

Toxikologische Wirkungen durch Inhalation von NO₂ bei der Maus

E. Grandjean, Cl. Capitaine und A. Gilgen

Zusammenfassung

In Expositionskammern ist die Wirkung von Stickstoffdioxid-Luftgemischen in einmaligen oder wiederholten Inhalationsversuchen auf die Maus untersucht worden. Die wichtigsten Resultate können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. In Schwimmtesten haben wiederholte Expositionen, von einer Konzentration von 40 ppm NO₂ an, zu signifikanten Einbußen der Leistungsfähigkeit geführt. Die Einbußen waren stärker bei zusätzlich belasteten Schwimmversuchen. Die Ermüdbarkeit war bei den NO₂ exponierten Mäusen ausgeprägter als bei den Kontroll-Mäusen. Die Leistungseinbuße war reversibel und schien 2 Wochen nach der letzten Exposition aufgehoben zu sein.

2. Im chronischen Toxizitätsversuch sind zwischen jeder Expositionsstufe von 10 Wochen Normalperioden mit reiner Luft von weiteren 10 Wochen eingeschaltet worden. Im akuten Toxizitätsversuch dauerten die einmaligen Expositionen 6 Stunden. Die approximativen Werte für die LD₅₀ betragen:

im chronischen Versuch:	120 ppm
im akuten Versuch:	140 ppm

3. Toleranzversuche zeigten, daß eine einmalige Exposition zu 20 ppm die Mortalität bei 200 ppm von 90 auf 1,2% reduzieren kann.

4. Histologische Untersuchungen der Lungen von 13 Mäusen, die 4 Wochen nach Beendigung einer 8wöchigen Exposition autopsiert worden waren, zeigten lediglich bei 6 Tieren Septenverdickungen.

Résumé

Par des expériences répétées et aiguës, on a étudié l'influence d'un mélange gazeux de NO₂ et d'air, sur les performances physiques des souris.

Les résultats les plus importants sont les suivants:

1. La mesure des temps de natation montre que les souris exposées au NO₂ présentent une baisse de performance à partir de 40 ppm; la baisse de performance est encore plus marquée dans les courses avec charge. Les souris exposées au NO₂ montrent une plus grande fatigabilité que les souris contrôles. La diminution des performances physiques est réversible et semble revenir au niveau contrôle 2 semaines après la dernière exposition.

2. Les essais de toxicité chronique s'étendent sur une période de 10 semaines et alternent avec 10 semaines d'exposition à l'air pur. Les essais de toxicité aiguë ont une durée de 6 heures. Les valeurs approximatives de la LD₅₀ sont:

dans les essais chroniques:	120 ppm
dans les essais aigus:	140 ppm

3. Les essais de tolérance montrent qu'une seule exposition à 20 ppm de NO₂ diminue la mortalité survenant à 200 ppm de 90 à 1,2%.

4. L'étude histologique des poumons de 13 souris sacrifiées 4 semaines après la dernière exposition d'une expérience de 8 semaines, révèle un épaississement des septa chez 6 souris.

1. Einleitung

Stickstoffdioxid (NO_2) und Stickstofftetroxid (N_2O_4) sind bei Temperaturen oberhalb 21°C ein dunkelbraunes, stark reizendes Gasgemisch. Mit steigender Temperatur nimmt der Anteil des N_2O_4 zu; bei Körpertemperatur (37°C) ist das Verhältnis von NO_2 zu N_2O_4 gleich 3 : 7. Eine Vorstufe ist das Stickstoffoxid NO , das in der Luft rasch zu NO_2 oxidiert. Meistens werden NO_2 und NO zusammen bestimmt, wobei hernach kurzerhand von Stickstoffdioxid oder gelegentlich von Stickoxiden gesprochen wird. In der vorliegenden Arbeit werden wir immer von Stickstoffdioxid (NO_2) sprechen, wobei die Gesamtmenge der Oxide also $\text{NO} + \text{NO}_2$ gemeint sei.

Stickstoffdioxid reagiert mit Wasser und bildet eine Mischung von salpetriger Säure (HNO_2) und Salpetersäure (HNO_3). Der Vorgang findet auch statt beim Kontakt des NO_2 mit der gesättigten Alveolarluft und mit dem Schleim, der die Atemwege schützend und reinigend bedeckt.

NO_2 kommt in der Industrie bei verschiedenen chemischen Prozessen und bei Verbrennungsvorgängen vor. Von Bedeutung ist ferner der NO_2 Gehalt der Autoabgase.

In der Gasphase des Zigarettenrauches haben *Bokhoven* und *Niessen* [1] für NO_2 Konzentrationen zwischen 170 und 210 ppm (Durchschnitt: 190 ppm) nachgewiesen. Durch die Inhalation sind 87 bis 96% des NO_2 in den Atemwegen zurückbehalten worden. *Haagen-Smit* und Mitarbeiter [2] haben bei 21 verschiedenen Zigaretten NO_2 Konzentrationen zwischen 145 und 655 ppm gefunden; für Zigarren schwankten die Werte zwischen 167 und 1250 ppm und für Pfeifenrauch zwischen 126 und 1154 ppm. Die gleichen Autoren fanden, daß der Zigarettenrauch nach der Inhalation keine NO_2 mehr enthält, dagegen weist der nichtinhalierter Zigarettenrauch noch ungefähr ein Drittel der Ausgangswerte auf. Interessanterweise hatte der Rauch von Filterzigaretten gleich hohe NO_2 Werte wie derjenige von Zigaretten ohne Filter. Die Autoren glauben, daß die Beschleunigung des Verbrennungsprozesses und die Erhöhung der Glimmtemperaturen die Bildung von NO_2 erheblich verstärken.

Im U.S.-Bericht «Smoking and Health» [3] wird als Durchschnittswert von NO_2 in der Gasphase des Zigarettenrauches eine Konzentration von 25 ppm angegeben.

2. Die Toxizität des NO_2

Der typische Geruch des NO_2 ist bereits bei 5 ppm wahrnehmbar; zwischen 10 und 20 ppm treten beim Menschen die ersten Reizerscheinungen in den Augen, in der Nase und in den oberen Luftwegen auf. Bei Konzentrationen oberhalb 200 ppm kann es zu tödlichen Unfällen kommen, die auf eine Quellung des Lungengewebes infolge Schädigung der Kapillaren zurückgeführt werden.

Autor	Tierart	Konz. (ppm)	Dauer der Exposition	Sterblichkeit	Bemerkungen
<i>Gray</i> (1954)	Ratte id.	--	30 Min. 240 Min.	LD ₅₀ = 138 ppm LD ₅₀ = 67 ppm	Lungenödem id.
<i>Carson</i> (1962)	Ratte id. id. id. id. id. id. id.	-- -- -- -- -- 190 90 72	5 Min. 15 Min. 30 Min. 60 Min. 5 Min. 15 Min. 60 Min.	LD ₅₀ = 415 ppm LD ₅₀ = 201 ppm LD ₅₀ = 162 ppm LD ₅₀ = 115 ppm 0 0 0	-- -- -- -- -- -- --
<i>Ehrlich</i> (1963)	Mäuse	28	60 Min.	0	--
<i>Murphy</i> (1964)	Ratte	25	2 Std.	0	--
	Ratte	31	4 Std.	0	--
	id.	27	20 Std.	0	--
<i>Murphy</i> (1964)	Mäuse	7,7	6 Std.	0	--
	Meerschwein	13	2 Std.	0	--
<i>Buckley</i> (1965)	Meerschwein	30-100	1 Std.	alle tot	Abnahme der motorischen Leistung im Lauftrac.
	id.	30	1 Std.	alle tot	--
<i>Steadman</i> (1966)	Ratte	60	8 Std.	6 von 15	Lungenödem id.
	Meerschwein	60	8 Std.	13 von 15	--

Tabelle 1 Die Toxizität von NO₂ in einmaligen Inhalationsversuchen (akute Toxizität), nach bisherigen Literaturangaben.

Autor	Tierart	Konz. (ppm)	Dauer der Exposition	Sterblichkeit	Bemerkungen
<i>Gray</i> (1952)	Ratte	9-14 ²	10 bis 24 Tage	0	Emphysem, Pneumonie und entzündliche Prozesse.
<i>Gray</i> (1954)	Ratte	4 ²	6 Monate	0	—
	Mäuse	4 ²	6 Monate	0	—
<i>Rippeyton</i> (1959)	Meerschwein	4 ²	6 Monate	0	—
	Ratte	0,5 ¹	2 bis 6 Wochen	0	—
<i>Freeman</i> (1964)	Ratte	12,5 ¹	bis 213 Tage	1 von 9	Epitheliale Hyperplasien in Bronchien und Bronchiolen.
	id.	25	nach 157 Tagen	3 von 6	Fibröse Proliferationen.
id.	id.	50	nach 20 Tagen	1 von 9	Akute Pneumonien.
	id.	100	nach 68 Tagen	6 von 8	Akutes Lungenödem.
<i>Balchum</i> (1965)	id.	15 ²	nach 24 Std.	alle tot	—
	Meerschwein	15 ¹	10 Monate	0	—
<i>Buckley</i> (1965)	Hund, Ratte, Kaninchen,	1 bis 25 ²	10 Wochen	0	—
	Maus, Hamster, Meerschwein	1 bis 25 ²	10 bis 18 Monate	0	—
<i>Haydon G. B.</i> (1965)	Ratte	0,8 ¹	255 bis 786 Tage	0	Zunahme der Lungenventilation.
	id.	4 ¹	16 Wochen	0	Abnahme des Körpergewichtes.
<i>Freeman</i> (1966)	Ratte	12 ¹	20 bis 43 Tage	0	Erweiterte Alveolen.
	Ratte	0,8 ¹	lebenslänglich	0	Zunahme der Lungenventilation.
<i>Steadman</i> (1966)	Ratte	0,5 ¹	30 bis 90 Tage	bis 7%	—
	id.	5 ¹	30 bis 90 Tage	0	—
id.	id.	11 ¹	30 Tage	16%	—
	id.	11 ¹	60 Tage	33%	—
id.	id.	11 ¹	90 Tage	37%	—
	Meerschwein	0,5 ¹	30 bis 90 Tage	0	—
id.	id.	5 ¹	30 bis 90 Tage	bis 13%	Bronchitis, Bronchopneumonia.
	id.	11 ¹	30 Tage	7%	id.
id.	id.	11 ¹	60 Tage	49%	id.
	id.	11 ¹	90 Tage	63%	Enzymsschädigungen.
<i>Buckley</i> (1967)	Meerschwein	10 ¹	12 bis 45 Tage	0	—

¹ kontinuierliche Exposition.

² tägliche Expositionen von 4 bis 8 Stunden.

Tabelle 2 Die Toxizität von NO₂ in wiederholten und langdauernden Inhalationsversuchen (chronische Toxizität), nach bisherigen Literaturangaben.

In der Industrie ist in den meisten Ländern der zulässige Grenzwert (M.A.K.-Wert) auf 5 ppm festgelegt worden.

Die Toxizität des NO₂ ist in Inhalationsversuchen in zahlreichen Tierexperimenten geprüft worden.

Die Ergebnisse der kurzdauernden und einmaligen Expositionen sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß die Dauer der Inhalation von entscheidender Bedeutung ist: bei 60 Min. Exposition ist die akute Toxizität bei der Ratte ungefähr 4 mal höher als bei einer Exposition von 5 Min. Unter den pathologischen Befunden stehen Lungenödeme, Dyspnoe, Reizerscheinungen in den Augen im Vordergrund.

Murphy (1964) hat bei der Maus die Wirkung von NO₂ Inhalationen von 6 Stunden Dauer auf die gleichzeitig registrierte spontane motorische Aktivität im Laufrad untersucht. Bezogen auf Kontrollversuche (= 100%) fand er folgende Veränderungen der motorischen Aktivität:

bei 3,7 ppm	120%
bei 7,7 ppm	80%
bei 14,3 ppm	60%
bei 20,9 ppm	17%

Dies zeigt, daß die spontane Lauftätigkeit der Maus durch NO₂ deutlich und in dosisabhängiger Weise herabgesetzt wird, wobei 7,7 ppm bereits eine wirk-same Konzentration ist.

Die Ergebnisse der wiederholten und langdauernden Expositionen (chronische Toxizität) sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Betrachtet man summarisch die Ergebnisse, so kann man festhalten, daß Expositionen unter 10 ppm bei allen Versuchstieren nur selten letal waren. Oberhalb dieses Grenzwertes nimmt die Letalität in Abhängigkeit der Konzentration und der Dauer der Exposition zu. Unter den pathologischen Befunden sind Pneumonien, Emphyseme und Lungenödeme am häufigsten.

Stokinger (1959/60) sowie *Wagner* und Mitarbeiter (1965) haben den Einfluß wiederholter NO₂ Inhalationen auf die Letalität untersucht. *Stokinger* fand bei der Maus nach 10 ppm keine Veränderung der Toleranz; dagegen bewirkte eine Exposition von 4 Stunden zu 32 ppm eine Erhöhung der Toleranz. *Wagner* hat seine Mäuse während 7 Wochen zu 5 ppm NO₂ exponiert. Danach bewirkte eine Exposition von 60 ppm eine Letalität von 36% während nicht vorexponierte Kontrollmäuse eine Letalität von 64% aufwiesen. In einem zweiten Versuch hat eine wiederholte Exposition zu 25 ppm im nachfolgenden Experiment mit 70 ppm keine Mortalität ergeben, während Kontrollmäuse eine Letalität von 29% gezeigt haben. Rattenversuche haben analoge Resultate ergeben.

Die bisherigen chronischen toxikologischen Untersuchungen haben zur Annahme Anlaß gegeben, daß das NO₂ in den Atmungsorganen zur Bildung freier Radikale führt, die mit Eiweißen reagieren und so Zellschädigungen verursachen.

Neuerdings haben das NO₂ und die Nitrate deshalb eine besondere Bedeutung erlangt, weil beim Tabakrauchen eine der chemischen Voraussetzungen für die Bildung von Nitrosaminen gegeben ist. Nitrosamine sind kanzerogene Stoffe und kommen somit als Ursache des Lungenkrebses bei Rauchern in Frage.

3. Ziel der vorliegenden Arbeit

Da der Angriffspunkt des NO₂ in den Atmungsorganen liegt und da ferner bekannt ist, daß die Raucher häufig funktionelle Änderungen der Atmung aufweisen, schien es uns von Interesse zu sein, die chronische Toxizität und die Wirkung wiederholter NO₂ Inhalationen auf die Leistungsfähigkeit zu untersuchen. Hierfür war der Schwimmtest bei der Maus geeignet, da bei diesem Verfahren eine körperliche Höchstleistung erfordert wird.

Gleichzeitig wollten wir prüfen, ob allfällige Änderungen der Schwimmleistungen bereits bei nicht-letalen Dosen auftreten und somit als empfindliche Kriterien pathogener Wirkungen Verwendung finden können.

4. Methoden

4.1 Apparatur und Dosierung des NO₂

Mit Hilfe einer in einem Kühltank angeordneten, motorisch angetriebenen Injektionsanlage (Infusionspumpe von *Braun, Melsungen* BRD) wurde flüssiges NO₂ in einen Luftstrom von 23 bis 25°C eingespritzt. Das Luft-NO₂-Gasgemisch wurde in eine Expositions-kammer aus Plexiglas von 275 l Volumen eingeblasen.

Um die NO₂ Konzentrationen in der Expositions-kammer zu bestimmen, benutzten wir die ASTM-Standardmethode (1962). Danach werden Luftproben von 1 l in eine Absorptionslösung (H₂O₂ in verdünnter H₂SO₄-Lösung) abgesogen. Hier wird NO₂ zu HNO₃ oxydiert und das entstehende Nitration mit Phenoldisulfonsäure spektrophotometrisch bestimmt.

In Vorversuchen ist die Dosierungsanlage für 5 Konzentrationsstufen in

Berechnete Konzentration in ppm	Zahl der Versuche	Durchschnitt der gemessenen Konzentration in ppm	Vertrauensbereich von 95%
10	12	9,7	3,1– 16,3
20	18	23,2	8,0– 38,4
40	13	51,4	33,6– 69,2
100	17	86,0	48,5–123,5
200	12	170,7	114,3–227,1

Tabelle 3 Die Konzentrationen von NO₂ in der Expositions-kammer bei 5 Dosierungen.

wiederholten Experimenten geprüft worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

4.2 Versuchsanordnungen

Die Untersuchungen haben folgende 3 Versuche umfaßt:

4.2.1 Schwimmversuch

90 männliche Mäuse von 25 bis 30 g Gewicht sind in zufälliger Anordnung in 4 Gruppen eingeteilt worden. Diese Gruppen wurden wie folgt eingesetzt:

1. Gruppe:	15 Schwimmmäuse	Kontrollversuche
2. Gruppe:	30 Nicht schwimmende Mäuse	Kontrollversuche
3. Gruppe:	15 Schwimmmäuse	Expositionsversuche
4. Gruppe:	30 Nicht schwimmende Mäuse	Expositionsversuche

Für die Schwimmversuche haben wir uns an die von *Böttig* (1961) beschriebene Methode gehalten: Mäuse werden angelernt, in einem Schwimmkanal eine Distanz von 1,6 m zurückzulegen. Mit einer Stoppuhr werden die Schwimmzeiten als Maß der Leistungsfähigkeit gemessen. Die Motivation zur Leistung beruht auf der Belohnung, an der Zielstelle aus dem Wasser von 20 °C herauszukommen. Im Gegensatz zu den Ratten hatten Licht, Lärm und Wind am Startplatz keinen Einfluß auf die Leistung der Mäuse. Wir verzichteten deshalb auf deren Anwendung. Jeder Schwimmversuch setzt sich aus 10 Läufen zusammen, wobei alternierend Läufe ohne Last und Läufe mit Last absolviert werden. Als Last dient ein Gewicht von 0,75 g, das durch einen Faden am Schwanz befestigt und über zwei Rollen von der Maus gezogen wird.

Die Expositionen erfolgten in 4 Konzentrationsstufen (20, 40, 100 und 200 ppm), wobei jede Konzentration an zweimal 5 Tagen (während 2 Wochen) je 6 Stunden pro Tag angewendet worden ist. Die Schwimmteste erfolgten jede Woche am 2. und 4. Tag, unmittelbar nach der Exposition.

4.2.2 Chronischer und akuter Toxizitätsversuch

Im chronischen Versuch sind 100 männliche Mäuse von 25 bis 30 g Körpergewicht in zufälliger Weise in zwei Gruppen von 50 Tieren eingeteilt worden.

Die Versuchsanordnung war wie folgt:

	1.-10.Wo.	11.-20.Wo.	21.-30.Wo.	31.-40.Wo.	41.-50.Wo.
1. Gr.	10 ppm NO ₂	n. L.	40 ppm NO ₂	n. L.	200 ppm NO ₂
2. Gr.	n. L.	20 ppm NO ₂	n. L.	100 ppm NO ₂	n. L.

Gr. = Gruppe
n. L. = normale Luft

Die Körpergewichte sind wöchentlich – immer am gleichen Wochentag – gemessen worden.

Im akuten Toxizitätsversuch sind insgesamt 230 Mäuse von 25 bis 40 g Gewicht eingesetzt worden. Die Expositionen dauerten 6 Stunden, und jedes Tier ist ein einziges Mal dem NO₂ exponiert worden.

4.2.3 *Toleranzversuche*

160 männliche Mäuse von 25 bis 30 g Gewicht sind in 8 Gruppen zu je 20 Tieren eingeteilt worden. 4 Gruppen wurden einmal während 6 Stunden zu 20 ppm NO₂ vorexponiert. Nach Zeiträumen von 2 bis 10 Tagen sind die gleichen Mäuse wiederum während 6 Stunden einer zweiten Konzentration von diesmal 200 ppm exponiert worden. Die 4 anderen Gruppen dienten als Kontrolltiere und wurden ohne Vorexposition nur einmal während 6 Stunden zu 200 ppm exponiert.

Aus den vorexponierten Gruppen sind 40 Mäuse, welche die nachträgliche Exposition zu 200 ppm überlebt hatten, nach einem weiteren Zeitraum von 100 Tagen nochmals zu 200 ppm exponiert worden.

4.2.4 *Histologische Untersuchungen*

Die 13 Mäuse, die den Schwimmversuch nach zweiwöchigen Expositionen zu 20, 40, 100 und 200 ppm NO₂ überlebt hatten, sind 4 Wochen nach der letzten Exposition autopsiert worden. Die Lungen dieser Tiere sowie diejenigen von 11 Kontrollmäusen sind in Formalinlösung zu 4% aufgehoben, später mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und histologisch untersucht worden. Die histologischen Untersuchungen sind durch das Institut für industrielle und biologische Forschung Köln (Dr. U. Hackenberg) ausgeführt worden.

5. Ergebnisse

5.1 *Resultate der Schwimmversuche*

In der Versuchszeit von 8 Wochen sind bei den exponierten 15 Mäusen 3 Tiere gestorben: eine Maus bei 40 ppm und 2 Mäuse bei 200 ppm.

Die pro Konzentrationsstufe berechneten Durchschnittswerte der Schwimmzeiten sind in Abbildung 1 dargestellt.

Die exponierten Mäuse zeigen von 40 ppm an eine durchschnittliche Verlängerung der Schwimmzeiten. Die Differenz zu den Kontrolltieren ist bei 100 und 200 ppm statistisch gesichert (*t* – Test nach Student). Die durchschnittliche Verlängerung als Prozentsatz der Kontrolltiere ist in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Daraus geht hervor, daß die NO₂ bedingten Schwimmzeitverlängerungen bei Testen mit Belastung (m. L.) erheblich größer sind als bei den Läufen ohne

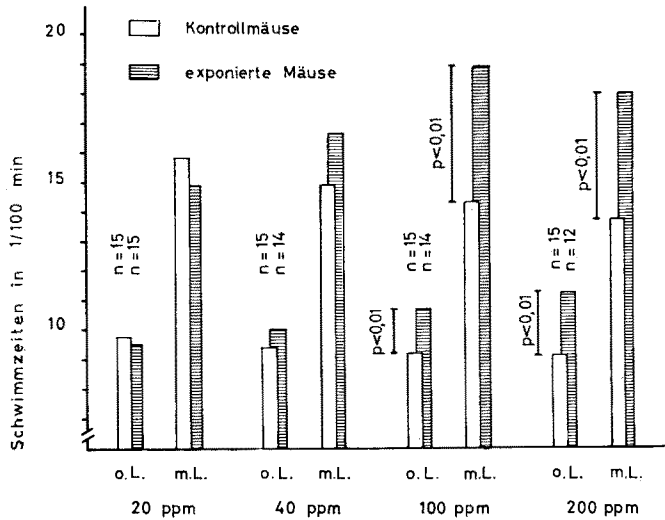


Abbildung 1 Die Wirkung wiederholter Inhalationen von NO_2 auf die Schwimmleistung von Mäusen.

15 Mäuse sind 6 Stunden pro Tag für jede Konzentrationsstufe während 2×5 Tagen exponiert worden. Jede Kolonne entspricht dem Durchschnittswert von 4 Schwimmversuchen, die in einer Konzentrationsstufe von 2 Wochen ausgeführt worden sind.

o.L. = Schwimmzeiten ohne Last.
 m.L. = Schwimmzeiten mit Last.
 n = Zahl der Mäuse.

40 ppm	o. L.	+ 6%
40 ppm	m.L.	+ 11%
100 ppm	o. L.	+ 16%
100 ppm	m.L.	+ 32%
200 ppm	o. L.	+ 23%
200 ppm	m.L.	+ 31%

Tabelle 4 Die Verlängerung der durchschnittlichen Schwimmzeiten als Prozentsatz der Werte der Kontrollmäuse (Durchschnittswerte von 4 Versuchen pro Expositionsstufe).

Last. Die Einschränkung der Leistungsfähigkeit durch NO_2 ist somit bei Höchstleistungen besonders ausgeprägt.

In Abbildung 2 haben wir die Durchschnittswerte aller Schwimmversuche mit Last graphisch zusammengestellt.

Auf Grund der signifikanten Wechselwirkung «Tage \times Gruppen \times Konzentration» haben wir mit Hilfe des Duncantestes noch folgende signifikante Unterschiede in den Testen m. L. gefunden:

- bei 40 ppm: 12. Tag gegenüber 2. bis 8. Tag
- bei 100 ppm: 2. Tag gegenüber 4. bis 12. Tag
- bei 200 ppm: 8. Tag gegenüber 2., 4. und 12. Tag

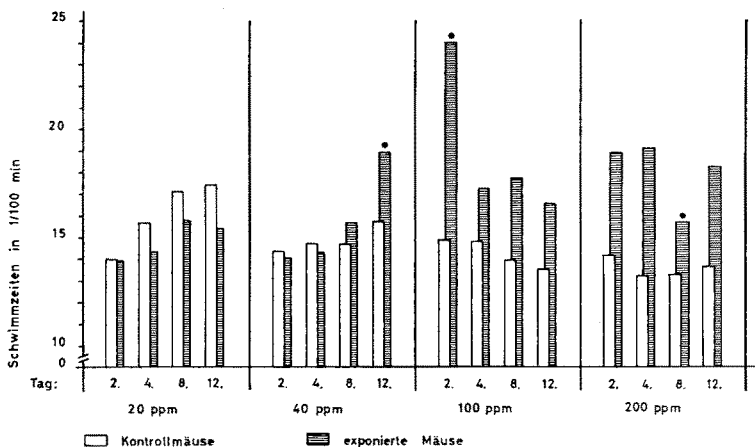


Abbildung 2 Die Durchschnittswerte der Schwimmzeiten mit Last aller Testversuche.

* Sind Durchschnitte, die von den anderen Werten der gleichen Konzentration signifikant abweichen.

Alle der Abbildung 2 zugrunde liegenden Einzelwerte sind mit Hilfe einer Streuungserlegung analysiert worden. Die wichtigsten Ergebnisse sind aus Tabelle 5 ersichtlich.

Streuung	F.G.	D. Q.	F	p
zwischen Läufen	4	157,2	51,9	< 0,01
zwischen Tagen	3	2,9	0,9	-
zwischen m.L. und o.L.	1	2568,7	847,4	< 0,01
zwischen Konzentrationen	3	9,2	3,0	< 0,05
zwischen exponierten und Kontrollmäusen (Gruppen)	1	27,6	90,3	< 0,01

Tabelle 5 Streuungserlegung aller Schwimmteste.

Aus der Tabelle 5 geht hervor, daß die Werte der 5 aufeinanderfolgenden Läufe signifikant voneinander abweichen. Dies geht auch aus der Abbildung 3 hervor, in welcher die Durchschnittswerte der aufeinanderfolgenden Einzelläufe dargestellt sind.

Aus der Abbildung 3 ist ersichtlich, daß die Schwimmzeiten mit jedem Lauf länger werden, wobei diese Verlängerungen mit zunehmender Konzentration des NO_2 verstärkt sind. Diese Wirkung des NO_2 ist statistisch signifikant ($\text{Läufe} \times \text{Konzentration} \times \text{Gruppe} = p > 0,01$).

Nach Beendigung der Inhalationsversuche haben wir während Wochen das Schwimmverhalten der überlebenden Mäuse noch je dreimal gemessen.

Die Durchschnittswerte dieser Messungen sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Daraus ist ersichtlich, daß sich nach Beendigung der Exposition die Schwimmzeiten wieder verkürzten. Nach 2 Wochen waren die Schwimmzeiten in beiden Gruppen wieder von gleicher Größenordnung.

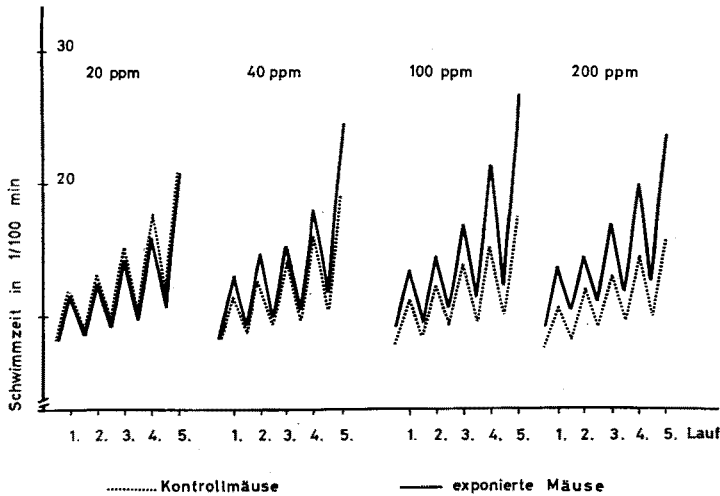


Abbildung 3 Durchschnittswert der Schwimmzeiten für jeden der 5 aufeinanderfolgenden Einzelläufe, getrennt für die 4 Konzentrationsstufen. Die Scheitelpunkte stellen die Durchschnittswerte der Läufe mit Last, die Fußpunkte diejenigen der Läufe ohne Last dar.

	Vorgängig exponierte Mäuse n = 12		Kontroll-Mäuse n = 15	
	o.L.	m.L.	o.L.	m.L.
4 letzte Versuche unter 200 ppm	11,2	18,0	9,1	13,7
Nach 1 Woche	10,1	15,5	9,3	12,9
Nach 2 Wochen	10,1	14,4	9,5	13,0
Nach 3 Wochen	9,7	14,7	9,3	13,5

Tabelle 6 Durchschnittswerte der Schwimmzeiten nach Beendigung der Inhalationsversuche.

5.2 Resultate der Toxizitätsprüfungen

Der *chronische Versuch* mit 100 Mäusen hat mit zunehmender Konzentration des NO_2 eine sukzessive Erhöhung der Mortalität ergeben. Die Resultate sind in Abbildung 4 wiedergegeben.

Die nach Behrens berechnete *chronische LD_{50}* ergab einen Wert von 120 ppm.

In diesem chronischen Versuch haben die wöchentlich gemessenen Körpergewichte die in Tabelle 7 zusammengestellten Durchschnittswerte ergeben.

Bis zur 30. Versuchswoche (etwa 36. Lebenswoche) sind die Körpergewichte angestiegen, um hernach bei ungefähr 40 g stehen zu bleiben. Auffallend ist die Tatsache, daß die Perioden von 10 Wochen Inhalation oder 10 Wochen «reine Luft» keine wesentlichen Veränderungen der Körpergewichte verursacht haben.

Andere Wachstumsversuche mit dem gleichen Mäusestamm haben ergeben, daß die Durchschnittswerte der Körpergewichte ungefähr 40 g im Maximum

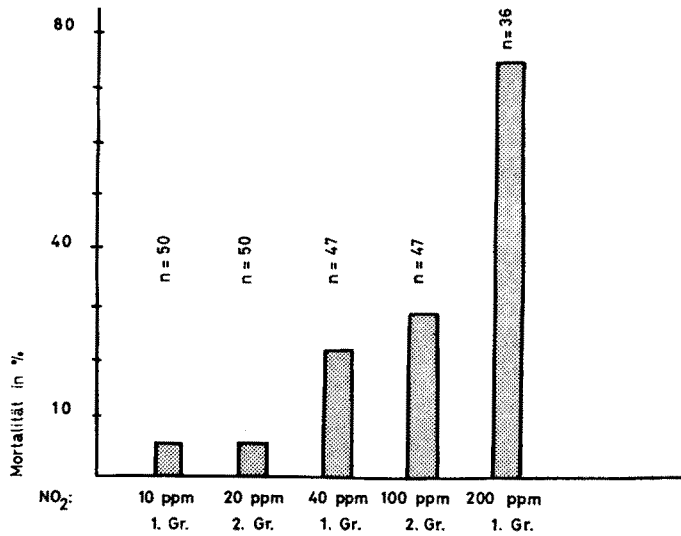


Abbildung 4 Die Mortalität von Mäusen im chronischen Toxizitätsversuch.

Gr. = Gruppe.

n = Zahl der eingesetzten bzw. überlebenden Mäuse.

Jede Expositionsstufe dauerte 10 Wochen. Die beiden Gruppen 1 und 2 wurden alternierend eingesetzt.

	Erste Gruppe		Zweite Gruppe	
	Bedingung	Gew. in g	Bedingung	Gew. in g
Anfangsgewicht	—	25,6	—	25,8
1. bis 10. Woche	10 ppm	32,4	reine Luft	32,6
11. bis 20. Woche	reine Luft	38,0	20 ppm	37,1
21. bis 30. Woche	40 ppm	40,2	reine Luft	41,6
31. bis 40. Woche	reine Luft	38,6	100 ppm	41,4
41. bis 50. Woche	200 ppm	38,3	reine Luft	41,2

Gew. = Gewicht

Tabelle 7 Körpergewichte in g der überlebenden Mäuse während des chronischen Toxizitätsversuches. (Durchschnittswerte von je 10 Wochen.)

Konzentration	n	Tote Mäuse	Mortalität in %
20	30	0	0
40	45	0	0
100	105	23	22
200	50	46	92

n = Zahl der eingesetzten Mäuse.

Tabelle 8 Die akute Toxizität von NO₂ bei der Maus (Inhalationsversuche von 6 Stunden).

erreichten. Demnach haben unsere Expositionsversuche zu NO₂ das Wachstum der Mäuse nicht beeinträchtigt.

Der akute Toxizitätsversuch hat die in Tabelle 8 zusammengestellten Resultate ergeben.

Die nach Behrens approximativ berechnete LD₅₀ ergibt einen Wert von 140 ppm.

5.3 Resultate der Toleranzversuche

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Zahl der Mäuse	1. Exposition ppm NO ₂	Intervall zw. 1. u. 2. Exposition in Tagen	2. Exposition ppm NO ₂	Mortalität in %
20	20	2	200	0
20	—	—	200	75
20	20	5	200	0
20	—	—	200	100
20	20	7	200	5
20	—	—	200	100
20	20	10	200	0
20	—	—	200	85
40	20 u. 200	100	200	71,7
20	—	—	200	95

Tabelle 9 Der Toleranzversuch zu 200 ppm NO₂.

Vergleicht man alle vorexponierten mit den nicht exponierten Mäusen, so erhält man für 200 ppm NO₂ folgende Mortalitätswerte:

in 20 ppm vorexponierte Mäuse: 1,2% Mortalität
 vorgängig nicht exponierte Mäuse: 90% Mortalität

Die vorgängige Exposition zu 20 ppm NO₂ während 6 Stunden hat somit die Toleranz der Mäuse zu 200 ppm NO₂ erheblich erhöht. Dabei hat die erhöhte Toleranz mindestens 10 Tage angehalten. Nach 100 Tagen ist keine erhöhte Toleranz mehr feststellbar.

5.4 Die histologischen Ergebnisse

Die wichtigsten Beobachtungen sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tiergruppe:	Zahl der Mäuse	Alveolar-makrophagen	Septen-verdickung	ohne Befund
Exponierte Mäuse	13	4 mal	6 mal	3
Kontroll-Mäuse	11	0	0	11

Tabelle 10 Histologische Befunde der Lungen von exponierten und von Kontroll-Mäusen.

Das Auftreten von Alveolarmakrophagen kann kaum als spezifische NO₂-Wirkung betrachtet werden, da diese Zellen auch bei normalen Tieren häufig beobachtet werden.

Auffallend ist dagegen die bei 6 exponierten Mäusen zum Teil mehrfach beobachtete Alveolarseptenverdickung, die möglicherweise eine Folge der 8 Wochen dauernden Reizwirkung des NO₂ darstellt.

6. Diskussion der Ergebnisse

Die Schwimmversuche haben gezeigt, daß die langdauernde und wiederholte Inhalation von NO₂ von einer Konzentration von 40 ppm an zu einer Leistungseinbuße führt, die in Schwimmversuchen mit hohen Belastungen ausgeprägt ist. Die Analyse der Einzelläufe ließ außerdem erkennen, daß das NO₂ die Ermüdbarkeit der Mäuse erhöht.

Murphy (1964) hat bei einmaligen Versuchen während der 6 Stunden dauernden Inhalation von NO₂ von 7,7 ppm an eine Abnahme der motorischen Aktivität im Laufrad festgestellt. Aus beiden Versuchen geht somit hervor, daß während der Inhalation die spontane Leistungsbereitschaft der Mäuse bereits bei 7,7 ppm NO₂ herabgesetzt ist, während die körperliche Leistungsfähigkeit im anstrengenden Schwimmtest bei 40 ppm NO₂ reduziert wird. Einschränkend ist noch zu sagen, daß die Schwimmteste nicht während, sondern unmittelbar *nach* den Inhalationen – aber bei reiner Luft – absolviert worden sind.

Vergleichen wir diese Ergebnisse mit der akuten und chronischen Toxizität, so ergibt sich folgendes Bild:

Die LD₅₀ liegt im akuten Versuch bei 140 ppm, während die spontane Aktivität im Laufrad bereits bei 7,7 ppm verändert wird.

Im chronischen Versuch liegt die LD₅₀ ungefähr bei 120 ppm, während die Leistungen im Schwimmtest bereits bei 40 ppm eine Einbuße erleiden.

Dies zeigt, daß für die Beurteilung der Wirkung von NO₂-Inhalationen Verhaltensteste entschieden empfindlicher sind als die Prüfung der Letalität.

Die bekannten Wirkungen des NO₂ auf die Lungen (Reizwirkungen, Lungenödeme) geben zur Vermutung Anlaß, daß die Herabsetzung der Schwimmleistungen durch die Reizwirkungen auf die Atmungsorgane verursacht werden. In diesem Zusammenhang ist die Feststellung interessant, daß die Schwimmleistungen 2 Wochen nach Beendigung der Inhalationsversuche wieder nahezu normal waren. Dies bedeutet, daß die Wirkungen des NO₂ auf die Leistungsfähigkeit reversibel sind und daß die später festgestellten histologischen Veränderungen (Septenverdickung) keine Wirkungen auf die Schwimmleistungen mehr hatten.

Die Beobachtungen in den chronischen Versuchen und die Ergebnisse der Toleranzprüfung zeigen, *daß sich die Mäuse in hohem Maße an die NO₂-Inhalationen anpassen können.* Eine einmalige Exposition zu 20 ppm hat die Mortalität

bei 200 ppm von 90 auf 1,2% reduziert! Die Toleranzerhöhung konnte für eine Dauer von 10 Tagen nachgewiesen werden.

Im Schwimmversuch, wo die Mäuse während 8 Wochen dem NO₂ exponiert worden waren, sind bei 200 ppm nur 2 von 14 Mäusen gestorben (14%). Im chronischen Toxizitätsversuch, bei welchem zwischen zwei Konzentrationsstufen 10 Wochen ohne Expositionen eingeschaltet waren, haben hingegen bereits 40 ppm eine Mortalität von 23% und 200 ppm eine solche von 75% bewirkt. Wir müssen daraus den Schluß ziehen, daß *in den zwischengeschalteten Perioden von 10 Wochen (mit reiner Luft) die Toleranzerhöhungen wieder aufgehoben worden sind. Dies erklärt auch den geringen Unterschied zwischen der LD₅₀ des chronischen und des akuten Versuches.*

Die Beobachtungen im Schwimmversuch lassen die Annahme zu, daß die LD₅₀ in einer langdauernden, sukzessive ansteigenden Exposition erheblich höhere Konzentrationen ergeben hätten als bei unserer Versuchsanordnung.

Literatur:

- [1] ASTM Standards on methods of atmospheric sampling and analysis, published by the American society for testing and materials, Philadelphia second edition, p. 81–85 (1962).
- [2] Balchum O. J. et al.: Nitrogen dioxide inhalation and lung antibodies. Arch. Env. Health 10, 274–277 (1965).
- [3] Bättig K.: Das Schwimmen von Ratten durch einen Wasserkanal. Methodische und pharmakologische Einflüsse auf Leistung und Ermüdung. Helv. physiol. Acta 19, 384–398 (1961).
- [4] Bokhoven C., Niessen H. J.: Amounts of oxides of nitrogen and carbon monoxide in cigarette smoke with and without inhalation. Nature 192, 458–459 (1961).
- [5] Buckley R. D., Balchum O. J.: Acute and chronic exposures to nitrogen dioxide. Arch. Env. Health 10, 220–223 (1965).
- [6] Buckley R. D., Balchum O. J.: Enzyme alterations following nitrogen dioxide exposure. Arch. Env. Health 14, 687–692 (1967).
- [7] Carson T. R. et al.: The responses of animals inhaling nitrogen dioxide for single, short-term exposures. Amer. Indust. Hyg. Ass. J. 23, 457–462 (1962).
- [8] Ehrlich R.: Effects of air pollutants on respiratory infection. Arch. Env. Health 6, 638–642 (1963).
- [9] Freeman G., Haydon G. B.: Emphysema after low level exposure to NO₂. Arch. Env. Health 8, 125–128 (1964).
- [10] Freeman G., Furiosi N. J., Haydon G. B.: Effects of continuous exposure of 0,8 ppm NO₂ on respiration of rats. Arch. Env. Health 13, 454–456 (1966).
- [11] Gray E. L., MacNamee J. K., Goldberg S. B.: Toxicity of NO₂ vapors at very low level. Arch. Env. Health 6, 20–21 (1952).
- [12] Gray L. B. et al.: Toxicity of the oxides of nitrogen. Arch. Env. Health 10, 418–422 (1954).
- [13] Gray L. B., Goldberg S. B., Patton F. M.: Toxicity of the oxides of nitrogen. Arch. Env. Health 10, 423–425 (1954).
- [14] Haagen-Smit A. J., Brunelle M. F., Hara J.: Nitrogen oxides content of smoke of different types of tobacco. Arch. Health 20, 399–400 (1959).
- [15] Haydon G. B., Freeman G., Furiosi N. J.: Covert pathogenesis of NO₂ induced emphysema in the rat. Arch. Env. Health 11, 776–783 (1965).
- [16] Murphy S. D., Davis H. V., Zaratzian V.: Biochemical effects in rats from irritating air contaminants. Tox. and Appl. Pharmacology 6, 520–528 (1964).
- [17] Murphy S. D. et al.: Altered function in animals inhaling low concentrations of ozone and nitrogen dioxide. Amer. Indust. Hyg. Ass. J. 25, 246–253 (1964).
- [18] Ripperton L. A., Johnston D. R.: Effects on growing animals of a continuous exposure to experienced concentrations of NO₂. Amer. Indust. Hyg. Ass. J. 20, 324–326 (1959).

- [19] *Smoking and Health*: Report of the U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service Publication No. 1103.
- [20] *Steadman B. L.* et al.: Effects on experimental animals of long-term continuous inhalation of nitrogen dioxide. *Tox. and Appl. Pharmacology* 9, 160–170 (1966).
- [21] *Stokinger H. E.*: Toxicologic interactions of mixtures of air pollutants. Review of recent developments. *Int. J. Air Poll.* vol. 2, 313–326 (1960).
- [22] *Wagner D.*, et al.: Experimental Study of threshold limit of NO₂. *Arch. Env. Health* 10, 455–466 (1965).

Verdankung

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Association suisse des Fabricants de Cigarettes, Fribourg, durchgeführt.

Adresse der Autoren: Prof. Dr. med. *E. Grandjean*, *Cl. Capitaine* und Dr. med. *A. Gilgen*, Institut für Hygiene und Arbeitsphysiologie ETH, Clausiusstraße 25, 8006 Zürich