ungebrannte Kieselgur (CAS-Nr. 61790-53-2). Es existiert eine Vielzahl von Modifikationen, teilweise mit eigenen CAS-Nummern. Synthetische amorphe Kieselsäuren bestehen aus nanoskaligen Partikeln und können hydratisiert oder nicht hydratisiert auftreten. Dabei handelt es sich um röntgenamorphe SiO<sub>2</sub>-Modifikationen, die aus Silicium/Sauerstoff-Tetraedern aufgebaut sind. Nanoskalige amorphe Kieselsäuren werden u. a. als Zusätze zu Zement, Farben, Kosmetika oder Lebensmitteln und als Wirkstoffträger im medizinischen Bereich eingesetzt (Maser et al. 2015).

### 1 Allgemeiner Wirkungscharakter

Nach 13-wöchiger inhalativer Exposition treten bei Ratten ab einer Konzentration von 0,5 mg/m<sup>3</sup> entzündliche Veränderungen in der Lunge, Veränderungen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) sowie Becherzellhyperplasien in der Nasenhöhle durch synthetische amorphe Kieselsäuren auf.

Die Substanz wirkt nicht reizend auf die Augen, die oberen Atemwege und die Haut. In einer tierexperimentellen Untersuchung zeigt die Substanz keine hautsensibilisierende Wirkung. Daten zur atemwegssensibilisierenden Wirkung liegen nicht vor.

Entwicklungstoxische oder fertilitätsbeeinflussende Effekte werden nicht beobachtet.

Durch nanoskalige amorphe Kieselsäuren in vitro induzierte DNA-Strangbrüche und Mikronuklei sind in Tierstudien nicht bestätigt worden.

Es liegen keine belastbaren Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung der amorphen Kieselsäuren vor.

## 2 Wirkungsmechanismus

Über den Mechanismus der entzündlichen Wirkung an der Lunge liegen keine Informationen vor.

## 3 Toxikokinetik und Metabolismus

### 3.1 Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung

Die amorphe Kieselsäure ist im Vergleich zu kristallinem Siliciumdioxid weniger toxisch und weist eine höhere Clearance aus der Lunge auf (IARC 1997). Nach 4-wöchiger Inhalation von kolloidaler synthetischer amorpher Kieselsäure (SAS) in Konzentrationen von 50 und 150 mg/m<sup>3</sup> wurden Halbwertszeiten in der Lunge von Ratten von 40 bzw. 50 Tagen gemessen (Lee und Kelly 1992), das bedeutet, dass die Lungenclearance unter diesen Bedingungen noch nicht beeinträchtigt war. Zum Vergleich wies Cristobalit (Hochtemperatur-Modifikation des Siliciumdioxids) Halbwertszeiten in der Lunge von Ratten von über 125 Tagen auf (Hemenway et al. 1990). Nach einer fünftägigen Exposition gegen Quarz (Min-U-Sil Quarz) in einer Konzentration von 50 mg/m<sup>3</sup> lag die Clearance in der Lunge von Ratten nach 20 Tagen erst bei 20 % (Driscoll et al. 1991).

#### Dermale Aufnahme

Es handelt sich um einen anorganischen Stoff, für den deshalb keine log K<sub>OW</sub>-Bestimmung durchgeführt wurde. Von der US EPA wurde ein log K<sub>OW</sub> von 0,53 modelliert (ECHA 2021). Zur Wasserlöslichkeit liegen verschiedene Angaben vor. Im REACH-Dossier werden 16 Studien zur Wasserlöslichkeit verschiedener Siliciumdioxide berichtet, die maximale Wasserlöslichkeit lag bei 140 mg/l (ECHA 2021). Mit diesen Daten und der Molmasse von 60,08 g/mol ergeben sich nach den Modellen von Fiserova-Bergerova et al. (1990) und IH SkinPerm von Tibaldi et al. (2014) unter Standardbedingungen (eine Stunde Exposition, 2000 cm<sup>2</sup> Hautoberfläche) aufgenommene Mengen von 4 bzw. 0,7 mg. In einer Studie an Kaninchen war bei dermalen Exposition gegen 10 000 mg/kg KG der Siliciumdioxidgehalt in Urin, Blut, Niere, Leber und Milz nicht erhöht (k. w. A.; ECHA 2021).

### 3.2 Metabolismus

Amorphe Kieselsäuren werden vermutlich nicht metabolisiert.

## 4 Erfahrungen beim Menschen

Die in der Begründung von 1989 dargestellten epidemiologischen Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen Exposition gegen amorphe Kieselsäure und respiratorischen Symptomen nachweisen (Henschler 1989).

In einer epidemiologischen Querschnittsstudie wurde untersucht, ob zwischen der Exposition gegen pyrogene und präzipitierte synthetische amorphe Kieselsäure am Arbeitsplatz und pulmonalen Effekten ein Zusammenhang besteht. In der Studie wurden 462 männliche Beschäftigte aus fünf deutschen Produktionsstätten berücksichtigt. Das durchschnittliche Lebensalter betrug zum Untersuchungszeitpunkt 41 Jahre. Von den Teilnehmern waren 76,4 % Raucher oder Ex-Raucher, die durchschnittliche Expositionsdauer betrug 12,4 Jahre mit einem Maximum von 42 Jahren. Die Exposition wurde an verschiedenen Arbeitsstätten und bei unterschiedlichen Tätigkeitsfeldern bestimmt. Die kumulative, inhalative Exposition wurde mittels zweier methodisch verschiedener Vorgehensweisen an 484 männlichen Beschäftigten mit einem Durchschnittsalter von 39,5 (19,5–60,8) Jahren untersucht und ausgewertet. Beim ersten Ansatz wurden für jede Produktionsstätte vier Expositionskategorien aufgestellt, die von betriebsinternen Fachleuten auf Basis der individuellen Arbeitshistorie festgelegt wurden: niedrig (< 1 mg/m<sup>3</sup>), mittel (1–4 mg/m<sup>3</sup>), hoch (4–10 mg/m<sup>3</sup>) und Spitze (> 10 mg/m<sup>3</sup>). Beim zweiten Ansatz wurden auf Basis der individuellen Arbeitshistorie Job-Kategorien festgelegt und bezüglich der fünf Produktionsstätten ähnliche Expositionskategorien abgeleitet, um die Exposition für

verschiedene Arbeitsplatzkategorien retrospektiv abzuschätzen. Außerdem wurden dabei jüngst erhobene personenbezogene Messungen des inhalierbaren SAS-Staubs und detaillierte Angaben zu betriebsinternen Veränderungen berücksichtigt. Nach der ersten Methode wurde die mittlere kumulative Exposition auf  $56,9 \text{ mg/m}^3 \times \text{Jahre}$  geschätzt. Bei der zweiten Methode ergab sich für die Exposition ein geometrisches Mittel von  $31,95 \text{ mg/m}^3 \times \text{Jahre}$ . Die Autoren führen an, dass beide Methoden Nachteile aufweisen, die bei der Bewertung der epidemiologischen Studien berücksichtigt werden sollten (Morfeld et al. 2014). Es wurden drei Expositionskategorien festgelegt:  $\leq 40$ ;  $> 40$  bis  $\leq 100$ ;  $> 100 \text{ mg/m}^3 \times \text{Jahre}$ . Bei keinem Teilnehmer wurde eine Pneumokoniose oder Fibrose beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich bei 80 % aller Beschäftigten eine normale Spirometrie, bei 17 % eine Obstruktion und bei 4 % eine Restriktion. Diese Verteilung entspricht laut den Autoren in etwa der von männlichen weißen Amerikanern in der NHANES III Studie. Die forcierte Vitalkapazität (FVC) zeigte bei den Probanden eine geringe, aber auffällige Reduktion von 48 ml bei einer kumulativen Exposition von  $80 \text{ mg/m}^3 \times \text{Jahre}$  (Taeger et al. 2016 a). Aufgrund der ungenauen Expositionserfassung eignet sich die Studie nicht für die Ableitung einer NOAEC.

## 5 Tierexperimentelle Befunde und In-vitro-Untersuchungen

### 5.1 Akute Toxizität

#### 5.1.1 Inhalative Aufnahme

In einer vierstündigen Inhalationsstudie mit Aerosolen einer präzipitierten Kieselsäure (Zeosil Premium 200 MP; massenmedianer aerodynamischer Durchmesser (MMAD)  $0,975 \mu\text{m}$ ) wurden jeweils drei männliche und drei weibliche Sprague-Dawley-Ratten gegen Konzentrationen von 0 oder  $5,01 \text{ mg/m}^3$  nur über die Nase exponiert. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen konnten keine Anzeichen einer akuten Toxizität festgestellt werden. Die Studie wurde gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 436 durchgeführt (ECHA 2021).

#### 5.1.2 Orale Aufnahme

Die einmalige orale Gabe (mittels Schlundsonde) von 0 oder  $5000 \text{ mg/kg KG}$  einer pyrogenen Kieselsäure (Cab-O-Sil) an jeweils fünf männliche und fünf weibliche Wistar-Ratten führte innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen zu keinen Symptomen. Die orale  $\text{LD}_{50}$  bei Ratten liegt daher über  $5000 \text{ mg/kg KG}$  (ECHA 2021). Weitere Studien belegen, dass die  $\text{LD}_{50}$  nach oraler Aufnahme von Kieselsäuren mit verschiedenen Handelsnamen bei über  $1000 \text{ mg/kg KG}$  liegt (ECHA 2021).

#### 5.1.3 Dermale Aufnahme

Die dermale  $\text{LD}_{50}$  an Kaninchen lag für Syloid 244 über  $2000 \text{ mg/kg KG}$ . Es traten keine Hautirritationen auf (ECHA 2021). Für Nano-Siliciumdioxid ohne Oberflächenbehandlung (Zeo49) lag die dermale  $\text{LD}_{50}$  bei Kaninchen über  $5000 \text{ mg/kg KG}$  (ECHA 2021).

#### 5.1.4 Intraperitoneale und intravenöse Aufnahme

ICR-Mäuse wurden einmalig intraperitoneal gegen 0, 50, 100 oder  $250 \text{ mg/kg KG}$  amorphe Kieselsäuren mit durchschnittlichen Partikelgrößen von 12 nm exponiert. Angaben zum Geschlecht der Tiere fehlen. Drei Tage nach der Exposition wurden die Tiere untersucht. Ab der geringsten Dosis wurden vermehrt Peritonealmakrophagen aktiviert und Gene, die zur Bildung entzündungsfördernder Zytokine (Interleukin (IL)-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) oder Enzyme (iNOS, COX-2) beitragen, verstärkt exprimiert. Die Autoren machten keine weiteren stoffspezifischen Angaben zu den verwendeten Kieselsäuren (Park und Park 2009).

Männlichen Wistar-Ratten wurden amorphe Kieselsäuren in Dosen von 0, 25 oder  $50 \text{ mg/kg KG}$  (15 nm große Partikel; Levasil<sup>®</sup> 200/40) oder 0, 25, 50 oder  $125 \text{ mg/kg KG}$  (55 nm große Partikel; Levasil<sup>®</sup> 50/50) bei drei aufeinanderfolgenden

intravenösen Injektionen 48, 24 und vier Stunden vor der Tötung verabreicht. In der Tiergruppe, die gegen 50 mg/kg KG der 15 nm großen Partikel exponiert worden war, traten in der Leber geringgradige mikroskopische Veränderungen und eine leicht erhöhte Infiltration von neutrophilen Leukozyten und mononukleären Zellen auf. Zudem zeigte sich ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 im Plasma der gegen 50 mg/kg KG der 15-nm-Partikel und gegen 125 mg/kg KG der 55-nm-Partikel exponierten Tiere (Downs et al. 2012).

Amorphe präzipitierte Kieselsäure, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war, wurde Mäusen in verschiedenen Partikelgrößen in einer Dosis von 50 mg/kg KG einmalig intravenös verabreicht. Angaben zum Geschlecht der Tiere fehlen. Die Partikel wiesen mittlere Größen von 50, 100 oder 200 nm auf. Nach 12, 24, 48, 72 Stunden oder sieben Tagen wurden die Tiere untersucht. Bei Partikeln mit der Größe von 100 und 200 nm wurden nach zwölf Stunden histologisch transient gesteigerte Entzündungsreaktionen in Form von multifokalen entzündlichen Zellfoci in der Leber festgestellt. Bereits nach 24 Stunden waren die Reaktionen nicht mehr zu beobachten. Alle Partikel wurden mit der Galle und dem Urin eliminiert. In Leber und Milz wurden partikelbeladene Makrophagen bis zu vier Wochen nach Injektion festgestellt (Cho et al. 2009).

### 5.1.5 Intratracheale Instillation

Mittels intratrachealer Instillation wurden männliche Ratten (CrI:CD (SD)IGS BR) gegen 0, 1 oder 5 mg/kg KG präzipitierte Kieselsäure (Zeofree 80) exponiert. Die Partikel wiesen Größen von 90–500 nm auf. Nach 24 Stunden, einer Woche, einem und drei Monaten wurde die BALF untersucht. Die Kieselsäure verursachte 24 Stunden nach der Exposition, bereits ab 1 mg/kg KG, eine reversible Entzündungsreaktion in der Lunge in Form einer Zunahme der Neutrophilen in der BALF. Zusätzlich ließ eine erhöhte Aktivität von Lactatdehydrogenase (LDH) in der BALF ab einer Konzentration von 1 mg/kg KG auf Zellschädigungen in der Lunge schließen (Sayes et al. 2007).

In einer weiteren Studie wurden ultrafeine Partikel amorpher Kieselsäuren mit primären Partikeldurchmessern von 14 nm einmalig in Suspensionen mit 0, 2, 10 oder 50 mg/kg KG an männliche A/J-Mäuse (fünf pro Gruppe) verabreicht. Nach 24 Stunden, einer, vier und 14 Wochen erfolgte die histopathologische Befundung. Zudem wurden die BALF analysiert und die Lungengewebe immunhistologisch untersucht. Histopathologisch wurden transiente, aber schwere Entzündungen mit Infiltraten von neutrophilen Granulozyten und, im weiteren Verlauf, die Bildung von Granulomen festgestellt. Die mRNA- und Proteinkonzentrationen zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1 und MIP-2 waren im Lungengewebe erhöht. Nach einer (TNF- $\alpha$ ) bzw. nach vier (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MCP-1 und MIP-2) Wochen lagen die mRNA-Werte und Proteinkonzentrationen wieder auf Kontrollniveau (Cho et al. 2007). Eine genaue Beschreibung der verwendeten Kieselsäure fehlt in der Studie.

Feine und ultrafeine kolloidale amorphe Kieselsäure mit mittleren Durchmessern von 230 nm bzw. 14 nm wurde einmalig in einer Dosis von 3 mg pro Tier an weibliche ICR-Mäuse verabreicht. Die Mäuse wurden 30 Minuten, zwei, sechs, zwölf und 24 Stunden nach Exposition untersucht. Histopathologisch zeigten beide Behandlungsgruppen bronchoalveoläre Degenerationen und Nekrosen sowie neutrophile Entzündungen in den Alveolen mit partikelbeladenen Makrophagen. Die ultrafeinen Partikel erzeugten darüber hinaus bereits nach 30 Minuten alveoläre Hämorrhagien sowie schwerere Nekrosen. Die Ergebnisse zeigen, dass die ultrafeinen Partikel im Vergleich zu den feinen Partikeln schwerere Entzündungsreaktionen und Schäden im Lungengewebe hervorrufen (Kaewamatawong et al. 2005).

Die gleiche Autorengruppe verwendete die ultrafeinen Partikel nochmals in Dosen von 0; 0,3; 3; 10; 30 oder 100  $\mu$ g pro Tier bei männlichen ICR-Mäusen. Nach drei Tagen wurde die BALF untersucht, histologische Veränderungen erfasst und das Körpergewicht ermittelt. In den beiden höchsten Dosisgruppen wurden mäßige bis schwere Entzündungen und Schäden im Lungengewebe nachgewiesen. Zur Ermittlung der Zeitabhängigkeit wurden Mäuse gegen 30  $\mu$ g exponiert und in einem Zeitraum von bis zu 30 Tagen untersucht. Es zeigte sich, dass sämtliche Effekte reversibel waren (Kaewamatawong et al. 2006).

Ultrafeine Partikel amorpher Kieselsäure mit einer Partikelgröße von 14 nm wurden einmalig an jeweils fünf männliche A/K-Mäuse in Dosen von 0, 2, 10 oder 50 mg/kg KG intratracheal verabreicht. Die Untersuchungen der Tiere erfolgten einen Tag, eine, vier oder 14 Wochen nach der Exposition. Eine Woche nach der Exposition ergab die Gömöri-Trichrom-Färbung eine hochgradige Verdickung des Alveolarepithels und eine pulmonale Fibrose.

Diese Befunde normalisierten sich jedoch größtenteils nach vier Wochen wieder. Die mRNA- und Proteinspiegel von Zytokinen IL-4, IL-10, IL-13, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9, MMP-20) sowie des Metalloproteinaseninhibitors TIMP-1 waren einen Tag und eine Woche nach der Exposition statistisch signifikant erhöht. Vier bzw. 14 Wochen nach der Exposition befanden sich die mRNA- und Proteinspiegel, mit Ausnahme der von IFN- $\gamma$  und MMP-2, wieder auf Kontrollniveau. Eine genaue Spezifizierung der eingesetzten Kieselsäure wurde nicht vorgenommen (Choi et al. 2008).

Nanopartikel pyrogener amorpher Kieselsäure (AEROSIL® 200) mit einem mittleren Durchmesser von 12 nm wurden einmalig an ICR-Mäuse in einer Dosis von 1 mg/kg KG verabreicht. Ein, sieben, 14 und 28 Tage nach der Exposition wurden die Tiere untersucht. Nach einem Tag und nach sieben Tagen wurde eine statistisch signifikant geringere Körpergewichtszunahme verzeichnet. Proinflammatorische Zytokine, zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und das profibrotische Cytokin „Transforming Growth Factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) waren erhöht. Sieben sowie 14 Tage nach der Exposition wurden histopathologisch mikrogranulomatöse Veränderungen nachgewiesen. (Park et al. 2011).

## 5.2 Subakute, subchronische und chronische Toxizität

### 5.2.1 Inhalative Aufnahme

In einer Kurzzeitstudie wurden 24 CD-Ratten sechs Stunden täglich über einen Zeitraum von drei Tagen gegen ein Aerosol der amorphen Kieselsäure Zeofree 80 exponiert. Die Konzentrationen betragen 0, 10 oder 100 mg/m<sup>3</sup>. Es zeigten sich bei den Tieren ab 10 mg/m<sup>3</sup> vorübergehende pulmonale Entzündungsreaktionen, die bis einen Tag nach Expositionsende fortbestanden, sich aber nach acht Tagen Beobachtungszeit zurückgebildet hatten (Warheit et al. 1995).

Zur Untersuchung der Inhalationstoxizität wurden drei verschiedene Formen synthetischer amorpher Kieselsäuren (SAS) fünf Tage lang für sechs Stunden pro Tag in Konzentrationen von 0, 1, 5 oder 25 mg/m<sup>3</sup> nur über die Nase an männliche und weibliche Wistar-Ratten inhalativ verabreicht. Eingesetzt wurden Agglomerate von präzipitierter Kieselsäure (Zeosil 45), Kieselgel (Syloid) und pyrogener Kieselsäure (Cab-O-Sil M5). Als Positivkontrolle diente kristalline Kieselsäure (Quarzstaub) in einer Konzentration von 25 mg/m<sup>3</sup>. Die Untersuchung erfolgte einen Tag sowie ein und drei Monate nach Expositionsende. Unterschiede zwischen den SAS waren gemäß den Autoren marginal und bezogen sich nur auf den ersten Tag nach Expositionsende. Bei 1 mg/m<sup>3</sup> waren keine behandlungsbedingten Effekte zu beobachten, ab 5 mg/m<sup>3</sup> wurden leichte histopathologische Veränderungen an den Lungen beobachtet, wie erhöhtes Lungen- und tracheobronchiales Lymphknotengewicht, intraalveoläre Akkumulation von Makrophagen und Granulozyten sowie eine bronchial/bronchioläre Hypertrophie. Außerdem wurde eine Erhöhung der Zytotoxizität sowie der Biomarker alkalische Phosphatase (ALP), LDH, Superoxiddismutase und eine Zunahme an TNF- $\alpha$  in der BALF beobachtet. Alle Effekte hatten sich nach einem bis drei Monaten Beobachtungsdauer wieder weitgehend normalisiert (Arts et al. 2007).

In einer subakuten Inhalationsstudie wurden Ratten nur über die Nase gegen 0, 10, 50 oder 150 mg kolloidale SAS (Ludox)/m<sup>3</sup> über einen Zeitraum von zwei oder vier Wochen exponiert. Nach vierwöchiger Exposition wurden Lungenlasten von 489  $\mu$ g/Lunge (10-mg/m<sup>3</sup>-Gruppe), 2418  $\mu$ g/Lunge (50-mg/m<sup>3</sup>-Gruppe) sowie 7378  $\mu$ g/Lunge (150-mg/m<sup>3</sup>-Gruppe) gemessen. Die Exposition gegen 150 mg kolloidale SAS (Ludox)/m<sup>3</sup> resultierte in einer Entzündung der Lunge zusammen mit erhöhten Proteingehalten und erhöhten Aktivitäten von LDH und ALP in der BALF sowie einer reduzierten Makrophagenphagozytose. Auch die Exposition gegen 50 mg/m<sup>3</sup> resultierte in einer entzündlichen Reaktion der Lunge in Form einer Erhöhung der Neutrophilenzahl. Eine erhöhte Proliferation pulmonaler Epithelzellen (Labeling-Index stieg nach zwei Wochen von 0,6 % in der Kontrollgruppe auf 1,8 % in der 150-mg/m<sup>3</sup>-Gruppe) konnte für die beiden höheren Konzentrationen sowohl nach zwei- als auch nach vierwöchiger Exposition nachgewiesen werden. Im Anschluss an eine dreimonatige Erholungszeit fielen alle Parameter wieder auf das Kontrollniveau zurück (IARC 1997; Warheit et al. 1991).

In einer subakuten Inhalationsstudie wurden männliche SD-Ratten vier Wochen lang für sechs Stunden pro Tag, an fünf Tagen pro Woche gegen nanoskalige synthetische amorphe Kieselsäuren in den Konzentrationen 0; 0,407  $\pm$  0,066;

1,439 ± 0,177 oder 5,386 ± 0,729 mg/m<sup>3</sup> nur über die Nase exponiert. Die Kieselsäureaerosole wurden in einem Nanopartikelgenerator aus Tetraethylorthosilicat eigens hergestellt. Die Charakterisierung der hergestellten Partikel erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und energiedispersiver Röntgenspektroskopie. Die Partikelgröße wurde für die niedrige Konzentrationsgruppe mit 53 ± 2,56 nm, für die mittlere Konzentrationsgruppe mit 76 ± 1,53 nm und für die hohe Konzentrationsgruppe mit 79 ± 1,52 nm angegeben. An die Exposition schlossen sich Erholungsphasen von einem, sieben oder 28 Tagen an. In der hohen Konzentrationsgruppe wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ein statistisch signifikant geringeres Körpergewicht fünf Wochen nach Beginn der Exposition ermittelt. Weder in den anderen Gruppen noch zu einem anderen Zeitpunkt waren statistisch signifikante Veränderungen des Körpergewichtes zu beobachten. Am Tag nach Expositionsende waren die Erythrozytenzahlen und die Hämoglobinkonzentrationen in allen exponierten Gruppen statistisch signifikant erhöht. Histopathologisch konnten zu keinem Zeitpunkt bedeutsame Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden. Auch die Entzündungsparameter in der BALF waren nicht erhöht (Shin et al. 2017).

In einer Studie wurden männliche F344-Ratten sechs Stunden täglich, fünf Tage in der Woche, 13 Wochen inhalativ gegen pyrogene Kieselsäure des Typs NM-203 in Konzentrationen von 0 oder 50,4 ± 19,0 mg/m<sup>3</sup> Ganzkörper-exponiert. Die mittlere Lungenbelastung betrug am Ende der 13-wöchigen Exposition 882,7 ± 83,1 µg. In der BALF stiegen die Gesamtzahl der Zellen, der Proteingehalt, die LDH- und die Glucuronidase-Aktivitäten statistisch signifikant im Vergleich zu den Kontrollen an. Der Anteil der neutrophilen Leukozyten an den Gesamtzellen erhöhte sich von 0,26 % (Kontrollen) auf 55 % (NM-203), während der Anteil der Alveolarmakrophagen von 98 % (Kontrollen) auf 43 % (NM-203) abnahm. Innerhalb von drei Monaten kehrten diese Werte wieder zum Kontrollniveau zurück (Johnston et al. 2000).

In einer 90-Tage-Inhalationsstudie, gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 413, wurden jeweils zehn männliche und zehn weibliche Wistar-Ratten (Albino) in jeder Konzentrationsgruppe an fünf Tagen pro Woche, sechs Stunden pro Tag gegen die synthetische amorphe Kieselsäure HDK<sup>®</sup> SKS 300 über die Nase exponiert. Die Zielkonzentrationen von 0; 0,5; 2,0 und 10 mg/m<sup>3</sup> wurden im Mittel mit 0; 0,51 ± 0,06; 2,05 ± 0,015 bzw. 10,01 ± 0,47 mg/m<sup>3</sup> nachweislich erreicht. Die MMAD der Testsubstanz wurden mit 2,80 ± 0,33 µm, 6,62 ± 0,28 µm und 4,47 ± 0,41 µm für die niedrige, mittlere bzw. hohe Konzentrationsgruppe angegeben. An die Exposition schloss sich eine 13-wöchige Erholungszeit an. Am Tag nach Expositionsende war bei männlichen Tieren in der mittleren Konzentrationsgruppe die ALP, in der mittleren und hohen Konzentrationsgruppe die Aspartataminotransferase und in der hohen Konzentrationsgruppe die Alaninaminotransferase (ALT) statistisch signifikant erhöht. Ein statistisch signifikanter, jedoch reversibler erniedrigter Natriumgehalt betraf männliche Tiere der niedrigen und hohen Konzentrationsgruppe. Ein statistisch signifikanter Anstieg der absoluten und relativen Lungen- sowie tracheobronchialen Lymphknotengewichte konnte in den mittleren und hohen Konzentrationsgruppen festgestellt werden. Diese Befunde waren am Ende der Erholungsperiode bei weiblichen Tieren noch zu beobachten. Bei der makroskopischen Untersuchung zeigten sich rötlich verfärbte Lungen mit weißen Stellen bei zwei weiblichen Tieren der hohen Konzentrationsgruppe am Ende der Exposition. Die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung sind in [Tabelle 1](#) dargestellt. Bei allen Tieren der mittleren und hohen Konzentrationsgruppe wurde histologisch nach der Exposition eine Akkumulation von Alveolarmakrophagen und eine interstitielle Entzündung mit Zellinfiltraten befundet. Bei zehn von zehn männlichen und neun von zehn weiblichen Tieren der hohen Konzentrationsgruppe sowie bei fünf von zehn männlichen bzw. weiblichen Tieren der mittleren Konzentrationsgruppe lag zusätzlich noch eine bronchoalveoläre Epithelzellhyperplasie vor.

Die beobachteten Veränderungen in der niedrigsten Konzentrationsgruppe von 0,5 mg/m<sup>3</sup> sind nicht genau angegeben. Sie entsprachen in Inzidenz sowie Ausprägung den in den Kontrollgruppen. Daher wurden diese als nicht expositionsbedingt bewertet. Die nach der 13-wöchigen Erholungszeit beobachteten Effekte waren in ihrer Inzidenz und Ausprägung insgesamt geringer, jedoch nicht vollständig reversibel (k. w. A.; ECHA 2021). Die Originalstudie liegt nicht vor.

**Tab. 1** Histopathologische Befunde bei männlichen und weiblichen Ratten in der 90-Tage-Inhalationsstudie mit HDK® SKS 300 ohne die Befunde bei 0,5 mg/m<sup>3</sup> (ECHA 2021)

		Konzentration (mg/m <sup>3</sup> )											
		Expositionsende						Erholungszeit					
		♂			♀			♂			♀		
		0	2	10	0	2	10	0	2	10	0	2	10
<b>Lunge</b>													
Anzahl Tiere		10	10	10	10	10	10	10	5	10	10	5	10
Bronchoalveoläre Hyperplasie	sehr gering	1	5	0	1	5	7	0	1	3	0	0	0
	leicht	0	0	10	0	0	2	0	0	2	0	0	1
Akkumulation alveolärer Makrophagen	sehr gering	0	10	0	0	10	2	0	0	0	0	0	4
	leicht	0	0	10	0	0	6	0	0	0	0	0	0
	mäßig	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interstitielle Makrophagen und Lymphozyten-Infiltration	sehr gering	0	8	0	0	2	2	0	1	7	0	2	6
	leicht	0	2	9	0	8	8	0	0	3	0	0	0
	mäßig	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Mediastinale Lymphknoten</b>													
Anzahl Tiere		10	10	10	10	10	10	10	4	10	10	5	10
Erhöhte Sinushistiocytose	sehr gering	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
	leicht	0	0	4	0	0	5	0	0	0	0	0	2
	mäßig	0	0	3	0	0	2	0	0	3	0	0	3
Makrophagen-Aggregation	sehr gering	0	6	1	0	6	0	0	3	1	0	3	1
	leicht	0	2	3	0	0	3	0	0	4	0	0	4
	mäßig	0	0	5	0	0	6	0	0	4	0	0	1

Eine weitere 90-Tage-Inhalationsstudie wurde gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 413 durchgeführt. Jeweils 55 männliche Wistar-Ratten (WU) wurden an fünf Tagen pro Woche für sechs Stunden pro Tag gegen die synthetische amorphe Kieselsäure NM-200 über die Nase exponiert. Die Zielkonzentrationen von 0; 1; 2,5 oder 5 mg/m<sup>3</sup> wurden im Mittel annähernd (100–104 %) erreicht. Bei der Testsubstanz NM-200 handelte es sich um eine Fällungskieselsäure mit der CAS-Nr. 112926-00-8 und einer spezifischen Oberfläche (BET) von 160 m<sup>2</sup>/g. Die MMAD wurden mit 2,16 ± 0,09 µm, 2,94 ± 0,20 µm und 3,12 ± 0,06 µm für die niedrige, mittlere bzw. hohe Konzentrationsgruppe angegeben. An die Exposition schloss sich eine 13-wöchige Erholungszeit an. Expositionsbedingte klinisch-biochemische Befunde waren eine statistisch signifikant vermehrte Anzahl an polymorphkernigen Neutrophilen in allen Konzentrationsgruppen. Die Lymphozyten sowie die Aktivitäten von LDH und β-Glucuronidase und der Gesamtproteinspiegel waren in der mittleren und hohen Konzentrationsgruppe statistisch signifikant erhöht und die Makrophagen erniedrigt. Eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl von polymorphkernigen Neutrophilen wurde zusätzlich in der niedrigen Konzentrationsgruppe beobachtet. Alle Befunde zeigten sich reversibel und erreichten drei Monate nach Expositionsende wieder das Kontrollniveau. Am 14. Tag, nicht jedoch am ersten Tag nach Expositionsende, wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Konzentration des Zytokins CINC-1 beobachtet, während TNF-α und Interleukin-6 keinen Veränderungen unterlagen. Es konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der absoluten (5-mg/m<sup>3</sup>-Gruppe) und relativen (2,5- und 5-mg/m<sup>3</sup>-Gruppe) Lungengewichte festgestellt werden. Am Ende der Erholungszeit waren die absoluten Lungengewichte in der 2,5- und 5-mg/m<sup>3</sup>-Gruppe noch statistisch signifikant erhöht. Die histopathologische Untersuchung ergab bereits ab der niedrigsten Konzentration (1 mg/m<sup>3</sup>) eine statistisch signifikante multifokale muköse Becherzellhyperplasie und epitheliale hyaline Tröpfchen zusammen mit einer multifokalen Infiltration von Entzündungszellen in den Nasenhöhlen. Ein statistisch signifikanter Anstieg der alveolären Infiltration mit Granulozyten in der Lunge wurde in der mittleren und hohen Konzentrationsgruppe beobachtet. Eine statistisch signifikante interstitielle Makrophagen-Infiltration und Granulozyten-Infiltration in der Lunge trat in der hohen Konzentrationsgruppe auf. Im Gegensatz zu den Befunden in der Lunge persistierten die Befunde der Nasenhöhle, wenn auch in geringerer Ausprägung, noch am Ende der Erholungszeit. Die REACH-Registranten schließen aus diesen

Daten auf eine LOAEC von  $1 \text{ mg/m}^3$  aufgrund der Effekte in der Nasenhöhle (k. w. A.; ECHA 2021). Die Originalstudie liegt nicht vor.

In einer 90-Tage-Inhalationsstudie wurden jeweils 70 männliche und weibliche Wistar-Ratten fünf Tage in der Woche für sechs Stunden pro Tag gegen verschiedene synthetische amorphe Kieselsäuren exponiert und bis zu einem Jahr lang nachbeobachtet. Verwendet wurden Aerosole von Aerosil® 200 mit Zielkonzentrationen von 0, 1, 6 und  $30 \text{ mg/m}^3$  (erreichte Konzentration  $0; 1,3 \pm 0,1; 5,9 \pm 0,2$  und  $31 \pm 0,9 \text{ mg/m}^3$ ) sowie Aerosil® R 974 und Sipernat® 22 S in einer Konzentration von je  $30 \text{ mg/m}^3$  (erreichte Konzentration  $34,7 \pm 0,7$  bzw.  $34,9 \pm 0,5 \text{ mg/m}^3$ ). Zum Vergleich wurde zusätzlich Quarzstaub in einer Konzentration von  $60 \text{ mg/m}^3$  (erreichte Konzentration  $58,5 \pm 0,7 \text{ mg/m}^3$ ) eingesetzt. Ein MMAD der verwendeten Partikel wurde nicht angegeben. Die Untersuchungen erfolgten im Anschluss an die Expositionsperiode sowie im Anschluss an eine 13-, 26-, 39- und 52-wöchige Erholungszeit. Direkt nach Expositionsende zeigten alle Gruppen eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu den Kontrollen. Statistisch signifikant erhöhte Werte wurden jedoch nur in der  $30\text{-mg/m}^3$ -Aerosil® 200- und der Quarzstaub-Gruppe erreicht. Im Gegensatz zur Quarz-Gruppe war dieser Anstieg bei der Aerosil® 200-Gruppe 13 Wochen nach Expositionsende nicht mehr zu verzeichnen. Der Anstieg der neutrophilen Granulozyten verlief parallel zum Auftreten von Veränderungen in der Lunge. Die durch die synthetischen amorphen Kieselsäuren induzierten Veränderungen zeigten sich am Ende der Expositionsperiode am ausgeprägtesten und bildeten sich nach Beendigung der Exposition unterschiedlich schnell innerhalb eines Jahres zurück. Die deutlichsten Effekte wurden von Aerosil® 200 und die leichtesten von Sipernat® 22 S hervorgerufen. Alle Testsubstanzen führten zu einer Akkumulation von Alveolarmakrophagen, polymorphkernigen Leukozyten, Zelltrümmern und intraalveolärem granulärem Material sowie zu einer alveolären Bronchiolisation. Die Akkumulation von Alveolarmakrophagen blieb in allen exponierten Gruppen und bei allen Konzentrationen am Ende der Expositionsperiode statistisch signifikant erhöht. Im Laufe der Nachbeobachtungsperiode bildete sich diese zurück, wobei sie bei Exposition gegen Aerosil® R 974 bis zur 39. Woche und bei Exposition gegen  $30 \text{ mg Aerosil}^{\circledR} 200/\text{m}^3$  noch in der 52. Woche statistisch signifikant erhöht war. Vor allem bei männlichen Ratten mit einer Exposition gegen  $30 \text{ mg Aerosil}^{\circledR} 200/\text{m}^3$  zeigte sich bis zur 26. Woche der Nachbeobachtung eine statistisch signifikant ausgeprägte alveoläre Bronchiolisation. Bei den zwei höher exponierten Aerosil® 200-Gruppen ( $5,9 \pm 0,2$  und  $31 \pm 0,9 \text{ mg/m}^3$ ) hatte die Ansammlung von Zelltrümmern und bei allen Aerosil® 200-Gruppen die Zahl der intraalveolären polymorphkernigen Leukozyten am Ende der Expositionsperiode statistisch signifikant zugenommen, beide Effekte waren jedoch am Ende der 52-wöchigen Nachbeobachtungsperiode auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt. Eine statistisch signifikante Erhöhung der Septumzellichte wurde bei allen gegen Aerosil® 200 exponierten Tieren und bei den gegen Aerosil® R 974 exponierten weiblichen Tieren am Ende der Exposition beobachtet. Ihre Normalisierung verlief langsam und war konzentrationsabhängig. Bei den gegen  $30 \text{ mg Aerosil}^{\circledR} 200/\text{m}^3$  exponierten weiblichen und männlichen Tieren war die Septumzellichte auch 52 Wochen nach der Exposition noch signifikant erhöht. Eine fokale interstitielle Fibrose in Form einer amorphen, kollagenhaltigen Verdickung der Septen wurde erstmalig 13 Wochen nach der Exposition in nahezu allen Gruppen beobachtet, mit Ausnahme der gegen  $1 \text{ mg Aerosil}^{\circledR} 200/\text{m}^3$  exponierten männlichen Tiere und der gegen Aerosil® R 974, Sipernat® 22 S und Quarzstaub exponierten weiblichen Tiere. Im weiteren Verlauf der Nachbeobachtungsphase waren diese Veränderungen in den Aerosil® R 974- und Sipernat® 22 S-Gruppen vollständig rückläufig, in der  $30\text{-mg/m}^3$ -Aerosil® 200- und der Quarzstaub-Gruppe nahmen sie jedoch deutlich zu (Reuzel et al. 1991).

Das zur Verfügung stehende Material (männliche Tiere; max. zehn Tiere pro Gruppe) der Studie von Reuzel et al. (1991) wurde knapp 30 Jahre später erneut angefärbt, untersucht und neu bewertet. Die Neubewertung der Ergebnisse erfolgte durch eine Pathology Working Group (PWG) (Hardisty 2016). Bei der Wiederholungsuntersuchung wurde eine Reihe degenerativer und entzündlicher Veränderungen in den Proben aller Testgruppen und den Kontrollen gefunden. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Veränderungen und deren Ausmaß sowie Angaben zur Signifikanz sind in [Tabelle 2](#) und [Tabelle 3](#) zusammengestellt. Danach verursachte die tägliche inhalative Exposition gegen Aerosil® 200 ( $1,3\text{--}31 \text{ mg/m}^3$ ), Aerosil® R 974 ( $34,7 \text{ mg/m}^3$ ) und Sipernat® 22 S ( $34,9 \text{ mg/m}^3$ ) während des Beobachtungszeitraumes keine irreversiblen Schäden an der Lunge. Eine Fibrose wurde weder am Ende der Exposition noch nach einer 13-wöchigen Erholungsperiode beobachtet. Bei den späteren Untersuchungszeitpunkten wiesen zwei Tiere der am höchsten exponierten Aerosil® 200-Gruppe eine minimale Fibrose (nicht statistisch signifikant) auf. Nach einer Erholungszeit

von 52 Wochen zeigten ein Tier der Kontrollgruppe sowie je ein Tier der gegen die niedrige und mittlere Konzentration Aerosil® 200 und drei Tiere der gegen die höchste Konzentration Aerosil® 200 exponierten Tiere eine minimale fokale Fibrose. In den Aerosil® R 974- und Sipernat® 22 S-Gruppen lag keine Fibrose vor. Außer einigen reaktiven Veränderungen in Form einer Präsenz und Ansammlung von Alveolarmakrophagen bei der höchsten Konzentration von Aerosil® 200 lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren vor (Hardisty 2016; Weber et al. 2018).

**Tab. 2** Inzidenzen und Schweregrade (in Klammern) der wichtigsten Veränderungen in der Lunge von männlichen Ratten, modifiziert nach Weber et al. (2018)

	UZP	Konzentration (mg/m <sup>3</sup> )			
		0	1,3	5,9	31
Pneumozyten Typ II alveoläre Hyperplasie (= normale Architektur, jedoch sind die Alveolen vorwiegend von Typ II-Zellen ausgekleidet)	0	0/9	6/10* (1,5) <sup>a)</sup>	9/10* (2,0)	8/9* (2,8)
	13	0/5	0/5	3/5 (1,3)	4/5* (4,2)
	52	1/10 (1,0)	0/10	0/10	4/10 (1,0)
Hyperplasie des alveolären und bronchiolären Epithels (= fokale oder multifokale Bereiche mit erhöhter Zellularität)	0	0/9	5/10* (1,2)	5/10* (1,4)	3/9 (2,0)
	13	0/5	1/5 (1,0)	4/5* (1,0)	3/5 (1,7)
	52	1/10 (3,0)	3/10 (1,3)	0/10	3/10 (1,0)
Granulomatöse Entzündung	0	0/9	5/10* (2,2)	7/10* (2,0)	6/9* (1,7)
	13	0/5	0/5	1/5 (1,0)	5/5* (1,8)
	52	0/10	0/10	0/10	2/10 (1,0)
Granulome, alveolär/bronchioläre Aufzweigungen (= fokale Akkumulation von Histiozyten/Makrophagen an den alveolär/bronchiolären Aufzweigungen)	0	0/9	3/10 (2,3)	6/10* (1,7)	7/9* (1,3)
	13	0/5	0/5	1/5 (1,0)	4/5* (1,0)
	52	0/10	0/10	0/10	0/10
Interstitielle Entzündung	0	3/9 (1,3)	6/10 (1,0)	5/10 (1,4)	8/9* (1,1)
	13	1/5 (1,0)	0/5	2/5 (1,0)	3/5 (1,3)
	52	2/10 (1,0)	2/10 (1,0)	2/10 (1,0)	4/10 (1,0)
Granulome mit Cholesterinspalten (= fokale Bildung von Granulomen mit Spalten)	0	0/9	0/10	0/10	2/9 (2,0)
	13	0/5	0/5	2/5 (1,0)	5/5* (1,6)
	52	0/10	0/10	1/10 (1,0)	3/10 (1,0)
Fremdmaterial in den Alveolen	0	0/9	1/10 (1,0)	10/10* (2,0)	9/9* (2,4)
	13	0/5	0/5	0/5	1/5 (1,0)
	52	0/10	0/10	0/10	0/10
Alveolarmakrophagen	0	2/9 (1,0)	8/10* (2,8)	10/10* (3,5)	9/9* (4,3)
	13	1/5 (1,0)	4/5 (1,0)	5/5* (1,8)	5/5* (2,0)
	52	4/10 (1,0)	5/10 (1,2)	5/10 (1,0)	5/10 (1,0)
Fibrogenese	0	0/9	0/10	0/10	0/9
	13	0/5	0/5	0/5	2/5 (1,0)
	52	0/10	0/10	0/10	2/10 (2,0)

UZP: Untersuchungszeitpunkt; UZP 0: nach 13 Wochen Exposition, UZP 13: nach 13-wöchiger Erholungszeit, UZP 52: nach 52-wöchiger Erholungszeit

\*p < 0,05

<sup>a)</sup> Angabe für das Ausmaß der Veränderung siehe Tabelle 3

**Tab. 3** Kriterien für Diagnose und Grad der Veränderungen, modifiziert nach Weber et al. (2018)

Veränderung	Beschreibung	Ausmaß
alveoläre Pneumozyten Typ II-Hyperplasie	Normale Architektur, jedoch sind die Alveolen vorwiegend von Typ-II-Zellen ausgekleidet	1 < 3 % der alveolär / bronchiolären Aufzweigungen betroffen 2 < 6 % der alveolär / bronchiolären Aufzweigungen betroffen 3 < 15 % der alveolär / bronchiolären Aufzweigungen betroffen 4 < 30 % der alveolär / bronchiolären Aufzweigungen betroffen 5 > 30 % der alveolär / bronchiolären Aufzweigungen betroffen

Tab. 3 (Fortsetzung)

Veränderung	Beschreibung	Ausmaß
Alveolär/bronchioläre Hyperplasie des Epithels	Fokale oder multifokale Bereiche mit erhöhter Zellularität, wobei die bronchioläre-alveoläre Architektur nachweisbar ist. Die Epithelzellen sind dominant und meist einschichtig.	1 ein Bereich (Fokus) minimal betroffen
		2 einige Bereiche (Fokus) minimal betroffen
		3 alle Bereiche (Fokus) minimal betroffen
		4 einige Bereiche (Fokus) mäßig betroffen
		5 einige Bereiche (Fokus) massiv vergrößert
Granulome, alveolär/ bronchioläre	Fokale Akkumulation von Histozyten/ Makrophagen an den alveolär/bronchiolären Aufzweigungen	1 < 5 Alveolen betroffen
		2 < 10 Alveolen betroffen
		3 < 20 Alveolen betroffen
		4 < 30 Alveolen betroffen
		5 > 30 Alveolen betroffen
Granulome mit Cholesterinspalten	Fokale Bildung von Granulomen mit Spalten	1 < 5 Alveolen betroffen
		2 < 10 Alveolen betroffen
		3 < 20 Alveolen betroffen
		4 < 50 Alveolen betroffen
		5 > 50 Alveolen betroffen
Fremdmateriale in den Alveolen	Rückstände der inhalierten Testsubstanz, welche im Alveolarlumen abgelagert wurde. Das Material zeigte sich in Form von kleinen feinkörnigen Partikeln, oft zusammen mit zellulären Resten von Makrophagen.	1 minimal, in ein oder zwei Alveolen
		2 bis zu 40% der Alveolen betroffen
		3 annähernd 40–60% der Alveolen betroffen
		4 annähernd 80–90% der Alveolen betroffen
		5 alle Alveolen betroffen
Alveolarmakrophagen	Isolierte reaktive Makrophagen innerhalb der Alveolarlumina, die inhaliertes Material im Zytoplasma enthalten (alveoläre Histozytose)	1 < 10% der Alveolen betroffen
		2 < 25% Alveolen betroffen
		3 < 50% Alveolen betroffen
		4 < 75% Alveolen betroffen
		5 > 75% Alveolen betroffen
Fibrogenese	Zunahme der Septum- oder interstitiellen Dicke aufgrund von Ödemen oder Entzündungen ohne wesentliche faserförmige Vernetzung. In der Studie ist dies assoziiert mit einer minimalen entzündlichen Infiltration, die als vollständig reversibel angesehen wird.	1 ein Bereich (Fokus) minimal betroffen
		2 einige Bereiche (Fokus) minimal betroffen
		3 alle Bereiche (Fokus) minimal betroffen
		4 einige Bereiche (Fokus) mäßig betroffen
		5 einige Bereiche (Fokus) massiv vergrößert

In einer von Fraunhofer ITEM (2020) durchgeführten 90-Tage-Inhalationsstudie, gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 413, wurden je 225 männliche und weibliche Wistar-Ratten [CrI:WI (Han)], an fünf Tagen pro Woche für sechs Stunden pro Tag, gegen zwei unterschiedliche synthetische amorphe Kieselsäuren über die Nase exponiert. Verwendet wurden Aerosole von SAS1-High BET (SAS1) und SAS2-Low BET (SAS2) mit Zielkonzentrationen von 0; 0,5; 1; 2,5 oder 5 mg/m<sup>3</sup>, welche innerhalb einer Spanne von 97–110 % nachweislich erreicht wurden. Bei der Testsubstanz SAS1 handelt es sich um eine synthetische amorphe Kieselsäure mit einer spezifischen Oberfläche von 400 m<sup>2</sup>/g, einer Primärpartikelgröße von 5–10 nm sowie einem MMAD von 2,08–3,04 µm. SAS2 ist eine synthetische amorphe Kieselsäure mit einer spezifischen Oberfläche von 40–50 m<sup>2</sup>/g, einer Primärpartikelgröße von 30–40 nm sowie einem MMAD von 1,30–2,20 µm. Die Löslichkeit der Testsubstanzen wurde mit zwei unterschiedliche Methoden (ICP-OES und photometrisch) bei 20 °C ermittelt. Die Löslichkeiten von SAS1 und SAS2 lagen bei 232,6 ± 6,8 mg/l (photometrisch) und 226,5 ± 10,5 mg/l (ICP-OES) bzw. bei 127,7 ± 7,3 mg/l (photometrisch) und 122,6 ± 11,7 mg/l (ICP-OES). Die höhere Löslichkeit von SAS1 wird durch einen höheren Anteil von OH-Gruppen, insbesondere von endständigen OH-Gruppen, an der Oberfläche bedingt. Die unterschiedlichen Anteile der OH-Gruppen an der Oberfläche wurden thermogravimetrisch nachgewiesen. Die Untersuchungen der Tiere erfolgten einen Tag (+1), 90 Tage (13 Wochen), 180 Tage (25 Wochen) oder 360 Tage (52 Wochen) nach Expositionsende mit Gruppenstärken von jeweils zehn männlichen und weiblichen Tieren zum Untersuchungszeitpunkt +1 und von jeweils fünf männlichen und weiblichen Tieren zu allen anderen Untersuchungszeitpunkten. Während des Untersuchungszeitraumes starben fünf Tiere ohne ursächlichen Zusammenhang mit der durchgeführten Exposition. Anzeichen für eine systemische Toxizität oder geschlechtsspezifische Unterschiede konnten nicht beobachtet werden. Die Entwicklungen des Körpergewichtes sowie des Futter- und Wasserkonsums der Versuchstiere unterlagen keinen statistisch signifikanten Abweichungen im Vergleich zu den

Kontrolltieren. Für SAS1 konnte ein statistisch signifikanter Anstieg des absoluten und relativen Lungengewichtes bei weiblichen Tieren der höchsten Konzentrationsgruppe (5 mg/m<sup>3</sup>) festgestellt werden, jedoch nicht mehr 13 Wochen nach der Exposition. Die Analyse der BALF ergab, unabhängig vom Geschlecht der Tiere, für SAS1 einen statistisch signifikanten Anstieg der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und eine statistisch signifikante Erniedrigung der Makrophagen in der mittleren (2,5 mg/m<sup>3</sup>) und hohen (5 mg/m<sup>3</sup>) Konzentrationsgruppe (Tabelle 4 und 5). In beiden Konzentrationsgruppen zeigte sich eine Erholung innerhalb von 13 Wochen. Für SAS2 konnte ein statistisch signifikanter Anstieg des absoluten und relativen Lungengewichtes für beide Geschlechter ab einer Konzentration von 1 mg/m<sup>3</sup> festgestellt werden. Dieser Effekt war in der hohen Konzentrationsgruppe 13 Wochen nach Expositionsende noch nachweisbar. Bei den mit SAS2 exponierten Tieren kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg der PMN in der BALF und zu einer statistisch signifikanten Erniedrigung der Makrophagen in allen Konzentrationsgruppen beider Geschlechter. Eine vollständige Erholung erfolgte bei 0,5 mg/m<sup>3</sup> innerhalb von 13 Wochen, bei 1 mg/m<sup>3</sup> innerhalb von 25 Wochen und ab 2,5 mg/m<sup>3</sup> innerhalb von 52 Wochen nach Expositionsende. IL-8 war in allen Konzentrationsgruppen beider Geschlechter, sowohl bei SAS1 als auch bei SAS2, statistisch signifikant erhöht.

**Tab. 4** Zytologische Parameter (Mittelwerte ± SD; n = 10) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach 90-tägiger inhalativer Exposition von männlichen Wistar-Ratten gegen SAS1 und SAS2 (Fraunhofer ITEM 2020)

	Leukozytenkonzentration (Zellen/ml)	Makrophagen (%)	PMN (%)	Lymphozyten (%)
Kontrolle	115 813 ± 38 494	98,6 ± 1,0	1,1 ± 0,9	0,3 ± 0,4
SAS1				
0,5 mg/m <sup>3</sup>	83 813 ± 22 021	94,1 ± 8,8	5,6 ± 8,8	0,3 ± 0,3
1 mg/m <sup>3</sup>	107 438 ± 33 005	89,4 ± 6,7	9,7 ± 5,8	1,0 ± 1,6
2,5 mg/m <sup>3</sup>	194 813 ± 79 578	77,8 ± 10,6***	21,5 ± 10,5***	0,7 ± 0,7
5 mg/m <sup>3</sup>	315 250 ± 233 570	51,0 ± 11,3***	48,3 ± 11,6***	0,7 ± 0,6
SAS2				
0,5 mg/m <sup>3</sup>	309 813 ± 193 092	73,2 ± 12,9***	25,9 ± 13,0***	0,9 ± 0,9
1 mg/m <sup>3</sup>	830 625 ± 398 652	58,0 ± 9,6***	41,6 ± 9,8***	0,5 ± 0,5
2,5 mg/m <sup>3</sup>	1 482 000 ± 949 026	51,7 ± 7,5***	48,2 ± 7,6***	0,2 ± 0,3
5 mg/m <sup>3</sup>	1 458 000 ± 590 279	46,4 ± 5,5***	52,9 ± 5,6***	0,7 ± 0,8

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; Dunnett-Test (siehe Text)

**Tab. 5** Zytologische Parameter (Mittelwerte ± SD; n = 10) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach 90-tägiger inhalativer Exposition von weiblichen Wistar-Ratten gegen SAS1 und SAS2 (Fraunhofer ITEM 2020)

	Leukozytenkonzentration (Zellen/ml)	Makrophagen (%)	PMN (%)	Lymphozyten (%)
Kontrolle	100 125 ± 36 235	99,1 ± 1,0	0,5 ± 1,0	0,4 ± 0,4
SAS1				
0,5 mg/m <sup>3</sup>	101 875 ± 26 321	99,5 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2
1 mg/m <sup>3</sup>	90 250 ± 20 188	96,5 ± 3,0	3,2 ± 3,0	0,3 ± 0,2
2,5 mg/m <sup>3</sup>	163 625 ± 73 594	70,0 ± 8,5***	29,0 ± 8,9***	1,0 ± 0,8
5 mg/m <sup>3</sup>	198 650 ± 87 015	60,8 ± 10,0***	38,4 ± 10,1***	0,8 ± 0,4
SAS2				
0,5 mg/m <sup>3</sup>	180 313 ± 71 973	77,7 ± 10,5***	21,3 ± 10,8***	1,0 ± 0,5
1 mg/m <sup>3</sup>	373 750 ± 109 795	59,2 ± 6,7***	40,4 ± 7,0***	0,5 ± 0,5
2,5 mg/m <sup>3</sup>	759 500 ± 484 018	53,9 ± 7,4***	45,4 ± 7,3***	0,7 ± 0,6
5 mg/m <sup>3</sup>	1 322 000 ± 558 774	49,5 ± 10,6***	49,5 ± 10,1***	1,0 ± 0,7

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; Dunnett-Test (siehe Text)

Die histologische Untersuchung der Nasenhöhle ergab eine Becherzellproliferation in der Schnittebene 1 konzentrationsunabhängig bei allen Expositionskonzentrationen für SAS1 (5, 6, 1, 3 Tiere in den 4 SAS1-Gruppen; Kontrolle: 0). Der Schweregrad nahm bis  $2,5 \text{ mg/m}^3$  nicht zu. In der Schnittebene 2 und im Nasen-Rachen-Gang (Ductus nasopharyngeus) traten Becherzellproliferationen nur bei der höchsten Expositionskonzentration auf. Im Studienverlauf zeigte sich eine erhöhte Inzidenz und stärkere Ausprägung von hyalinen Einschlüssen in der Riechschleimhaut bei exponierten Tieren. Zusätzlich wurden Chitinase-positive Kristalle in der Riechschleimhaut (Ebene 2–4) bis zur 26. Woche nach Expositionsende, insbesondere bei SAS1-exponierten Tieren, beobachtet.

Die makroskopische Untersuchung zeigte Verfärbungen in der Lunge von exponierten Tieren ab  $1 \text{ mg SAS2/m}^3$ . Die assoziierten entzündlichen Veränderungen nahmen an Inzidenz und/oder Schweregrad konzentrationsabhängig zu. Detaillierte Angaben zu den histopathologischen Befunden der Lunge sind in der [Tabelle 6](#) für SAS1 und der [Tabelle 7](#) für SAS2 aufgeführt. Eine Zunahme perivaskulärer Infiltrationen wurde für SAS1-Expositionen ab  $1 \text{ mg/m}^3$  und für SAS2-Expositionen bei allen Konzentrationen beobachtet. Alveolarmakrophagen und Makrophagen-Agglomeration nahmen bei beiden Testsubstanzen konzentrationsabhängig zu, wobei die SAS2-Gruppen stärker betroffen waren. Zu bemerken ist jedoch, dass die weiblichen Tiere der Kontrollgruppe, im Gegensatz zu den männlichen Tieren, eine hohe Inzidenz (8/10) für erhöhte Alveolarmakrophagenzahlen aufweisen. Diese Effekte sind nach Ansicht der Kommission jedoch nicht als advers anzusehen. Eine Makrophagen-Typ II-Hyperplasie trat bei SAS1-exponierten Tieren ab  $1 \text{ mg/m}^3$  (nur ein Tier betroffen) und vermehrt ab  $2,5 \text{ mg/m}^3$  auf. SAS2-exponierte Tiere waren auch hier insgesamt stärker und bereits ab  $0,5 \text{ mg/m}^3$  betroffen. Eine geringgradige interstitielle Entzündung wurde ab  $0,5 \text{ mg/m}^3$  beobachtet, allerdings zeigte sich keine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Eine geringgradige interstitielle Entzündung ließ sich bei allen Konzentrationsgruppen für SAS2 beobachten, wobei die SAS2-Gruppen höhere Inzidenzen im Vergleich zu den SAS1-Gruppen zeigten. Granulome an den bronchoalveolären Aufzweigungen wurden bei den männlichen Tieren der SAS1-Expositionsgruppen ab  $1 \text{ mg/m}^3$  und bei den weiblichen Tieren der höchsten Konzentrationsgruppe beobachtet. Männliche und weibliche Tiere der SAS2-Expositionsgruppen waren bei allen getesteten Konzentrationen betroffen. Diese Veränderungen waren bei Einzeltieren der SAS1-Gruppen mit einer geringgradigen bronchoalveolären Hyperplasie vergesellschaftet, während die Inzidenz in den SAS2-Gruppen deutlich höher lag. Zwei männliche Tiere und ein weibliches Tier der Kontrollgruppen waren von einer Fibrogenese betroffen. Bei den Tieren der SAS1-Gruppen wurde dieser Befund mit höherer Inzidenz als bei den Kontrolltieren ab  $1 \text{ mg/m}^3$  beobachtet. Bei den Tieren der SAS2-Gruppen lag die Inzidenz einer Fibrogenese bereits ab  $0,5 \text{ mg/m}^3$  deutlich höher. Eine Makrophagen-Agglomeration im Bronchus assoziierten lymphatischen Gewebe (BALT) konnte bei einem männlichen Tier der gegen  $1 \text{ mg SAS1/m}^3$  exponierten Gruppe diagnostiziert werden. Ab  $2,5 \text{ mg SAS1/m}^3$  nahm die Anzahl der betroffenen Tiere leicht zu. Bei den Tieren der SAS1-Gruppen wurde weder eine Hyperplasie noch eine granulomatöse Entzündung des BALT beobachtet. Im Vergleich traten bei den gegen SAS2 exponierten Tieren im BALT sowohl Hyperplasien als auch granulomatöse Entzündungen und Makrophagen-Agglomeration bereits ab  $0,5 \text{ mg/m}^3$  auf ([Tabelle 8](#) und [9](#)).

Histopathologische Befunde in den Lungen von SAS1-exponierten Tieren waren nach 13-wöchiger Erholungszeit, mit Ausnahme einer geringfügigen Alveolarmakrophagen-Agglomeration in den  $2,5$ - und  $5\text{-mg/m}^3$ -Konzentrationsgruppen, vollständig reversibel. Im Gegensatz hierzu lag die Erholungszeit bei SAS2-exponierten Tieren ab einer Expositionskonzentration von  $1 \text{ mg/m}^3$  bei über 52 Wochen. Eine interstitielle, nicht reversible Fibrose der Lunge oder ein Anstieg des Kollagengehaltes wurde weder durch SAS1 noch durch SAS2 verursacht. Die qualitativen Merkmale der Pathogenese und der pathologischen Befunde unterschieden sich zwischen den beiden SAS-Typen nicht (Fraunhofer ITEM 2020).

**Tab. 6** Durch SAS1 induzierte histologische Befunde in der Lunge nach 90-tägiger inhalativer Exposition von Wistar-Ratten (Fraunhofer ITEM 2020)

	Konzentration SAS1									
	0 mg/m <sup>3</sup>		0,5 mg/m <sup>3</sup>		1,0 mg/m <sup>3</sup>		2,5 mg/m <sup>3</sup>		5,0 mg/m <sup>3</sup>	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Anzahl Tiere	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Perivaskuläre Infiltrationen	1/1,0 <sup>a)</sup>	1/1,0	1/1,0	0	4/1,3	3/1,0	4/1,0	2/1,0	1/1,0	2/1,0
Alveolarmakrophagen	1/1,0	8/1,0	8/1,0	7/1,0	10/1,3	10/1,0	10/1,7	10/1,7	10/1,6	10/1,5
Makrophagenagglomeration	0	0	2/1,0	4/1,0	6/1,0	6/1,0	8/1,1	9/1,1	9/1,0	6/1,0
Makrophagen II-Hyperplasie	0	0	0	0	1/1,0	0	6/1,0	3/1,0	6/1,2	2/1,0
Entzündung, interstitielle	0	0	0	1/1,0	2/1,0	0	5/1,0	2/1,0	1/1,0	1/1,0
Granulome mit Cholesterin-Spalten	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Granulome (Verzweigung)	0	0	0	0	2/1,0	0	4/1,0	0	9/1,0	9/1,0
Alveolär/bronchioläre Hyperplasie	0	0	0	0	1/1,0	0	4/1,0	0	1/1,0	0
BALT Hyperplasie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BALT Makrophagenagglomeration	0	0	0	0	1/1,0	0	2/1,0	1/1,0	5/1,2	1/1,0
BALT granulomatöse Entzündung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT: Fibrogenese	2/1,0	1/1,0	0	1/1,0	3/1,0	1/1,0	6/1,0	5/1,0	8/1,0	7/1,0

<sup>a)</sup> Inzidenz/Schweregrad; Signifikanzen wurden nicht angegeben

BALT: Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe; MT: Masson-Trichrom-Färbung

**Tab. 7** Durch SAS2 induzierte histologische Befunde in der Lunge nach 90-tägiger inhalativer Exposition von Wistar-Ratten (Fraunhofer ITEM 2020)

	Konzentration SAS2									
	0 mg/m <sup>3</sup>		0,5 mg/m <sup>3</sup>		1,0 mg/m <sup>3</sup>		2,5 mg/m <sup>3</sup>		5,0 mg/m <sup>3</sup>	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Anzahl Tiere	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Perivaskuläre Infiltrationen	1/1,0 <sup>a)</sup>	1/1,0	6/1,2	1/1,0	6/1,7	4/1,0	4/1,0	6/1,0	6/1,3	7/1,1
Alveolarmakrophagen	1/1,0	8/1,0	10/1,8	10/1,9	10/2,4	10/2,3	10/2,8	10/2,9	10/2,9	10/3,0
Makrophagenagglomeration	0	0	10/1,5	10/1,3	8/1,3	9/1,3	9/1,4	8/1,4	9/1,6	10/1,8
Makrophagen II-Hyperplasie	0	0	7/1,0	7/1,1	8/1,5	9/1,6	10/1,6	10/1,1	10/1,8	9/1,4
Entzündung, interstitielle	0	0	10/1,4	10/1,1	10/1,8	7/1,6	7/1,0	9/1,7	10/1,4	10/1,7
Granulome mit Cholesterin-Spalten	0	0	0	0	0	0	1/1,0	0	0	0
Granulome (Verzweigung)	0	0	9/1,2	5/1,6	6/1,7	6/1,5	9/1,2	6/1,5	9/1,2	5/1,2
Alveolär/bronchioläre Hyperplasie	0	0	7/1,1	1/1,0	3/1,0	1/1,0	0	1/1,0	1/1,0	1/1,0
BALT Hyperplasie	0	0	1/1,0	0	0	0	0	1/2,0	0	0
BALT Makrophagenagglomeration	0	0	4/1,0	4/1,0	6/1,5	1/1,0	2/1,5	4/1,8	6/1,8	6/1,7
BALT granulomatöse Entzündung	0	0	0	1/2,0	0	0	0	5/1,8	1/1,0	2/1,5
MT: Fibrogenese	2/1,0	1/1,0	7/1,0	9/1,0	6/1,0	7/1,0	7/1,0	9/1,0	10/1,0	7/1,0

<sup>a)</sup> Inzidenz/Schweregrad; Signifikanzen wurden nicht angegeben

BALT: Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe; MT: Masson-Trichrom-Färbung

Nach Beendigung der Exposition zeigten sich in der makroskopischen Untersuchung vergrößerte Lymphknoten bei SAS1-exponierten Tieren ab 1 mg/m<sup>3</sup> und bei SAS2-exponierten Tieren in allen Konzentrationsgruppen. In den mediastinalen und tracheobronchialen Lymphknoten wurden Granulome bei den gegen SAS1 exponierten Tieren ab 1 mg/m<sup>3</sup>

beobachtet. Eine granulomatöse Entzündung betraf ausschließlich männliche Tiere der SAS1-Gruppen ab 2,5 mg/m<sup>3</sup>. Eine lymphoide Hyperplasie konnte in allen Konzentrationsgruppen sowohl mit SAS1 als auch SAS2 beobachtet werden. Der Effekt zeigte sich jedoch nicht konzentrationsabhängig. Granulome und granulomatöse Entzündungen traten bei den gegen SAS2 exponierten Tieren bereits ab der geringsten Konzentration auf. Zudem wurde eine Fibrogenese oder Fibrose bei Tieren der gegen SAS2 exponierten Gruppen diagnostiziert. Insgesamt zeigten sich im Vergleich zu den SAS1-Gruppen die Effekte in den SAS2-Gruppen deutlicher und mit einer höheren Inzidenz (Tabelle 8 und 9) (Fraunhofer ITEM 2020).

**Tab. 8** Durch SAS1 induzierte histologische Befunde in den mediastinalen und tracheobronchialen Lymphknoten am Tag nach Expositionsende (+1) (Fraunhofer ITEM 2020)

	Konzentration SAS1									
	0 mg/m <sup>3</sup>		0,5 mg/m <sup>3</sup>		1,0 mg/m <sup>3</sup>		2,5 mg/m <sup>3</sup>		5,0 mg/m <sup>3</sup>	
<b>Mediastinale Lymphknoten</b>										
Geschlecht	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Anzahl Tiere	7	2	6	7	6	4	6	8	10	8
Granulome	0	0	0	0	2/2,0 <sup>a)</sup>	2/1,0	5/2,0	6/1,3	0	4/2,3
Granulomatöse Entzündung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymphoide Hyperplasie	0	0	0	0	2/2,0	1/2,0	4/2,0	3/2,0	0	0
MT: Fibrogenese	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT: Fibrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Tracheobronchiale Lymphknoten</b>										
Geschlecht	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Anzahl Tiere	10	9	10	6	8	8	7	8	10	9
Granulome	0	0	0	0	2/1,5	3/1,7	4/2,0	6/1,8	10/2,5	9/2,7
Granulomatöse Entzündung	0	0	0	0	0	0	4/2,0	0	1/1,0	0
Lymphoide Hyperplasie	0	0	1/2,0	1/1,0	0	1/2,0	2/1,5	2/1,5	1/2,0	3/1,0
MT: Fibrogenese	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT: Fibrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a)</sup> Inzidenz/Schweregrad; Signifikanzen wurden nicht angegeben  
MT: Masson-Trichrom-Färbung

**Tab. 9** Durch SAS2 induzierte histologische Befunde in den mediastinalen und tracheobronchialen Lymphknoten am Tag nach Expositionsende (+1) (Fraunhofer ITEM 2020)

	Konzentration SAS2									
	0 mg/m <sup>3</sup>		0,5 mg/m <sup>3</sup>		1,0 mg/m <sup>3</sup>		2,5 mg/m <sup>3</sup>		5,0 mg/m <sup>3</sup>	
<b>Mediastinale Lymphknoten</b>										
Geschlecht	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Anzahl Tiere	7	2	9	9	10	10	10	10	9	8
Granulomatöse Entzündung	0	0	2/1,5 <sup>a)</sup>	4/2,5	8/1,1	9/2,2	9/1,9	10/2,0	1/2,0	5/2,0
Lymphoide Hyperplasie	0	0	8/1,8	6/1,5	10/2,0	9/2,2	10/2,2	10/2,2	0	4/2,0
MT: Fibrogenese	0	0	0	2/1,0	9/1,0	5/1,0	8/1,0	6/1,0	0	3/1,0
MT: Fibrose	0	0	0	1/1,0	0	1/1,0	3/1,3	6/1,2	0	2/1,0

Tab. 9 (Fortsetzung)

	Konzentration SAS2									
	0 mg/m <sup>3</sup>		0,5 mg/m <sup>3</sup>		1,0 mg/m <sup>3</sup>		2,5 mg/m <sup>3</sup>		5,0 mg/m <sup>3</sup>	
<b>Tracheobronchiale Lymphknoten</b>										
Geschlecht	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Anzahl Tiere	10	9	10	9	9	7	10	6	10	9
Granulome	0	0	4/3,0	6/2,5	2/2,0	5/2,2	3/3,0	4/2,8	10/3,8	9/3,6
Granulomatöse Entzündung	0	0	6/1,8	2/2,0	4/2,3	2/2,5	6/3,0	3/2,0	7/1,9	8/2,0
Lymphoide Hyperplasie	0	0	5/2,0	0	2/2,0	1/1,0	5/2,0	0	10/1,8	6/2,2
MT: Fibrogenese	0	0	1/1,0	2/1,0	0	3/1,0	2/1,0	2/1,0	2/1,0	1/1,0
MT: Fibrose	0	0	0	0	2/1,0	1/2,0	6/1,0	0	9/1,3	8/1,3

<sup>a)</sup> Inzidenz/Schweregrad; Signifikanzen wurden nicht angegeben  
 MT: Masson-Trichrom-Färbung

**Fazit:** Der prozentuale Anteil an PMN und die Makrophagenzahl in der BALF war bei SAS1 ab 2,5 mg/m<sup>3</sup> und bei SAS2 ab 0,5 mg/m<sup>3</sup> statistisch signifikant erhöht. Der Dunnett-Test weist zwar für 1 mg/m<sup>3</sup> keine statistische Signifikanz bei den PMN aus, ist aber nicht für die Auswertung von varianzinhomogenen Daten, wie hier, geeignet. Bei nachträglicher Auswertung mit dem Games-Howell-Test ist auch bei 1 mg SAS1/m<sup>3</sup> der prozentuale Anteil an PMN statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht. Histologisch wurden bei SAS1 erste konzentrationsabhängige Effekte bei 1 mg/m<sup>3</sup>, die jedoch noch nicht statistisch signifikant waren, und bei SAS2 deutlich stärkere Effekte bei 0,5 mg/m<sup>3</sup> ermittelt. Dies betraf interstitielle Entzündung, Zunahme an Granulomen, alveolär/bronchioläre Hyperplasie und das Auftreten einer Fibrogenese. Auch die in den Lymphknoten aufgetretenen Entzündungen waren bei SAS2 stärker ausgeprägt als bei SAS1 und begannen bereits ab der niedrigsten Konzentration von 0,5 mg/m<sup>3</sup>. In dieser Studie wurde von den Autoren für den Tag nach Expositionsende (+1) eine NOAEC für histopathologische Befunde von 1 mg/m<sup>3</sup> für SAS1-High BET und eine LOAEC von 0,5 mg/m<sup>3</sup> für SAS2-Low BET ermittelt. Aufgrund der interstitiellen Entzündung und der Granulome bei je zwei von zehn männlichen Tieren und des bei den männlichen Tieren auf das 10-Fache erhöhten Anteils an PMN bei 1 mg SAS1/m<sup>3</sup> wird diese Konzentration von der Kommission als LOAEC angesehen. Die NOAEC beträgt 0,5 mg SAS1/m<sup>3</sup>.

In einer Inhalationsstudie wurden die Auswirkungen von drei verschiedenen Typen synthetischer amorpher Kieselsäure (Gelkieselsäure (silica G), Fällungskieselsäure (silica P) und pyrogene Kieselsäure (silica F)) in einer Konzentration von je 15 mg/m<sup>3</sup> an je zehn männlichen Cynomolgus-Affen, 80 männlichen Sprague-Dawley-Ratten und 20 männlichen Hartley-Meerschweinchen untersucht. Die Tiere wurden 5,5–6 Stunden pro Tag an fünf Tagen pro Woche über einen Zeitraum von bis zu 18 Monaten exponiert. Eine histopathologische Untersuchung erfolgte bei den Ratten nach 3, 6 und 12 Monaten, bei den Meerschweinchen nach 12 Monaten und bei den Affen nach 13 Monaten (Gelkieselsäure und pyrogene Kieselsäure) und 18 Monaten (Fällungskieselsäure). Die Rattenlungen enthielten nur ca. 10 % der Menge an amorphen Kieselsäuren, die in den Affenlungen nachgewiesen wurde. Bei den Affen konnten in der Lunge partikelbeladene Makrophagen sowie Zellinfiltrate festgestellt werden, während diese Effekte bei den Ratten und Meerschweinchen deutlich geringer ausgeprägt waren. Bei sechs von neun der gegen pyrogene Kieselsäure exponierten Affen wurden Granulome in den Alveolen diagnostiziert, die in 5 bis 50 % der Fälle kollagenhaltig waren. Bei drei Affen konnte in den Granulomen sowie im Lungeninterstitium aller Affenproben kein oder kaum Kollagen nachgewiesen werden. Bei einigen der untersuchten Ratten zeigte sich eine interstitielle Fibrose, die allerdings auch bei einigen Kontrolltieren befundet wurde. Im Gegensatz zu den Affen wurden die Lungenschnitte der Ratten nicht mit Spezialfärbungen auf Reticulin/Kollagen untersucht. Bei einigen Affen aus jeder Gruppe (inkl. Kontrolle) wurden unterschiedliche Mengen von Mica („KAlSiO<sub>3</sub>“) und Kaolin („AlSiO<sub>3</sub>“) festgestellt. Dieses Ergebnis hatte aber, laut Autoren, keinen Einfluss auf die festgestellten Effekte. Zum einen, weil Lungen mit diesem Befund nicht vermehrt Reticulin/Kollagen enthielten, und zum anderen, weil in der kollagenreichsten Gruppe (pyrogene Kieselsäure) kein Mica oder Kaolin nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich lag auch in den Mica-haltigen Lungen der Kontrolltiere kein Kollagen vor. Wie es zu der Mica- bzw. Kaolinexposition kam, ist unbekannt (Groth et al. 1981). Aus der angegebenen Größenverteilung der Partikel

lässt sich berechnen, dass maximal 42 % der Partikelmasse von  $15 \text{ mg/m}^3$  unter einem aerodynamischen Durchmesser von  $3,3 \text{ }\mu\text{m}$  lag. Laut der OECD-Prüfrichtlinie 412 für Ratten-Inhalationsstudien soll der MMAD nicht über  $3 \text{ }\mu\text{m}$  liegen. Die alveolengängige Partikelmasse für die Ratte läge damit in dieser Studie bei maximal  $6,3 \text{ mg/m}^3$ . Im Gegensatz hierzu würden ca. 80 % ( $12 \text{ mg/m}^3$ ) in die Lungenalveolen der Affen gelangen.

### 5.2.2 Orale Aufnahme

Vier verschiedene, teilweise oberflächenbehandelte Formen von amorpher Kieselsäure wurden in einer 28-Tage-Studie an männlichen und weiblichen Wistar-Ratten (CrI:WI(Han)) mittels Schlundsonde als Limit-Test mit einer Dosis von 0 oder  $1000 \text{ mg/kg KG}$  und Tag verabreicht. Alle vier Formen wiesen eine mittlere Partikelgröße von  $15 \text{ nm}$  auf. Die Studie wurde gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 407 durchgeführt. Keiner der verwendeten Kieselsäure-Typen führte zu adversen substanzbedingten Effekten (Buesen et al. 2014).

Die vier Wochen andauernde, tägliche Gabe mittels Schlundsonde von verschiedenen synthetischen amorphen Kieselsäuren (NM-200, UB19157, Aerosil R 504) in Dosen von bis zu  $1000 \text{ mg/kg KG}$  und Tag führte bei Ratten zu keinen substanzbedingten Symptomen. Auch eine Fütterungsstudie mit pyrogener Kieselsäure (8157-7) in Konzentrationen von bis zu  $2250 \text{ mg/kg Futter}$  (entspricht  $188 \text{ mg/kg KG}$ ), die unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben durchgeführt wurde, ergab keine substanzbedingten Symptome (ECHA 2021).

Es sind weitere orale Studien im REACH-Registrierungsdossier beschrieben. In keiner dieser Studien konnten Hinweise auf eine substanzspezifische Toxizität festgestellt werden (ECHA 2021).

In einer Studie wurde pyrogene synthetische amorphe Kieselsäure (SAS) in Dosen von 0, 100, 1000 oder  $2500 \text{ mg/kg KG}$  und Tag sowie eine weitere Form (NM-202) in Dosen von 0, 100, 500 oder  $1000 \text{ mg/kg KG}$  und Tag mit dem Futter an je fünf männliche SD-Ratten 28 Tage lang verabreicht. Die jeweils höchste Dosis wurde 84 Tage lang verabreicht. Die Partikelgrößen der verwendeten SAS lagen zwischen 10 und  $25 \text{ nm}$ , die spezifische Oberfläche lag bei  $200 \text{ m}^2/\text{g}$  und die Reinheit der Substanz lag bei  $\geq 99,9 \%$ . Die NM-202-Partikel wiesen eine mittlere Größe von  $7 \text{ nm}$  und eine spezifische Oberfläche von  $380 \text{ m}^2/\text{g}$  bei einem Reinheitsgrad von  $\geq 99,8 \%$  auf. Nach 84-tägiger Exposition zeigten sich nur mit SAS Ablagerungen in der Milz. Die höchste Dosis beider Substanzen führte zu erhöhten Inzidenzen von Leberfibrose, welche nur bei NM-202-exponierten Tieren statistisch signifikant war. Dieser Effekt ging mit mäßigen, aber statistisch signifikant erhöhten Expressionen von Fibrose-bezogenen Genen in der Leber einher (van der Zande et al. 2014).

In einer Kommentierung der Studie von van der Zande et al. (2014) werden deren Ergebnisse in Frage gestellt. In einer ausführlichen Begründung werden die Schwächen der Studie in Bezug auf die verwendeten Methoden zur Charakterisierung des Materials, das Studiendesign, die Definitionen und die Ermittlung der Endpunkte sowie der durchgeführten statistischen Auswertung dargestellt (Morfeld et al. 2017).

### 5.2.3 Dermale Aufnahme

In einer Studie aus dem Jahr 1958 wurde zwei männlichen und zwei weiblichen Kaninchen pro Gruppe  $5000$  oder  $10000 \text{ mg Cab-O-Sil/kg KG}$  und Tag an 18 Stunden pro Tag und an fünf Tagen pro Woche für drei Wochen in  $0,5 \%$  Methylcellulose auf die intakte oder abgeschabte Haut aufgetragen. Das Körpergewicht war unverändert. Laut Angaben in der Zusammenfassung gab es, außer einer Irritation an der Applikationsstelle, keine histopathologischen adversen substanzbedingten Befunde (ECHA 2021).

In einer Studie mit subchronischer Behandlungsdauer an zehn männlichen und zehn weiblichen Sprague-Dawley-Ratten pro Gruppe wurde die Toxizität kolloidaler Kieselsäure-Partikel mit  $20 \text{ nm}$  Durchmesser durch dermale Exposition nach OECD-Prüfrichtlinie 411 untersucht. Den Tieren wurden Dosen von 0, 500, 1000 oder  $2000 \text{ mg/kg KG}$  und Tag 90 Tage lang auf die Haut aufgetragen. Hierfür wurde eine mit  $\text{SiO}_2$ -Nanopartikel-Lösung getränkte Gaze auf eine haarfreie Stelle am Rücken der Tiere für sechs Stunden täglich befestigt. Im Verlauf der Studie und während der Nachbeobachtung an je fünf männlichen und fünf weiblichen zusätzlichen Tieren der Dosisgruppen 0 und  $2000 \text{ mg/kg KG}$  traten Effekte wie verringerte Wasseraufnahme oder eine reversible Alopezie bei einem weiblichen Tier (46.–49. Tag) der  $500\text{-mg/kg}$ -Gruppe auf. Es zeigten sich keine Reizwirkungen oder histologischen Veränderungen

durch SiO<sub>2</sub> an der Haut. Einige unbedeutende pathologische Veränderungen konnten in den Organen beobachtet werden. Die beschriebenen Effekte waren jedoch nicht dosisabhängig und wurden daher als zufällig bewertet. Einige hämatologische (Lymphozyten erhöht, Neutrophile verringert) und klinische Parameter (Kreatininkinase verringert, ALT erhöht) zeigten Veränderungen, die ebenfalls als zufällig bewertet wurden, da keine entsprechenden Änderungen des klinischen Erscheinungsbildes oder bei der histopathologischen Untersuchung auftraten (Ryu et al. 2014).

#### 5.2.4 Intraperitoneale Aufnahme

Die Studien sind im [Abschnitt 5.7](#) zusammengefasst.

#### 5.2.5 Intratracheale Aufnahme

Die Studien sind im [Abschnitt 5.7](#) zusammengefasst.

#### 5.2.6 Intravenöse Aufnahme

Männliche und weibliche Balb/c-Mäuse und weibliche C57BL/6-Mäuse wurden gegen feine Kieselsäurepartikel mit einer Größe von 70 nm in Dosen von 0, 30 oder 40 mg/kg KG und Tag exponiert. Die Partikel wurden über einen Zeitraum von vier Wochen zweimal wöchentlich intravenös injiziert. Die genaue Art der verwendeten Kieselsäuren wurde nicht beschrieben. Die verwendeten Materialien wurden lediglich als SP70, SP70-N und SP70-C bezeichnet, was Kieselsäurepartikeln mit einem Durchmesser von 70 nm entspricht, deren Oberfläche nicht oder mit einer Amino- bzw. Carboxylgruppe modifiziert wurde. Bei den exponierten Tieren zeigten sich Leberschäden in Form von Fibrosen, allerdings bei den Oberflächen-modifizierten Materialien in geringerem Umfang als beim unbehandelten SP70. Bei SP70-N und SP70-C wurde außerdem ein signifikanter dosisabhängiger Anstieg der ALT verzeichnet (Fruijtier-Pöloth 2012; Isoda et al. 2011).

### 5.3 Wirkung auf Haut und Schleimhäute

#### 5.3.1 Haut

Insgesamt wurden zur Untersuchung der Hautirritation 19 Studien mit verschiedenen amorphen Kieselsäuren (BET 45–700 m<sup>2</sup>/g) an Kaninchen durchgeführt. Die Testsubstanzen wurden sowohl auf intakter Haut als auch auf abradierter Haut bis zu 24 Stunden lang aufgetragen. Die Ergebnisse der Studien zeigten keine bis höchstens minimale irritative Wirkungen auf die Haut, was auf die hygroskopische Eigenschaft des Materials und seine mechanische Wirkung zurückzuführen ist (ECHA 2021).

#### 5.3.2 Auge

Insgesamt wurden zur Untersuchung der Augenirritation 24 Studien mit verschiedenen amorphen Kieselsäuren (BET 45–700 m<sup>2</sup>/g) an Kaninchen durchgeführt. Die Wirkung der amorphen Kieselsäuren am Auge variierte zwischen keinen irritativen Reaktionen und Konjunktivitis mit vollständiger Genesung innerhalb von 48 Stunden. Es traten keine statistisch signifikanten Schäden oder irreversible Irritationen an den Augen auf. Die geringe irritative Wirkung am Auge wurde auf die hygroskopische Eigenschaft des Materials und seine Fremdkörperwirkung (mechanische Wirkung) zurückgeführt (ECHA 2021).

### 5.4 Allergene Wirkung

In einem modifizierten, nicht nach OECD-Prüfrichtlinien durchgeführten Local Lymph Node Assay (LLNA) wurde jeweils fünf weiblichen BALB/c-Mäusen vom ersten bis zum dritten Tag eine Zubereitung von 1 mg nanopartikulärer kolloidaler oder mesoporöser Kieselsäure in Ethanol auf beide Ohren appliziert. Kontrolltiere erhielten ein Gemisch aus Aceton und Olivenöl (4:1). An diesen Tagen sowie am vierten und sechsten Tag erfolgte außerdem eine Messung

der Ohrdicke, und am sechsten Tag wurde den Tieren schließlich  $^3\text{H}$ -Thymidin injiziert. Fünf Stunden später erfolgte die Exzision der aurikulären Lymphknoten. Die Autoren diskutieren aufgrund der vom zweiten bis zum sechsten Tag ermittelten (sehr) geringen Zunahme der Ohrdicke ein positives Ergebnis für kolloidale Kieselsäure (Lee et al. 2011). Aufgrund der fehlenden Zunahme der Lymphozytenproliferation am sechsten Tag ist das Ergebnis als negativ zu werten. Im Registrierungsdossier zur synthetischen amorphen Kieselsäure sind weitere Studien zur sensibilisierenden Wirkung mit ähnlichen Substanzen aufgeführt, beispielsweise zu den CAS-Nummern 126877-03-0, 67762-90-7 und 68909-20-6 (ECHA 2021). Diese lieferten ebenfalls negative Testergebnisse, werden jedoch aufgrund der chemischen Modifikationen nicht zur Bewertung herangezogen.

## 5.5 Reproduktionstoxizität

### 5.5.1 Fertilität

In einer Zwei-Generationen-Studie nach der OECD-Prüfrichtlinie 416 wurden 0, 100, 300 oder 1000 mg synthetische amorphe Kieselsäure (NM-200, präzipitiert)/kg KG und Tag per Schlundsonde an jeweils 28 männliche und weibliche Wistar-Ratten pro Dosisgruppe verabreicht. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der amorphen Kieselsäurepartikel (Dispersion in 0,5 % wässriger Methylhydroxypropylcellulose) variierte in der 10-g/l-Probe zwischen 1076 und 1664 nm und in der 30-g/l-Probe zwischen 876 und 1216 nm. Der Durchmesser in der 100-g/l-Probe schien mit 409–703 nm der kleinste zu sein, aber aufgrund der hohen Konzentration der Partikel in der Probe sedimentierten und agglomerierten die Partikel. Bis zur höchsten Dosis wurden keine adversen Effekte bei den Elterntieren bezüglich Toxizität und Fertilität festgestellt. Als NOAEL wurden 1000 mg/kg KG und Tag für die Toxizität bzw. für die Fertilität der Elterntiere festgelegt (Wolterbeek et al. 2015).

In einer nicht nach OECD-Prüfrichtlinie durchgeführten und zum Teil limitierten Generationenstudie konnten bei der Verabreichung von 500 mg synthetischer amorpher Kieselsäure (pyrogen)/kg KG und Tag über das Futter bei Wistar-Ratten keine adversen Effekte in Bezug auf die Fertilität oder die perinatale Toxizität festgestellt werden. Die Studie umfasst nur eine Dosierung und die Zahl der Tiere war gering (ECETOC 2006; EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) et al. 2018; Fruijtier-Pölloth 2016; Lewinson et al. 1994).

### 5.5.2 Entwicklungstoxizität

In einer pränatalen Entwicklungstoxizitätsstudie nach der OECD-Prüfrichtlinie 414 wurde synthetische amorphe Kieselsäure in Form von Nanopartikeln in Dosierungen von 0, 100, 300 oder 1000 mg/kg KG und Tag an Wistar-Ratten per Schlundsonde vom sechsten bis zum 19. Trächtigkeitstag verabreicht. Die primären Partikel (NM-200) bestanden aus präzipitierter amorpher Kieselsäure mit einem  $\text{SiO}_2$ -Anteil von 96,5 % und wiesen eine Größe von 10–25 nm auf. Bis zur höchsten Dosis wurde keine maternale Toxizität beobachtet. Fetengewicht und Anzahl der Feten zeigten keine Abweichungen zur Kontrollgruppe. Ebenso wenig wurde bei den Feten ein substanzbezogener Anstieg der Fehlbildungs- und Variationsrate festgestellt. Der NOAEL für Entwicklungstoxizität und für Maternaltoxizität beträgt 1000 mg/kg KG und Tag, die höchste getestete Dosis (Hofmann et al. 2015).

In der im [Abschnitt 5.5.1](#) beschriebenen Zwei-Generationen-Studie an Wistar-Ratten wurden bis zur höchsten getesteten Dosis von 1000 mg/kg KG und Tag keine adversen Effekte bei den Nachkommen bezüglich der Wurfparameter der F1- und F2-Generation, der sexuellen Reifung und des Östruszyklus der F1-Generation festgestellt. Der NOAEL für Maternaltoxizität beträgt 1000 mg/kg KG und Tag (Wolterbeek et al. 2015). Es lässt sich ein NOAEL für perinatale Toxizität von 1000 mg/kg KG und Tag ableiten.

Eine zum Teil limitierte, orale Studie mit synthetischen amorphen Kieselsäuren (Gel) zeigte bei Wistar-Ratten, CD-1-Mäusen, Dutch-Belted-Kaninchen und Hamstern keine adversen Effekte auf die Fertilität und keine pränatale Entwicklungstoxizität bis zu den höchsten getesteten Dosierungen von 1350 mg/kg KG und Tag (Ratte, Maus) bzw. 1600 mg/kg KG und Tag (Kaninchen, Hamster) (ECETOC 2006; EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) et al. 2018; Fruijtier-Pölloth 2016). Die Dokumentation sowie die statistische Analyse sind weder

ausreichend noch sind die Studien nach heute gültigen OECD-Prüfrichtlinien durchgeführt worden. Daher können die Studien nicht zur Bewertung herangezogen werden.

## 5.6 Genotoxizität

### 5.6.1 In vitro

In diversen bakteriellen Mutagenitätstests mit den Salmonella-typhimurium-Stämmen TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 und E. coli trat mit und ohne Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems keine durch Kieselsäure verursachte Mutagenität auf. Ebenso konnten in verschiedenen Säugetierzelllinien durch amorphe Kieselsäure keine Chromosomenaberrationen induziert werden. Sowohl im TK<sup>+/-</sup>-Mutationstest mit L5178Y-Mauslymphomzellen als auch im HPRT-Genmutationstest mit CHO-Zellen wurden keine durch Kieselsäure hervorgerufenen Mutationen beobachtet (ECHA 2021).

Nanopartikel von zwei pyrogenen, einem präzipitierten und zwei kolloidalen Typen amorpher Kieselsäuren wurden in einem Comet-Assay hinsichtlich der Verursachung von DNA-Strangbrüchen untersucht. Hierzu wurden 3T3-L1-Fibroblasten drei, sechs und 24 Stunden mit 0, 4 oder 40 µg/ml des Stoffes inkubiert. Bei beiden Konzentrationen wurde keine statistisch signifikant erhöhte Häufigkeit von DNA-Strangbrüchen beobachtet (Barnes et al. 2008).

Im Comet-Assay zeigten amorphe Kieselsäuren mit mittleren Partikelgrößen von 15 oder 55 nm ab 100 µg/ml bzw. ab 300 µg/ml relevante DNA-Schädigungen in V79-Zellen bei nicht zytotoxischen Konzentrationen. Der Test auf Induktion von DNA-Strangbrüchen mittels der Technik der alkalischen Entwindung ergab nur bei den 15 nm großen Partikeln bei 100 µg/ml eine statistisch signifikant erhöhte Inzidenz an DNA-Strangbrüchen. Oxidative Basenveränderungen, die durch Messung Fpg-sensitiver Stellen bestimmt wurden, traten nicht auf (Maser et al. 2015).

Die nanoskaligen amorphen Kieselsäuren SiNP12 (12 nm), SiNP5-15 (5–15 nm) und SiNP10-20 (10–20 nm) sowie SiP2 (2 µm) wurden in Lungenepithelzellen (FE1) von Muta<sup>TM</sup>-Mäusen auf ihre Zytotoxizität und Genotoxizität untersucht. Der hydrodynamische Durchmesser im Medium wurde mittels DLS („dynamic light scattering“) und die primäre Partikelgröße mittels TEM gemessen. Die primären Partikelgrößen entsprachen den Herstellerangaben. Die amorphe Kieselsäure SiP2 wies im TEM auch Partikel in der Größe von 1 µm auf. Eine Untersuchung auf chemische Verunreinigungen erfolgte mittels ICP-MS („inductively coupled plasma mass spectrometry“). Es konnten Spuren von Natrium, Aluminium, Calcium, Titan, Eisen und Zirkonium nachgewiesen werden. Die Zytotoxizität wurde 24 Stunden nach Exposition gegen 0; 12,5; 25 oder 50 µg/ml mittels Trypan-Blau-Färbung gemessen. In einer Vorstudie führten 100 µg/ml und Konzentrationen darüber zu einem vollständigen Zelltod. Die Zellviabilität verringerte sich mit steigender Konzentration und lag für die geringste Konzentration zwischen 53 % und 95 %. Die kleineren Partikel zeigten eine stärkere zytotoxische Wirkung. Sieben Tage nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit 12,5 µg/ml der Partikel war die Anzahl der gebildeten Kolonien (Maß für die Proliferationsfähigkeit der Zellen) nur mit SiNP12 statistisch signifikant reduziert. Es kam zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit der stärksten Induktion durch SiP2 (SiP2 > SiNP12 > SiNP10-20 > SiNP5-15) und es zeigte sich ein biphasischer Verlauf. Die gleichzeitig bestimmten Glutathion-Spiegel zeigten entgegengesetzte Verläufe zum Anstieg oder Abfall der ROS. Für den Mikronukleus-Test und den lacZ-Mutationstest wurde lediglich die Konzentration 12,5 µg/ml ausgewertet, da höhere Konzentrationen zur Induktion von Zelltod führten. Eine statistisch signifikant erhöhte Mikronukleusbildung wurde bei Exposition der Zellen gegen die Partikel SiNP12 (1,62-fach), SiNP5-15 (1,74-fach) und SiNP10-20 (1,5-fach) beobachtet. SiP2 führte nicht zur Induktion von Mikronuklei. Den Autoren zufolge korrelierte der Anstieg an Mikronuklei mit zunehmender Oberfläche der SiNP-Spezies. Durch die verschiedenen SiNP-Spezies wurden keine Mutationen im lacZ-Gen induziert (Decan et al. 2016). Allerdings wurden für den Mikronukleustest nur 1000 Zellen pro Experiment statt der in der Prüfrichtlinie geforderten 2000 Zellen ausgewertet und zudem nur eine Konzentration verwendet.

Humane periphere Lymphozyten zeigten keine erhöhte Häufigkeit an Mikronuklei nach 24-stündiger Inkubation mit amorphen Kieselsäuren mit einer mittleren Partikelgröße von 15 nm (Levasil<sup>®</sup> 200/40) und 55 nm (Levasil<sup>®</sup> 50/50) in Konzentrationen von 31,6–1000 µg/ml. Die höchste getestete Konzentration von 1000 µg/ml führte bei den 15 nm großen Partikeln zu Präzipitaten (Downs et al. 2012).

Amorphe Kieselsäuren mit einer mittleren Partikelgröße von 15 nm (Levasil® 200/40) und 55 nm (Levasil® 50/50) wurden in Caco-2-Zellen auf ihre genotoxische Wirkung untersucht. Im „cytokinesis-block micronucleus assay“, gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 487, erhöhte sich die Anzahl der Mikronuklei in zweikernigen Zellen konzentrationsabhängig nur bei den 15 nm großen Partikeln, hier bereits ab 16 µg/ml, einer noch nicht zytotoxischen Konzentration. Vermehrte H2AX-Phosphorylierung trat nur bei den 15 nm großen Partikeln auf. Da parallel Apoptose beobachtet wurde, handelt es sich bei den DNA-Schäden, vermutlich Doppelstrangbrüche, um einen indirekten Effekt. Statistisch signifikante Zytotoxizität der 15 nm großen Partikel trat bei 32 µg/ml auf. Für die 55 nm großen Partikel wurden bis zu einer Konzentration von 120 µg/ml keine zytotoxischen Effekte festgestellt (Tarantini et al. 2015 b).

### 5.6.2 In vivo

Nach einmaliger intratrachealer Instillation von 360 µg amorphe Kieselsäure-Partikel/Tier an je fünf männliche Wistar-Ratten führten in den nachfolgenden 72 Stunden weder die 15 nm noch die 55 nm großen Partikel zu genotoxischen Effekten in der Rattenlunge oder dem Knochenmark. Es wurden der Comet-Assay und der Mikronukleustest durchgeführt. Das Verhältnis der polychromatischen zu normochromatischen Erythrozyten (PCE/NCE) war unverändert. Die Autoren diskutieren, dass der negative Mikronukleustest auf eine geringe systemische Verfügbarkeit und damit auf das fragliche Erreichen des Knochenmarks hinweist (Maser et al. 2015).

Zwei präzipitierte amorphe Kieselsäuren (NM-200 und NM-201) sowie zwei pyrogene amorphe Kieselsäuren (NM-202 und NM-203) wurden auf ihre genotoxische Wirkung untersucht. Die gut charakterisierten Materialien stammten vom „EU Joint Research Centre Nanomaterials Repository“. Je fünf männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurde dreimal intratracheal 0, 3, 6 oder 12 mg/kg KG instilliert (kumulative Dosis 0, 9, 18 oder 36 mg/kg KG), 48, 24 und drei Stunden vor der Gewebentnahme. Der Partikeltyp NM-203 wurde zusätzlich je sechs männlichen Sprague-Dawley-Ratten in Dosierungen von 0, 5, 10 oder 20 mg/kg KG dreimal intravenös appliziert (kumulative Dosis 0, 15, 30 oder 60 mg/kg KG). Die Genotoxizität wurde mittels Mikronukleustest, gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 474, in Erythrozyten ermittelt. Außerdem wurde ein modifizierter Comet-Assay an BAL-, Lungen-, Blut-, Milz-, Nieren-, Leber- und Knochenmarkszellen angewendet. Nur nach intravenöser Gabe von NM-203 kam es bei der höchsten Dosis zu einem statistisch signifikanten Anstieg an Mikronuklei im Knochenmark. Das PCE/NCE-Verhältnis war zwar im Vergleich zur Kontrolle unverändert, jedoch war die Mortalität mit drei von sechs Tieren in dieser Dosisgruppe sehr hoch. Die Daten nach intravenöser Gabe werden aus den bei der Studie von Downs et al. (2012) diskutierten Gründen (s. u.) nicht zur Bewertung herangezogen. Im Vergleich zu Positivkontrollen (Methylmethansulfonat und N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) ergaben die untersuchten Kieselsäure-Nanopartikel nach intratrachealer Gabe keine genotoxischen Effekte. Allerdings ist die Erreichbarkeit des Knochenmarks, aufgrund der geringen systemischen Verfügbarkeit, hier fraglich (Guichard et al. 2015).

Bei den in einer weiteren Studie eingesetzten amorphen Kieselsäuren mit einer mittleren Partikelgröße von 15 nm (Levasil® 200/40) und 55 nm (Levasil® 50/50), handelt es sich um wässrige alkalische (pH ~10) kolloidale Dispersionen. Vor der intravenösen Injektion wurden sie in Phosphatpuffer verdünnt und ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Männlichen Wistar-Ratten (n = 6–8, 15-nm-Partikel 50 mg/kg KG n = 4, Positivkontrolle und Kontrollgruppe im 2. Experiment n = 3) wurden die amorphen Kieselsäuren in Dosen von 0, 25 oder 50 mg/kg KG (15-nm-Partikel) oder 0, 25, 50 oder 125 mg/kg KG (55-nm-Partikel) durch drei aufeinanderfolgende intravenöse Injektionen in die Schwanzvene 48, 24 und vier Stunden vor der Tötung verabreicht. Die höchste verwendete Dosierung orientierte sich in dieser Studie an der maximal tolerierten Dosis (MTD), die in einer zuvor durchgeführten Dosisfindungsstudie (n = 2, bis 100 mg/kg KG für 15 nm große Partikel und 200 mg/kg KG für 55 nm große Partikel) ermittelt wurde. Das genotoxische Potential wurde mit Hilfe des Comet-Assays in Blut, Leber- und Lungengewebe untersucht und ein Mikronukleustest an zirkulierenden Retikulozyten durchgeführt. Für 15 nm große Partikel zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg (Dunnett's Multiple Comparison Test) der DNA-Schäden im Lebergewebe nur bei der hohen Dosis, jedoch nicht bei der Wiederholung des Versuches. Im Lungengewebe und in den weißen Blutzellen konnten keine signifikant erhöhten DNA-Schäden nachgewiesen werden. Ausschließlich im Bereich der MTD konnte ein Anstieg (1,5- bis 2,1-fach) des prozentualen Anteils der mikronukleushaltigen Retikulozyten bei den 15 nm und den 55 nm großen Partikeln beobachtet werden (Downs et al. 2012). Intravenöse Injektionen stellen ein Worst-Case-Szenario dar. Die nach intravenöser

Applikation erhobenen Befunde wurden nach intratrachealer Exposition von Maser et al. (2015) und Guichard et al. (2015) sowie nach inhalativer Exposition von Tarantini et al. (2015 a) nicht bestätigt. Die beobachteten Effekte nach intravenöser Gabe traten nur im Bereich der MTD auf und konnten in einem zweiten Experiment nicht verifiziert werden. Vermutlich sind die Standardabweichungen aufgrund der geringen Tierzahlen sehr groß, was die angegebene statistische Signifikanz fragwürdig erscheinen lässt. Die Studie wird daher nicht zur Bewertung herangezogen.

Männliche Sprague-Dawley-Ratten erhielten per Schlundsonde zwei präzipitierte amorphe Kieselsäuren (NM-200 und NM-201) sowie zwei pyrogene amorphe Kieselsäuren (NM-202 und NM-203) in Dosen von 0, 5, 10 oder 20 mg/kg KG an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Im Comet-Assay (pH 8,0) und im Fpg-modifizierten Comet-Assay zeigten sich keine DNA-Schäden in Blut, Knochenmark, Leber, Milz, Niere, Zwölffingerdarm und Dickdarm. Weiterhin trat keine erhöhte Anzahl an Mikronuklei im Knochenmark auf, wobei unklar ist, ob das Knochenmark erreicht wurde, da das Verhältnis von PCE zu NCE im Vergleich zur Kontrolle unverändert war. Im Dickdarm führte jeweils die niedrigste Dosis von NM-202 bzw. NM-203 (5 mg/kg KG) zu einem statistisch signifikanten Anstieg an Mikronuklei. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde nicht beobachtet. Die Autoren halten eine verstärkte Aufnahme, aufgrund geringerer Agglomeration bei der niedrigen Dosis, jedoch für möglich. Im Plasma wurden mit dem Lipidperoxidations-Marker Malondialdehyd keine Effekte beobachtet (Johnston et al. 2000).

Männliche F344-Ratten wurden sechs Stunden täglich, fünfmal pro Woche für 13 Wochen inhalativ gegen pyrogene Kieselsäure des Typs NM-203 in Konzentrationen von 0 oder  $50,4 \pm 19,0 \text{ mg/m}^3$  exponiert. Die Lungenbelastung betrug  $882 \text{ } \mu\text{g}$  pro Lunge. Im HPRT-Test fanden sich keine erhöhten Mutationshäufigkeiten in den alveolären Epithelzellen der Lunge (Ex-vivo-Untersuchung) (Johnston et al. 2000).

### 5.6.3 Fazit

In den bakteriellen Genotoxizitätstests wurden keine Mutationen beobachtet. In Säugetierzellen konnten durch amorphe Kieselsäure keine Chromosomenaberrationen induziert werden. Im TK<sup>+/-</sup>-Mutationstest und lacZ-Mutationstest sowie im HPRT-Genmutationstest traten keine Mutationen auf. Nanoskalige amorphe Kieselsäure-Partikel verursachten in vitro Mikronuklei sowie DNA-Strangbrüche im Comet-Assay und bei der Methode der alkalischen Entwindung. Dies wurde bei größeren Partikeln nicht beobachtet. Dispergierbarkeit und Agglomeration der Partikel sind abhängig vom verwendeten Kulturmedium sowie von der Oberflächenreaktivität. Die in vitro beobachteten stärkeren Effekte der kleineren Partikel können darauf zurückgeführt werden. Es liegen keine Daten vor, die auf die Induktion von Mutationen bzw. klastogenen oder aneugenen Effekte durch amorphe Kieselsäure in vivo bei arbeitsplatzrelevanten Expositionspfaden hinweisen.

## 5.7 Kanzerogenität

In einer Studie wurde mit Dimethyldichlorsilan hydrophobierte pyrogene Kieselsäure 24 Monate lang in einer Konzentration von 100 mg/kg an männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten verfüttert. Es zeigten sich sehr vereinzelt Effekte, darunter ein gutartiger Mammatumor bei einer männlichen Ratte. Da die Inzidenz innerhalb der historischen Kontrolle des Rattenstamms lag, wurde der Tumor als zufällig betrachtet (Lewinson et al. 1994).

Vier Gruppen von 40 männlichen und 40 weiblichen B6C3F1-Mäusen bzw. Fischer-Ratten erhielten lebenslang Futter mit 0; 1,25; 2,5 oder 5% mikronisierter Kieselsäure (Syloid 244;  $\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$ ). Die tägliche Aufnahme von Kieselsäure betrug in den Dosisgruppen bei den männlichen Mäusen 1,2–1,88; 2,52–6,61 bzw. 5,27–7,49 g/kg KG und für weibliche Mäuse 1,02–2,57; 1,82–4,9 bzw. 3,95–13,31 g/kg KG. Für männliche Ratten waren die Dosen 0,4–0,71; 0,83–1,46 bzw. 1,76–3,0 g/kg KG und für weibliche Ratten 0,4–0,75; 0,83–1,45 bzw. 1,78–3,21 g/kg KG. Die mittlere Gesamtaufnahme lag bei 38,45; 79,78 und 160,23 g/männlicher Maus, bei 37,02; 72,46 und 157,59 g/weiblicher Maus, bei 143,46; 179,55 und 581,18 g/männlicher Ratte sowie bei 107,25; 205,02 und 435,33 g/weiblicher Ratte am Ende der 93. bzw. 103. Woche. Bei den Mäusen wurden, insbesondere in der mittleren Dosisgruppe, maligne Lymphome an den blutbildenden Organen entdeckt, die aufgrund fehlender Dosisabhängigkeit allerdings als zufällig bewertet wurden. Es traten keine behandlungsbedingten Tumoren bei den Ratten auf (IARC 1997; Takizawa et al. 1988).

In einer Studie an männlichen und weiblichen Syrischen Hamstern wurden wöchentlich feine Partikel einer Mischung von amorphen und kristallinen Kieselsäuren in einer Dosis von 3 mg/Tier über einen Zeitraum von 20 Wochen intratracheal verabreicht und die Tiere lebenslang nachbeobachtet. Die genaue Partikelgröße wurde nicht genannt, ebenso fehlt eine genaue Charakterisierung der Kieselsäure. Es traten keine behandlungsbedingten Tumoren auf (IARC 1997).

Nach zehnwöchiger intratrachealer Gabe von 3 mg synthetischer amorpher Kieselsäure/Tier (Gesamtdosis 30 mg) und zweijähriger Nachbeobachtung traten bei weiblichen Wistar-Ratten keine statistisch signifikant erhöhten Inzidenzen an Lungentumoren auf (Pott und Roller 2005; Roller 2008).

Bei weiblichen Wistar-Ratten wurde, über einen Zeitraum von zwei Jahren, wiederholt eine intratracheale Instillation von amorpher Kieselsäure als Partikelsuspension durchgeführt. Ziel war es, eine chronische pulmonale Entzündung, ähnlich wie durch alveolengängige granuläre biobeständige Stäube (GBS) ohne bekannte spezifische Kanzerogenität, zu erzeugen und aufrechtzuerhalten; die Entzündung sollte aber nicht wesentlich mit der Anwesenheit eines GBS in der Lunge assoziiert sein. Die seit langem bekannte hohe akute Toxizität von hochdispersiver amorpher Kieselsäure einerseits, und die Rückbildung von erzeugten Entzündungsreaktionen und Granulomen nach dem Absetzen der Exposition andererseits, wurde auf die – im Verhältnis zum Quarz – rasche Elimination durch Auflösung zurückgeführt. In Vorversuchen wurde die Elimination des amorphen SiO<sub>2</sub> aus der Lunge von Ratten ermittelt (Ernst et al. 2002, 2005). Zwei Tage nach der Instillation von 2 mg amorpher Kieselsäure wurden noch 18 % in der Lunge nachgewiesen; die sich daran anschließende Halbwertszeit betrug elf Tage. Im Hauptversuch wurden 30 Instillationen von je 0,5 mg pyrogener amorpher Kieselsäure in zweiwöchigem Abstand verabreicht, um zu prüfen, ob die damit über einen Zeitraum von etwa fünfzehn Monaten aufrechterhaltene starke Zytotoxizität mit entsprechender Entzündung ausreicht, um eine Tumorentstehung zu induzieren, falls ein solcher Wirkungsmechanismus den entscheidenden Verursacher darstellt. Die Partikel wiesen einen mittleren Durchmesser von 14 nm und eine Reinheit von 99,8 % auf. Während der Versuche zeigten die Tiere keine Beeinträchtigungen. Kurz nach Applikation traten vorübergehende Atembeschwerden auf. Nach neun Monaten wurde eine statistisch signifikant reduzierte Körpergewichtszunahme festgestellt. Histopathologisch ergaben sich multifokale dosisabhängige mittel- bis schwerwiegende alveoläre und interstitielle Ansammlungen partikelbeladener Makrophagen in der Lunge. In den Lymphknoten der Lunge wurden mäßige bis schwere chronisch granulomatöse Entzündungen festgestellt. Bei fünf von 53 Ratten, die mindestens ein Jahr überlebt hatten, wurde mit der Routinehistologie (sechs Schnitte/Lunge) ein Lungentumor gefunden (9,4 %). Bei 31 Ratten, die mindestens zwei Jahre überlebt hatten, wurde zusätzlich eine aufwändige histologische Untersuchung der Lunge mit 60 Schnitten/Lunge durchgeführt. Dadurch wurden fünf zusätzliche Tiere mit Lungentumoren gefunden. Damit erhöhte sich die Anzahl der Tiere mit Lungentumoren von fünf (Routinehistologie; ein Tier mit Lungentumor war nach 98 Wochen gestorben und ist deshalb nicht einer zusätzlichen Histologie von 60 Schnitten/Lunge unterzogen worden) auf insgesamt 10/53 (18,9 %). In den Lungen der 55 Ratten umfassenden Kontrollgruppe wurden keine Tumore gefunden, weder bei der Routinehistologie noch bei der aufwändigen Histologie mit 60 Schnitten/Lunge, die bei 30 Tieren (Überlebenszeit mindestens zwei Jahre) vorgenommen worden ist. In einer Positiv-Kontrollgruppe, die mit einer intratrachealen Instillation von 3 mg DQ 12 Quarz behandelt wurde, wurden von 53 Tieren nur sieben Tiere, die mindestens zwei Jahre überlebt hatten, histopathologisch untersucht. Bei sechs dieser sieben Tiere wurden Lungentumore dokumentiert, allerdings führte die Erhöhung der Schnittanzahl zur Entdeckung von 44 Tumoren (zuvor 17). Die histopathologische Befundung ergab bei allen Tieren verschiedene Tumortypen: bronchioalveoläre Karzinome, bronchioalveoläre Adenome, Plattenepithelkarzinome und zystisch-keratinisierende Epitheliome. Die Zuordnung der Tumortypen zu den mit verschiedenen Partikeln behandelten Gruppen ist nicht angegeben (Kolling et al. 2008). Die Resultate für amorphe Kieselsäure sind, in Anbetracht der 30 intratrachealen Applikationen im Abstand von jeweils zwei Wochen und der dadurch bedingten starken permanenten akuten Zytotoxizität und Entzündung, nur von eingeschränkter Relevanz. Zudem wurden in der Studie keine unterschiedlichen Dosierungen verwendet. Mit dieser Applikationsmethode wurde einerseits, trotz der Löslichkeit des amorphen SiO<sub>2</sub>, eine länger anhaltende Beladung der Lungen mit löslichen Partikeln erreicht, und andererseits aber auch eine hohe zytotoxische Belastung der Lungen durch das gelöste SiO<sub>2</sub>. Zusammenfassend sind diese Versuchsergebnisse daher nicht geeignet, um auf eine kanzerogene Wirkung beim Menschen zu schließen.

## 5.8 Sonstige Wirkungen

Die Allergie-begünstigende Wirkung von kolloidaler amorpher Kieselsäure auf die Atemwege wurde mittels Glykol-überzogener Nanopartikel untersucht. Die Autoren verwendeten weibliche BALB/c-Mäuse und applizierten die Kieselsäure (90 nm) zunächst nasal in Dosen von 0, 10, 100 oder 400 µg/Tier in Verbindung mit Ovalbumin zur Sensibilisierung. Die Tiere wurden 14 und 15 Tage nach Sensibilisierung erneut mit dem Allergen Ovalbumin behandelt. Einen Tag darauf wurden die Tiere getötet und untersucht. Die Ko-Exposition mit Kieselsäure während der Sensibilisierung wirkte als Adjuvans und verstärkte dosisabhängig die durch Ovalbumin verursachte allergische Reaktion der Atemwege. Mäuse, die ko-exponiert waren, wiesen erhöhte Ovalbumin-spezifische IgE-Antikörper im Serum, eine verstärkte Infiltration eosinophiler Granulozyten sowie eine erhöhte muköse Zellmetaplasie auf. Außerdem wurde eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von Th2- und Th17-Zytokinen ermittelt (Brandenberger et al. 2013).

Um die entzündungsfördernden Mechanismen von Nanopartikeln amorpher Kieselsäure zu untersuchen, wurden Zellen des Typs RAW 264.7, einer Zelllinie aus peritonealen Makrophagen der Maus, mit Partikeln mit einem mittleren Durchmesser von 12 nm, behandelt. Es wurde ein Anstieg von ROS mit einer einhergehenden Abnahme an intrazellulärem Glutathion festgestellt. Außerdem wurde spektrophotometrisch eine erhöhte Stickoxidkonzentration gemessen. Die Autoren vermuten, dass die ROS entzündungsfördernde Reaktionen in den Zellen auslösen. Eine genaue Charakterisierung der Kieselsäure erfolgte nicht (Park und Park 2009).

Aggregate verschiedener Größe aus Nanopartikeln präzipitierter amorpher Kieselsäure mit einer primären Partikelgröße von 14–23 nm wurden verwendet, um an humanen Bronchialepithelzellen (HBE), Kolonepithelzellen (Caco-2) und monozytischen Zellen (THP-1) die Effekte auf zelluläre metabolische Aktivität, Zellvitalität, Glutathiongehalt sowie die IL8- und IL6-Sekretion nach 24 Stunden Exposition zu untersuchen. Die Aggregate wiesen durchschnittliche flächengleiche Kreisdurchmesser von 100 bis 2000 nm und mittlere hydrodynamische Durchmesser von 264 nm bis 12,5 µm auf. Mittels dynamischer Lichtstreuung zeigten die Autoren, dass die aggregierte Kieselsäure im allgemeinen geringere Effekte auslöste als nichtaggregierte Nanopartikel (Murugadoss et al. 2020).

In einer weiteren Studie mit synthetischen amorphen Kieselsäuren (entsprechen den Typen in Barnes et al. 2008) in Konzentrationen von 0; 12,5; 25; 50 oder 100 µg/ml fanden sich ab 25 µg/ml statistisch signifikante Reduzierungen der Zellvitalität bei Exposition von V79-Zellen gegen pyrogene und bereits ab 12,5 µg/ml gegen präzipitierte SAS. Diese Effekte traten allerdings nur bei Nanopartikeln von etwa 20 nm auf. Pyrogene und kolloidale Partikel dieser Größe induzierten darüber hinaus DNA-Schädigungen und Apoptose, allerdings ohne intrazelluläre Bildung von ROS. Bei größeren Partikeln (50 nm) wurden solche Effekte nicht beobachtet. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Toxizität eher von der Partikelgröße als vom Typ der synthetischen amorphen Kieselsäure (pyrogen oder präzipitiert) abhängt (Guichard et al. 2015).

## 6 Bewertung

Der kritische Effekt ist das Auftreten von entzündlichen Reaktionen in der Lunge nach inhalativer Exposition gegen synthetische amorphe Kieselsäure. Die Herstellungsverfahren für die verschiedenen synthetischen amorphen Kieselsäuren, Fällungskieselsäuren oder pyrogene Kieselsäuren lassen eine generelle Unterscheidung bezüglich der Partikelgröße oder Oberflächenbeschaffenheit nicht zu.

**MAK-Wert.** Eine Querschnittsstudie von Taeger et al. (2016 b) kann aufgrund methodischer Einschränkungen nicht für die Ableitung eines MAK-Wertes herangezogen werden. Fibrosen wurden zu keiner Zeit beobachtet. Die Studie verdeutlicht, dass sich die amorphe Kieselsäure von der kristallinen Form (Quarz) qualitativ in ihrer Wirkung unterscheidet.

In der tierexperimentellen Studie von Reuzel et al. (1991) werden in der niedrigsten Konzentrationsgruppe (1,3 mg/m<sup>3</sup>) bei männlichen und weiblichen Ratten gleichermaßen statistisch signifikant erhöhte intraalveoläre Infiltrationen von PMN sowie eine statistisch signifikant erhöhte Septumzelldichte diagnostiziert. Bei der nächst höheren Konzentration

(5,9 mg/m<sup>3</sup>) wird ausschließlich bei männlichen Ratten als zusätzlicher Befund eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der alveolären Bronchiolisation beschrieben.

In der Inhalationsstudie von Groth et al. (1981) mit drei amorphen Kieselsäuren an Affen, Ratten und Meerschweinchen ergibt sich ein deutlicher Unterschied in der alveolengängigen Partikelkonzentration zwischen den Spezies. Aus der angegebenen Größenverteilung der Partikel geht hervor, dass maximal 42 % der Partikelmasse bei der Konzentration von 15 mg/m<sup>3</sup> unter einem aerodynamischen Durchmesser von weniger als 3,3 µm fallen; laut der OECD-Prüfrichtlinien für Ratten-Inhalationsstudien soll der MMAD nicht über 3 µm liegen. Die alveolengängige Partikelkonzentration für die Ratte läge daher bei maximal 6,3 mg/m<sup>3</sup>. Im Gegensatz hierzu würden auch Agglomerate mit größeren aerodynamischen Durchmesser (ca. 80 %) in die Lunge der Affen gelangen. Die alveolengängige Partikelkonzentration für die Affen läge damit bei maximal 12 mg/m<sup>3</sup>. Die alveolengängige Partikelkonzentration für die Ratte bei Groth et al. (1981) entspricht damit der mittleren Konzentration bei Reuzel et al. (1991). Dass die Rattenlungen nur ca. 10 % der Masse an amorpher Kieselsäure, die in Affenlungen nachgewiesen wurde, enthielten, könnte auf die unterschiedliche alveolengängige Partikelkonzentration zurückzuführen sein. Bei sechs von neun Affen wurden Granulome in den Alveolen diagnostiziert, die in 5 bis 50 % der Fälle kollagenhaltig waren. Bei drei der neun Affen konnte in den Granulomen kein Kollagen und im Lungeninterstitium konnte bei keinem der Tiere ein erhöhter Gehalt an Kollagen nachgewiesen werden. Hinweise auf fibrotische Prozesse in den Lungen der Affen lagen nicht vor. Die interstitielle Fibrose bei Ratten, die eine deutlich geringere Exposition gegen alveolengängige Kieselsäure hatten als die Affen, konnte auch an einigen Kontrolltieren nachgewiesen werden. Auf Basis der vorliegenden Daten kann nicht gefolgert werden, dass Ratten weniger empfindlich sind als Affen.

Die histopathologischen Befunde in der Studie von Reuzel et al. (1991) wurden von Weber et al. (2018) einem Review unterzogen und durch ein Expertengremium („Pathology Working Group“, PWG) neu bewertet. Alle Befunde und die Graduierungen sind bei Weber et al. (2018) sehr ausführlich aufgeführt. Es standen nur die Schnitte der männlichen Ratten für eine neue Befundung zur Verfügung. Nach einer 13-wöchigen inhalativen Exposition wurden bei Ratten ab der niedrigsten Konzentration (1,3 mg/m<sup>3</sup>) statistisch signifikant erhöhte Pneumozyten-II-Hyperplasien, alveolär-bronchioläre Hyperplasien sowie granulomatöse Entzündungen diagnostiziert. Die Ausprägung dieser granulomatösen Entzündung nimmt nicht mit zunehmender Expositionskonzentration zu. Neben den auch schon bei der niedrigsten Konzentration befundeten Veränderungen werden bei der mittleren Konzentration (5,9 mg/m<sup>3</sup>) zusätzlich alveolär-bronchioläre Granulome als statistisch signifikanter Befund beschrieben. Dieser Befund (Akkumulation von Histiozyten/Makrophagen) wird bereits in der niedrigsten Konzentrationsgruppe beobachtet, jedoch ist die Inzidenz hier nicht statistisch signifikant. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Inzidenz und des Schweregrads für alveoläre Hyperplasie ist nicht zu erkennen. Eine interstitielle Entzündung mit geringer Ausprägung ist nur bei der höchsten Konzentration (31 mg/m<sup>3</sup>) statistisch signifikant. Dieser Befund wird auch bei den niedrigeren Konzentrationen sowie bei den Kontrolltieren (3/9) beobachtet, ist hier aber nicht signifikant und die Ausprägung nimmt mit der Konzentration nicht zu. Der Befund „interstitielle Entzündung“ ist in dieser Studie aufgrund des Auftretens in den Kontrollen und der fehlenden Konzentrationsabhängigkeit nicht als adverser Effekt einzustufen. Die von Weber et al. (2018) bei der unteren und mittleren Konzentration beschriebenen Veränderungen sind nicht als eindeutig advers zu betrachten, insbesondere aufgrund ihrer Art (regenerativ), ihrer geringen Ausprägung und der fehlenden und/oder geringfügigen Steigerung des Schweregrades. Die vorliegenden Daten sind nicht dazu geeignet, Aussagen über mögliche Auswirkungen bei einer chronischen Exposition zu machen.

Mit dem Report 02G18002 liegt eine gut dokumentierte, lege artis durchgeführte Studie gemäß der OECD-Prüfrichtlinie 413 vor (Fraunhofer ITEM 2020). Ein Anstieg des absoluten und relativen Lungengewichtes kann als Erreichen der maximal tolerierten Dosis gewertet werden. Diese liegt für SAS1 (BET 400 m<sup>2</sup>/g) bei 5 mg/m<sup>3</sup> und für SAS2 (BET 40-50 m<sup>2</sup>/g) bei 1 mg/m<sup>3</sup>. Ein statistisch signifikanter Anstieg der PMN in der BALF wird bereits ab 0,5 mg/m<sup>3</sup> SAS2 für beide Geschlechter am Tag nach Expositionsende (+1) befundet. Erhöhte IL-8 Werte korrespondieren mit den erhöhten PMN und unterstreichen die behandlungsbedingte entzündliche Reaktion der Lunge, die auch histologisch nachgewiesen wurde. Die histopathologischen Befunde in der Lunge von Tieren, die gegen mittlere (1 mg/m<sup>3</sup>) und hohe (5 mg/m<sup>3</sup>) Konzentrationen SAS2 exponiert wurden, zeigten ungewöhnlich lange Erholungszeiten von über 52 Wochen. Nur in der niedrigsten Konzentrationsgruppe (0,5 mg/m<sup>3</sup>) konnte nach einer 12-monatigen Erholungszeit

keine interstitielle Entzündung mehr nachgewiesen werden. Für SAS1 war bei  $1 \text{ mg/m}^3$  der Anteil der PMN zwar nicht statistisch signifikant erhöht, aber bei den männlichen Tieren fast 10-fach so hoch wie bei Kontrolltieren (Tabelle 4), was von der Kommission als advers bewertet wird. In dieser Studie wird für den Tag nach Expositionsende (+1) eine NOAEC von  $0,5 \text{ mg/m}^3$  für SAS1-High BET und eine LOAEC von  $0,5 \text{ mg/m}^3$  für SAS2-Low BET abgeleitet. Zur Abschätzung der NAEC für SAS2 werden die PMN-Daten von SAS1 herangezogen: Der Anteil an PMN bei  $2,5 \text{ mg SAS1/m}^3$  ist ähnlich hoch wie bei  $0,5 \text{ mg SAS2/m}^3$ . Die entsprechende NOAEC beträgt  $0,5 \text{ mg SAS1/m}^3$ . Dasselbe Verhältnis LOAEC/NOAEC (5:1) wird auch für SAS2 angenommen. Somit wird für SAS2 eine NAEC von  $0,1 \text{ mg/m}^3$  abgeleitet. Berechnungen mit dem MPPD-Modell 3.04 zeigen, dass bei Partikelgrößen ab  $2 \mu\text{m}$  MMAD (geometrische Standardabweichung 2) ein Atemvolumen von ca.  $20 \text{ l/min}$  zu einer nur halb so hohen prozentualen Deposition im Tracheobronchial- und Pulmonal-Bereich führt wie bei Ruheatmung mit  $7,5 \text{ l/min}$ . Das heißt, für relativ große Partikel in der A-Fraktion ist die deponierte Masse im unteren Atemtrakt bei Ruheatmung und erhöhter Atmung etwa gleich. Da SAS am Arbeitsplatz einen sehr großen MMAD aufweisen (Morfeld et al. 2014), ist davon auszugehen, dass die A-Fraktion eher aus großen Partikeln besteht. Das erhöhte Atemvolumen des Menschen am Arbeitsplatz im Vergleich zum Tierexperiment, bei dem die Tiere in Ruhe exponiert werden, muss daher hier nicht berücksichtigt werden.

Die Konzentration von  $0,5 \text{ mg/m}^3$  wird als LOAEC für die synthetische amorphe Kieselsäure angesehen. Unter Berücksichtigung der Extrapolation von LOAEC auf NAEC (1:5, siehe oben), einer subchronischen auf eine chronische Exposition (1:2) und der Übertragung von tierexperimentellen Daten auf den Menschen (1:2) wird ein MAK-Wert von  $0,02 \text{ mg/m}^3$  für die alveolengängige Fraktion abgeleitet.

**Spitzenbegrenzung.** Der kritische Effekt der synthetischen amorphen Kieselsäuren ist die kumulative Wirkung auf die Lunge. Die alveolengängige Fraktion wird daher der Spitzenbegrenzungskategorie II zugeordnet. Die alveoläre Clearance verläuft bei den verschiedenen amorphen Kieselsäuren unterschiedlich schnell, vor allem pyrogene Kieselsäure wird schnell aus der Lunge eliminiert (Henschler 1989). Zur Ableitung der Eliminationshalbwertszeit aus der Lunge liegen jedoch keine verwertbaren Daten vor. Da bei inhalativer Exposition keine akuten Reizwirkungen im Atemtrakt berichtet wurden und es sich bei den histopathologischen Veränderungen der Lunge um Langzeiteffekte handelt, wird ein Überschreitungsfaktor von 8 festgelegt.

**Fruchtschädigende Wirkung.** Synthetische amorphe Kieselsäure (NM-200, nano-präzipitiert) verursachte in einer pränatalen Entwicklungstoxizitätsstudie (Hofmann et al. 2015) und einer Zwei-Generationen-Studie (Wolterbeek et al. 2015) nach den OECD-Prüfrichtlinien 414 bzw. 416 an Wistar-Ratten keine pränatale Entwicklungstoxizität, perinatale Toxizität und Maternaltoxizität sowie beeinträchtigte sexuelle Reifung nach Gabe per Schlundsonde bis zur Limitdosis von  $1000 \text{ mg/kg KG}$  und Tag. Zur toxikokinetischen Übertragung dieses NOAEL von  $1000 \text{ mg/kg KG}$  und Tag in eine Konzentration in der Luft am Arbeitsplatz werden berücksichtigt: die tägliche Exposition der Tiere im Vergleich zur fünftägigen Exposition pro Woche am Arbeitsplatz (7:5) nur bei der Zwei-Generationenstudie, der dem toxikokinetischen Unterschied zwischen der Ratte und dem Menschen entsprechende speziesspezifische Korrekturwert (1:4), die angenommene orale Resorption (100 %), das Körpergewicht ( $70 \text{ kg}$ ) und das Atemvolumen ( $10 \text{ m}^3$ ) des Menschen sowie die angenommene 100%ige inhalative Resorption. Die in eine Luftkonzentration umgerechneten oralen NOAEL für Entwicklungstoxizität und perinatale Toxizität liegen bei  $1750$  bzw.  $2450 \text{ mg/m}^3$ . Die 87 500- bzw. 122 500-fachen Abstände der berechneten Luftkonzentrationen zum MAK-Wert von  $0,02 \text{ mg/m}^3$  A sind ausreichend groß. Selbst wenn die orale Resorption beim Tier abgeschätzt nur 20 % (van der Zande et al. 2014) betragen würde, sind die 17 500- bzw. 24 500-fachen Abstände ausreichend groß, um Schwangerschaftsgruppe C beizubehalten. Deswegen bleiben die synthetischen amorphen Kieselsäuren weiterhin der Schwangerschaftsgruppe C zugeordnet.

**Krebserzeugende Wirkung.** Eine krebserzeugende Wirkung für den Menschen durch synthetische amorphe Kieselsäure kann nicht abgeleitet werden. Die nachgewiesenen Tumoren in Rattenlungen einer Zwei-Jahre-Studie (Ernst et al. 2005; Kolling et al. 2008) sind, in Anbetracht der Mehrfachapplikation sowie der hohen verwendeten Dosis (30 intratracheale Instillationen von je  $0,5 \text{ mg}$  amorpher Kieselsäure in zweiwöchigem Abstand) und der eingeschränkten Anzahl der histopathologischen Befunde, für die Bewertung nur von eingeschränkter Relevanz. In dieser Studie wurde nur eine Dosierung verwendet. Der Lösungsvorgang der Kieselsäure in der Lunge wurde

durch die wiederholten Applikationen kompensiert und so eine länger anhaltende Beladung der Lungen mit Partikeln erreicht. Zusätzlich entstand eine hohe Belastung der Lungen mit gelöstem SiO<sub>2</sub>. Ursächlich für die Entstehung der Tumore ist daher vorrangig die massive Entzündung anzusehen und nicht die eingesetzte amorphe Kieselsäure. Aus epidemiologischen Studien liegen in diesem Zusammenhang keine belastbaren Daten vor. Insgesamt sind die vorliegenden Studien nicht geeignet, um eine krebserzeugende Wirkung für den Menschen abzuleiten.

**Keimzellmutagene Wirkung.** Synthetische amorphe Kieselsäuren induzieren weder in vitro noch in vivo Mutationen. In vitro beobachtete DNA-Strangbrüche und Mikronuklei wurden in In-vivo-Studien nicht bestätigt. Studien an Keimzellen liegen nicht vor. Aus diesen Daten ergibt sich kein Verdacht und es erfolgt keine Einstufung in eine der Kategorien für Keimzellmutagene.

**Hautresorption.** Es liegen keine validen Studien zur Aufnahme nach dermalen Exposition vor. Bei Applikation von 10 000 mg/kg KG und Tag wurde in älteren Studien keine systemische Aufnahme von Siliciumdioxid bei Kaninchen nachgewiesen. Mit den Modellen lässt sich eine maximale Aufnahme von 4 mg unter Standardbedingungen berechnen. Da die systemische Toxizität nicht im Vordergrund steht, werden synthetische amorphe Kieselsäuren nicht mit „H“ markiert.

**Sensibilisierende Wirkung.** Es liegen nach wie vor keine positiven klinischen Befunde oder experimentellen Untersuchungen zur haut- oder atemwegssensibilisierenden Wirkung von Kieselsäuren vor, sodass synthetische amorphe Kieselsäuren weiterhin weder mit „Sh“ noch mit „Sa“ markiert werden.

## 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

- Arts JHE, Muijser H, Duistermaat E, Junker K, Kuper CF (2007) Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months. *Food Chem Toxicol* 45(10): 1856–1867. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.04.001>
- Barnes CA, Elsaesser A, Arkusz J, Smok A, Palus J, Leśniak A, Salvati A, Hanrahan JP, de Jong WH, Dziubałtowska E, Stepnik M, Rydzyński K, McKerr G, Lynch I, Dawson KA, Howard CV (2008) Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity. *Nano Lett* 8(9): 3069–3074. <https://doi.org/10.1021/nl801661w>
- Brandenberger C, Rowley NL, Jackson-Humbles DN, Zhang Q, Bramble LA, Lewandowski RP, Wagner JG, Chen W, Kaplan BL, Kaminski NE, Baker GL, Worden RM, Harkema JR (2013) Engineered silica nanoparticles act as adjuvants to enhance allergic airway disease in mice. *Part Fibre Toxicol* 10: 26. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-26>
- Buesen R, Landsiedel R, Sauer UG, Wohlleben W, Groeters S, Strauss V, Kamp H, van Ravenzwaay B (2014) Effects of SiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, and BaSO<sub>4</sub> nanomaterials with or without surface functionalization upon 28-day oral exposure to rats. *Arch Toxicol* 88(10): 1881–1906. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1337-0>
- Cho W-S, Choi M, Han BS, Cho M, Oh J, Park K, Kim SJ, Kim SH, Jeong J (2007) Inflammatory mediators induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica particles. *Toxicol Lett* 175(1–3): 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.09.008>
- Cho M, Cho W-S, Choi M, Kim SJ, Han BS, Kim SH, Kim HO, Sheen YY, Jeong J (2009) The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicol Lett* 189(3): 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.04.017>
- Choi M, Cho W-S, Han BS, Cho M, Kim SY, Yi J-Y, Ahn B, Kim SH, Jeong J (2008) Transient pulmonary fibrogenic effect induced by intratracheal instillation of ultrafine amorphous silica in A/J mice. *Toxicol Lett* 182(1–3): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.08.019>

- Decan N, Wu D, Williams A, Bernatchez S, Johnston M, Hill M, Halappanavar S (2016) Characterization of in vitro genotoxic, cytotoxic and transcriptomic responses following exposures to amorphous silica of different sizes. *Mutat Res* 796: 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.011>
- Downs TR, Crosby ME, Hu T, Kumar S, Sullivan A, Sarlo K, Reeder B, Lynch M, Wagner M, Mills T, Pfuhler S (2012) Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not. *Mutat Res* 745(1–2): 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.03.012>
- Driscoll KE, Lindenschmidt RC, Maurer JK, Perkins L, Perkins M, Higgins J (1991) Pulmonary response to inhaled silica or titanium dioxide. *Toxicol Appl Pharmacol* 111(2): 201–210. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(91\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0041-008x(91)90024-9)
- ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) (2006) Joint assessment of commodity chemicals (JAAC). Synthetic amorphous silica (CAS No. 7631-86-9). Report No 51. Brussels: ECETOC. <https://www.ecetoc.org/wp-content/uploads/2014/08/JACC-051.pdf>, abgerufen am 04 Mai 2020
- ECHA (European Chemicals Agency) (2021) Silicon dioxide (CAS Number 7631-86-9). Registration dossier. Joint submission, first publication 28 Oct 2009, last modification 30 Mar 2021. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/15556>, abgerufen am 20 Mai 2021
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes M, Aggett P, Aguilar F, Crebelli R, Dusemund B, Filipič M, Frutos MJ, Galtier P, Gott D, Gundert-Remy U, Kuhnle GG, Leblanc J-C, Lillegaard IT, Moldeus P, Mortensen A, Oskarsson A, Stankovic I, Waalkens-Berendsen I, Woutersen RA, Wright M, Boon P, Chrysafidis D, Gürtler R, Mosesso P, Parent-Massin D, Tobbäck P, Kovalkovicova N, Rincon AM, Tard A, Lambré C (2018) Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive. *EFSA J* 16(1): e05088. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5088>
- Ernst H, Rittinghausen S, Bartsch W, Creutzenberg O, Dasenbrock C, Görlitz B-D, Hecht M, Kairies U, Muhle H, Müller M, Heinrich U, Pott F (2002) Pulmonary inflammation in rats after intratracheal instillation of quartz, amorphous SiO<sub>2</sub>, carbon black, and coal dust and the influence of poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO). *Exp Toxicol Pathol* 54(2): 109–126. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00241>
- Ernst H, Kolling A, Bellmann B, Rittinghausen S, Heinrich U, Pott F (2005) Pathogenetische und immunbiologische Untersuchungen zur Frage: Ist die Extrapolation der Staubkanzerogenität von der Ratte auf den Menschen gerechtfertigt? Teil II: Histologie. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Förderkennzeichen (UFOPLAN) 203 61 215. Hannover: Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM). <https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/3033.pdf>, abgerufen am 05 Jul 2023
- Fiserova-Bergerova V, Pierce JT, Droz PO (1990) Dermal absorption potential of industrial chemicals: criteria for skin notation. *Am J Ind Med* 17(5): 617–635. <https://doi.org/10.1002/ajim.4700170507>
- Fraunhofer ITEM (Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin) (2020) 90-day-nose-only inhalation toxicity study of two synthetic amorphous silicas in wistar rats. Study No. 02G18002, 12 Mai 2020, Hannover: Fraunhofer (ITEM), unveröffentlicht
- Frujtier-Pöllth C (2012) The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica – a nanostructured material. *Toxicology* 294(2–3): 61–79. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.02.001>
- Frujtier-Pöllth C (2016) The safety of nanostructured synthetic amorphous silica (SAS) as a food additive (E 551). *Arch Toxicol* 90(12): 2885–2916. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1850-4>
- Groth DH, Moorman WJ, Lynch DW, Stettler E, Wagner WD, Hornung RW (1981) Chronic effects of inhaled amorphous silicas in animals. In: Dunnorn DD, Hrsg. Health effects of synthetic silica particulates. Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials. S. 113–143
- Guichard Y, Maire M-A, Sébillaud S, Fontana C, Langlais C, Micillino J-C, Darne C, Roszak J, Stepnik M, Fessard V, Binet S, Gaté L (2015) Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure, part 2: intratracheal instillation and intravenous injection. *Environ Mol Mutagen* 56(2): 228–244. <https://doi.org/10.1002/em.21928>
- Hardisty JF (2016) Pathology Working Group review of a sub-chronic (13-Week) inhalation toxicity study of aerosols of Aerosil® 200, Aerosil® R 974, Sipernat® 22S and quartz in rats. EPL Project No.: A88-001, 16 Jun 2016, Durham, NC: Experimental Pathology Laboratories Inc, unveröffentlicht
- Hemenway DR, Absher MP, Trombley L, Vacek PM (1990) Comparative clearance of quartz and cristobalite from the lung. *Am Ind Hyg Assoc J* 51(7): 363–369. <https://doi.org/10.1080/15298669091369790>
- Henschler D, Hrsg (1989) Amorphe Kieselsäuren. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten. 15. Lieferung. Weinheim: VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb763186d0015>
- Hofmann T, Schneider S, Wolterbeek A, van de Sandt H, Landsiedel R, van Ravenzwaay B (2015) Prenatal toxicity of synthetic amorphous silica nanomaterial in rats. *Reprod Toxicol* 56: 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.04.006>
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1997) Silica. In: Silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Band 69. Lyon: IARC Press. S. 41–242. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK410047/pdf/Bookshelf\\_NBK410047.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK410047/pdf/Bookshelf_NBK410047.pdf), abgerufen am 05 Jul 2023
- Isoda K, Hasezaki T, Kondoh M, Tsutsumi Y, Yagi K (2011) Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury. *Pharmazie* 66(4): 278–281. <https://doi.org/10.1691/ph.2011.0808>

- Johnston CJ, Driscoll KE, Finkelstein JN, Baggs R, O'Reilly MA, Carter J, Gelein R, Oberdörster G (2000) Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol Sci* 56(2): 405–413. <https://doi.org/10.1093/toxsci/56.2.405>
- Kaewamatawong T, Kawamura N, Okajima M, Sawada M, Morita T, Shimada A (2005) Acute pulmonary toxicity caused by exposure to colloidal silica: particle size dependent pathological changes in mice. *Toxicol Pathol* 33(7): 743–749. <https://doi.org/10.1080/01926230500416302>
- Kaewamatawong T, Shimada A, Okajima M, Inoue H, Morita T, Inoue K, Takano H (2006) Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultra-fine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol Pathol* 34(7): 958–965. <https://doi.org/10.1080/01926230601094552>
- Kolling A, Ernst H, Rittinghausen S, Heinrich U, Pott F (2008) Comparison of primary lung tumor incidences in the rat evaluated by the standard microscopy method and by multiple step sections. *Exp Toxicol Pathol* 60(4–5): 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.02.003>
- Lee KP, Kelly DP (1992) The pulmonary response and clearance of Ludox colloidal silica after a 4-week inhalation exposure in rats. *Fundam Appl Toxicol* 19(3): 399–410. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(92\)90179-1](https://doi.org/10.1016/0272-0590(92)90179-1)
- Lee S, Yun H-S, Kim S-H (2011) The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis. *Biomaterials* 32(35): 9434–9443. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.042>
- Lewinson J, Mayr W, Wagner H (1994) Characterization and toxicological behavior of synthetic amorphous hydrophobic silica. *Regul Toxicol Pharmacol* 20(1): 37–57. <https://doi.org/10.1006/rtp.1994.1035>
- Maser E, Schulz M, Sauer UG, Wiemann M, Ma-Hock L, Wohlleben W, Hartwig A, Landsiedel R (2015) In vitro and in vivo genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO<sub>2</sub> nanomaterials. *Mutat Res* 794: 57–74. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.10.005>
- Morfeld P, Taeger D, Mitura H, Bosch A, Nordone A, Vormberg R, McCunney R, Merget R (2014) Cross-sectional study on respiratory morbidity in workers after exposure to synthetic amorphous silica at five German production plants. Exposure assessment and exposure estimates. *J Occup Environ Med* 56(1): 72–78. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000055>
- Morfeld P, Bosch A, Weber K, Heinemann M, Krueger N (2017) Synthetic amorphous silica in food: findings about “liver fibrosis” and other study-related findings in Van der Zande et al. (2014) are questionable. *EC Pharmacol Toxicol* 3(2): 49–61
- Murugadoss S, van den Brule S, Brassinne F, Sebaihi N, Mejia J, Lucas S, Petry J, Godderis L, Mast J, Lison D, Hoet PH (2020) Is aggregated synthetic amorphous silica toxicologically relevant? *Part Fibre Toxicol* 17: 1. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0331-3>
- Park E-J, Park K (2009) Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett* 184(1): 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.012>
- Park E-J, Roh J, Kim S-N, Kang M-S, Han Y-A, Kim Y, Hong JT, Choi K (2011) A single intratracheal instillation of single-walled carbon nanotubes induced early lung fibrosis and subchronic tissue damage in mice. *Arch Toxicol* 85(9): 1121–1131. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0655-8>
- Pott F, Roller M (2005) Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats. *Eur J Oncol* 10(4): 249–281
- Reuzel PGJ, Bruijntjes JP, Feron VJ, Woutersen RA (1991) Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats. *Food Chem Toxicol* 29(5): 341–354. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(91\)90205-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(91)90205-1)
- Roller M (2008) Untersuchungen zur krebserzeugenden Wirkung von Nanopartikeln und anderen Stäuben. Forschung Projekt F 2083. Dortmund: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. [https://www.baua.de/DE/Angebote/Publikationen/Berichte/F2083.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](https://www.baua.de/DE/Angebote/Publikationen/Berichte/F2083.pdf?__blob=publicationFile&v=2), abgerufen am 06 Dez 2022
- Ryu HJ, Seong N-W, So BJ, Seo H-S, Kim J-H, Hong J-S, Park M-K, Kim M-S, Kim Y-R, Cho K-B, Seo MY, Kim M-K, Maeng EH, Son SW (2014) Evaluation of silica nanoparticle toxicity after topical exposure for 90 days. *Int J Nanomedicine* 9(Suppl 2): 127–136. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57929>
- Sayes CM, Reed KL, Warheit DB (2007) Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci* 97(1): 163–180. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm018>
- Shin JH, Jeon K, Kim JK, Kim Y, Jo MS, Lee JS, Baek JE, Park HS, An HJ, Park JD, Ahn K, Oh SM, Yu IJ (2017) Subacute inhalation toxicity study of synthetic amorphous silica nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol* 29(12–14): 567–576. <https://doi.org/10.1080/08958378.2018.1426661>
- Taeger D, Brüning T, Merget R (2016 a) Schädigen synthetische amorphe Kieselsäuren die Atemwege oder Lungen? *IPA-Journal* 1: 16–17
- Taeger D, McCunney R, Bailer U, Barthel K, Küpper U, Brüning T, Morfeld P, Merget R (2016 b) Cross-sectional study on nonmalignant respiratory morbidity due to exposure to synthetic amorphous silica. *J Occup Environ Med* 58(4): 376–384. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000666>
- Takizawa Y, Hirasawa F, Noritomi E, Aida M, Tsunoda H, Uesugi S (1988) Oral ingestion of Syloid to mice and rats and its chronic toxicity and carcinogenicity. *Acta Med Biol* 36(1): 27–56
- Tarantini A, Huet S, Jarry G, Lancelleur R, Poul M, Tavares A, Vital N, Louro H, Silva MJ, Fessard V (2015 a) Genotoxicity of synthetic amorphous silica nanoparticles in rats following short-term exposure. Part 1: Oral route. *Environ Mol Mutagen* 56(2): 218–227. <https://doi.org/10.1002/em.21935>

- Tarantini A, Lancelleur R, Mourot A, Lavault M-T, Casterou G, Jarry G, Hogeveen K, Fessard V (2015 b) Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line. *Toxicol In Vitro* 29(2): 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.023>
- Tibaldi R, ten Berge W, Drolet D (2014) Dermal absorption of chemicals: estimation by IH SkinPerm. *J Occup Environ Hyg* 11(1): 19–31. <https://doi.org/10.1080/15459624.2013.831983>
- Warheit DB, Carakostas MC, Kelly DP, Hartsky MA (1991) Four-week inhalation toxicity study with Ludox colloidal silica in rats: pulmonary cellular responses. *Fundam Appl Toxicol* 16(3): 590–601. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(91\)90098-o](https://doi.org/10.1016/0272-0590(91)90098-o)
- Warheit DB, McHugh TA, Hartsky MA (1995) Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts. *Scand J Work Environ Health* 21(Suppl 2): 19–21
- Weber K, Bosch A, Bühler M, Gopinath C, Hardisty JF, Krueger N, McConnell EE, Oberdörster G (2018) Aerosols of synthetic amorphous silica do not induce fibrosis in lungs after inhalation: pathology working group review of histopathological specimens from a subchronic 13-week inhalation toxicity study in rats. *Toxicol Res Appl* 2: 1–17. <https://doi.org/10.1177/2397847318805273>
- Wolterbeek A, Oosterwijk T, Schneider S, Landsiedel R, de Groot D, van Ee R, Wouters M, van de Sandt H (2015) Oral two-generation reproduction toxicity study with NM-200 synthetic amorphous silica in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 56: 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.03.006>
- van der Zande M, Vandebriel RJ, Groot MJ, Kramer E, Herrera Rivera ZE, Rasmussen K, Ossenkoppele JS, Tromp P, Gremmer ER, Peters RJB, Hendriksen PJ, Marvin HJP, Hoogenboom RLAP, Peijnenburg AACM, Bouwmeester H (2014) Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. *Part Fibre Toxicol* 11(1): 8. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-8>