

**Bis(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)  
(CAS-Nr.: 117-81-7)**

**A) MUTAGENE EFFEKTE:**

Im Risk Assessment Report werden die Daten zur Mutagenität insgesamt als negativ bei valider Datenbasis bewertet.

Eine tabellarische Übersicht zu den Mutagenitätstesten mit DEHP findet sich im EU Risk Assessment Report, Kap. 4.2.7. Darin referiert sind folgende in vitro Tests (die Originalzitate sind dem EU Risk Assessment Report entnommen):

- 18 Ames-Tests; nach heutigen Bewertungskriterien alle negativ
- 18 Genmutationstests an Pilzen; 4 eindeutig negativ, 2 fraglich
- 8 Genmutationstests an Säugerzellen; 7 hiervon negativ, 1 Maus-Lymphoma Assay; positiv (möglicherweise klastogener Effekt)
- 4 DNA-Strangbruchtests (CHO- und SHE-Zellen, Ratten- und Hamsterhepatozyten); 3 hiervon negativ, an SHE-Zellen nicht eindeutig
- 5 UDS-Tests an Rattenhepatozyten; alle negativ, 1 UDS-Test an Maushepatozyten; negativ
- Zytogenetik an *Saccharomyces cerevisiae*; 1 positiv, 1 negativ
- Zytogenetik an Hamsterleberzellen; positiv
- Zytogenetik an Humanlymphozyten; 3 negativ
- Zytogenetik an CHL- und CHO-Zellen; 5 negativ
- Zytogenetik an SHE-Zellen; positiv

In einer IPCS-Studie zur Validierung von Mutagenitätstests war DEHP in 51 von 67 unterschiedlichen Kurzzeittests negativ (Ashby et al., 1985).

In einzelnen in vitro Untersuchungen zur Klastogenität zeigten DEHP bzw. sein Metabolit Monoethylhexylphthalat (MEHP) schwach positive Wirkungen in Dosisbereichen nahe der Zytotoxizität (Perry et al., 1984; Phillips et al., 1982 und 1986; Rotward et al., 1988; Tsutsui et al., 1993). Tomita et al. (1982) fanden ferner eine erhöhte Anzahl von Revertanten an *Salmonella typhimurium* TA 100 bei 5 mg DEHP/Platte. Allerdings betrug dieser Anstieg weniger als einen Faktor 2. Außerdem fehlte eine Dosisbeziehung, da nur eine Konzentration verwendet worden war.

Vier Hauptmetaboliten von DEHP waren ferner negativ in *Salmonella typhimurium* (Dirven et al., 1991).

Folgende in vivo Studien liegen vor (die Originalzitate sind dem EU Risk Assessment Report entnommen):

Lac I-transgene Mäuse, die 3.000 und 6.000 ppm DEHP im Futter über 120 Tage erhielten, zeigten keinen Anstieg der Markergenmutationsrate in Leber-DNA (Kunz et al., 1993).

DNA-Strangbruchtests an Ratten- und Mäuseleber inkl. UDS erwiesen sich ebenfalls als negativ (Butterworth et al., 1984; Kornbrust et al., 1984; Smith et al., 1987) waren negativ.

Ein Zytogenetiktest am Knochenmark nach oraler Zufuhr von 500, 1.700 und 5.000 mg/kg und Tag über 5 Tage an F344-Ratten ließ keine klastogene Wirkung erkennen (Puttmann et al., 1983).

Zwei Dominant-Letal-(DL-)Tests an Mäusen intraperitonealer bzw. subkutaner Injektion (Singh et al., 1974, Agarwal et al., 1985) zeigten grenzwertig positive Effekte, die sowohl mit einem statistisch inadäquaten Versuchsaufbau als auch mit der bekannten Hodentoxizität der Substanz in Zusammenhang stehen. Nach oraler Zufuhr von DEHP und MEHP fanden sich keine DL-Effekte (Hamano et al., 1980, Rushbrook et al., 1982).

DEHP zeigte keine kovalente Bindung an die Leber-DNA von Ratten bei Schlundsondenverabreichung unabhängig von einer 3-wöchigen Vorfütterungsperiode (von Daeniken et al., 1984).

DEHP führte bei Ratten nach subchronischer Verabreichung zu einem Anstieg des 8-Hydroxyguaninanteils in der Leber-DNA (Takaki et al., 1990). Dies reflektiert eine oxidative DNA-Schädigung, wie man sie z. B. auch bei Ratten auf einer Cholinmangeldiät beobachten kann (Hinrichsen et al., 1990) oder unter anderen Bedingungen von oxidativem Stress (Floyd et al., 1990). Inwieweit ein Kausalzusammenhang dieser DNA-Veränderung mit der Leberkanzerogenität bei Ratten besteht, ist ungeklärt.

DEHP und seine Metaboliten haben sich somit in einer großen Anzahl von Mutagenitätstests fast durchgehend als nicht mutagen erwiesen.

Eine Einstufung gemäß EU-Kriterien erfolgt nicht (M: -).

## **B) Kanzerogene Effekte:**

Im EU-Risk-Assessment-Entwurf vom November 1998 sind auf Seite 132 (Anlage 1) alle Kanzerogenitätsstudien mit DEHP tabellarisch zusammengefasst und auf den Seiten 122 – 131 im Einzelnen beschrieben.

In allen Studien an F344-Ratten und B6C3F1-Mäusen zeigten sich hepatozelluläre Karzinome und neoplastische "nodules" bzw. hepatozelluläre Adenome und Karzinome. Experimente mit limitierten Tierzahlen an männlichen Wistar-Ratten (20.000 ppm; Tamura et al., 1990 b) bzw. Sprague-Dawley-Ratten (20.000 ppm; Ganning et al., 1987) ließen keine Tumoren erkennen; dies schließt eine tumorogene Wirkung auch bei diesen Stämmen nicht aus, zeigt jedoch, dass sie offenbar weniger empfindlich sind. Bei den Fischer-Ratten traten Tumoren ab etwa 2.500 ppm auf, während 500 ppm (entspr. ca. 140 – 180 mg/kg KGW) zu keiner erhöhten Tumorate mehr führten, allerdings noch zu Lebervergrößerungen (David et al., 1999). Bei Mäusen zeigte sich ein Anstieg der Lebertumorraten (Karzinome + Adenome) bereits bei 500 ppm (entspr. 98 – 117 mg/kg KGW u. Tag).

DEHP ist nicht genotoxisch. Seine tumorpromovierende Wirkung auf die Leber von Nagern korreliert mit einer chronisch-persistierenden Hepatomegalie (Lebervergrößerung), die ebenfalls nur am Nager beobachtet wird und mit einer bestimmten Form von Enzyminduktion (Peroxisomenproliferation) einhergeht. Es handelt sich um einen schwellenabhängigen pleiotropen Effekt, der zumindest initial mit vermehrter DNA-Synthese verbunden ist. Bei Ratte und Maus stellt dieses Phänomen potentiell eine Lebertumordisponierende Stoffwechselsituation dar.

Allerdings ist die tatsächliche Kanzerogenität der einzelnen Peroxisomenproliferatoren höchst unterschiedlich ausgeprägt. Von prognostischer Aussagekraft sind die Höhe der Wirkschwelle und das Ausmaß der Lebervergrößerung, weniger die maximale Peroxisomendichte und Enzymaktivität im Hochdosisbereich. Ausführlich untersucht in dieser Hinsicht wurden verschiedene lipidsenkende Arzneistoffe und die Phthalsäureester DEHP und Diisononylphthalat (DINP). Die Phthalsäureester gehören zu den eher schwach wirksamen Verbindungen, so dass relativ hohe Dosen zur Auslösung dieses Effektes erforderlich sind.

Nicht-Nager zeigen eine weitgehende Resistenz gegenüber dem Phänomen der Peroxisomenproliferation (s. u.) und der hiermit assoziierten Effekte wie Enzyminduktion, Hepatomegalie und Tumorinduktion. Hamster zeigen hingegen noch schwache Effekte (Lake et al., 1984).

Man nimmt heute an, dass die Speziesunterschiede auf Dichte und Funktionalität eines bestimmten Rezeptortyps zurückgehen, des peroxisomenstimulierenden (PPAR $\alpha$ -)Rezeptors, welcher bei Ratte und Maus in besonders hohem Maße und vollständiger Form exprimiert wird (Ashby et al., 1994; Bentley et al., 1993; Lee et al., 1995; Cattley et al., 1998; Maloney and Waxman, 1999). Die Stimulation der Rezeptoren führt in den Zielzellen zu einer Vielzahl von Transkriptionen bzw. Genexpressionen und morphologisch zu einer Proliferation von Zellorganellen (Peroxisomen, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum) zur Suppression von Apoptose (Roberts et al., 1998) sowie zu einer zumindest initialen, bei manchen Stoffen auch kontinuierlichen Erhöhung der DNA-Synthese (Marsman et al., 1988) und Mitoserate nach Aktivierung der Kupffer'schen Sternzellen (Rose et al., 1997); die Leber ist in allen wirksamen Dosen auf längere Zeit vergrößert.

Transgene Mäuse, denen der peroxisomenstimulierende (PPAR $\alpha$ -)Rezeptor fehlt, zeigten mit DEHP keine Peroxisomenproliferation, keine Hepatomegalie und keine vermehrte DNA-Synthese (Ward et al., 1998). Die Bioverfügbarkeit war gegeben, dies konnte man an den Hoden- und Nierenschädigungen sehen, die allerdings schwächer ausgeprägt waren als beim Wild-Typ. Auch war selbst mit der hochwirksamen Verbindung Wy-14,643 keine Hepatokanzerogenität an PPAR $\alpha$ -Knock-out-Mäusen mehr erkennbar (Peters et al., 1997).

Die menschliche Leber weist 1 – 10 % der funktionalen PPAR $\alpha$ -Rezeptordichte von Mäusen auf (Palmer et al., 1998). Hierin dürfte der Grund für die geringere toxikodynamische Empfindlichkeit des Menschen zu sehen sein, wie sie auch in vitro an Leberzellkulturen zum Ausdruck kommt (s. u.). Aus der langjährigen Erfahrung mit Fibrat-Therapien hat sich bisher kein Hinweis auf eine tumorigene Wirkung am Menschen ergeben.

Aufgrund der experimentellen und klinischen Erfahrungen werden Peroxisomenproliferatoren zur Zeit von IARC nicht als kanzerogen für den Menschen klassifiziert (IARC, 1995/1996). Diese Einschätzung wird überwiegend auch in neueren Publikationen geteilt, wenngleich sie heute differenzierter und mehr im Sinne quantitativer Unterschiede erfolgt (Cattley et al., 1998; Doull et al., 1999; Maloney and Waxman, loc. cit.).

In Leberzellkulturen von Kaninchen, Meerschweinchen, Marmosets und Menschen ließen sich mit DEHP bzw. DINP u. a. Peroxisomenproliferatoren bzw. ihren aktiven Metaboliten keine Effekte darstellen (Elcombe et al., 1997; Ashby et al., 1994; Butterworth et al., 1989; Dirven et al., 1993 a; Goll et al., 1999; Hasmall et al., 1999).

Bei DEHP und DINP besteht neben dem toxikodynamischen Aspekt auch eine toxikokinetische Speziesdifferenz: Von Primaten werden diese Stoffe im Vergleich zur Ratte in geringerem Maße aus dem Intestinaltrakt resorbiert und zu Monoestern gespalten, so dass letztere eine geringere Bioverfügbarkeit erreichen (Rhodes et al., 1986). Hierauf wird im Kapitel C.1.d. näher eingegangen. Auch eine fehlende Hemmung der metabolischen Kooperation an der Leber von Cynomolgus-Affen im Vergleich zur Ratte wurde nach 14-tägiger Verabreichung von 500 mg/kg und Tag beobachtet (Pugh et al., 1999).

In einer Studie (Moore et al., 1996) an Fischer-Ratten wurde neben den erwarteten hepatozellulären Karzinomen auch eine Zunahme monozellulärer Leukämien registriert. Bereits früher war eine solche Häufung mit einigen anderen Phthalsäureestern beobachtet worden, nicht jedoch mit DEHP. Es handelt sich jedoch bei diesem Tumor um eine Besonderheit der Fischer-Ratte, dessen vermehrtes Auftreten noch keine kanzerogene Wirkung beweist.

Eine bisher nur als Abstract vorliegende Untersuchung (Berger, 1995) berichtet über einen Anstieg der Rate von Tumoren der interstitiellen Zellen des Hodens bei Ratten (ICT), die über die Lebenszeit DEHP im Futter in Dosen von 30, 95 und 300 mg/kg KG erhielten. Die Tumorraten betragen [in %]:

	ICT	Leber
Kontrollgruppe	16,2	6,6
DEHP 30 mg/kg	20,0	8,3
DEHP 95 mg/kg	19,0	5,0
DEHP 300 mg/kg	28,2	6,3

Zur Zeit befindet sich die Studie in einer Nachevaluierung. Auf die Interferenzen von DEHP mit Testosteron- und FSH-abhängigen Wirkungen wird im Kapitel C hingewiesen. Stoffe mit antiandrogenähnlichen Wirkungen disponieren zu Hypertrophie und Tumoren der interstitiellen Zellen bei der Ratte.

**Fazit:**

Zwischen Nagern und Primaten bestehen bedeutende Unterschiede in der Toxikodynamik und Toxikokinetik von DEHP. Nach einer Gewichtung der gegenwärtigen Datenlage ist für DEHP gemäß EU-Kriterien keine Einstufung im Hinblick auf Kanzerogenität erforderlich (C: -).

**C) Reproduktionstoxizität und Entwicklungsschäden:**

Wirkungen von DEHP auf die Hoden und die pränatale Entwicklung sind seit vielen Jahren bekannt. Die Studien sind im vorliegenden Entwurf zum EU Risk Assessment Report beschrieben. Wesentliche Schlüsselstudien werden nachfolgend beschrieben:

**1. Entwicklungsschädigung:****a) Pränatale Toxizitätsstudien:**

Entwicklungsschädigende Effekte von DEHP fanden sich an Ratte und Maus, wobei Mäuse deutlich empfindlicher reagierten.

Für Kaninchen liegt lediglich eine ältere Studie mit intravenöser Zufuhr vor (Thomas et al., 1979). Die Dosierungen betragen 5,7 und 11,4 mg/kg/Tag vom 6. - 18. Trächtigkeitstag; Missbildungen wurden nicht beobachtet, jedoch maternale und fetale Mortalität; die Studie ist für Einstufungs- und Kennzeichnungsfragen nicht relevant. Eine neue Studie mit oraler Verabreichung gemäß OECD-Vorschriften wurde kürzlich angefangen.

Erste Mitteilungen über eine embryotoxische und teratogene Wirkung von DEHP an der Maus nach oraler Zufuhr erschienen 1979/1980. Nakamura et al. (1979) fanden teratogene Effekte nach oraler Verabreichung von 1,0 ml/kg am 7. Trächtigkeitstag sowie fetotoxische Effekte mit erhöhter Anzahl von Resorptionen bei 1,0 und 0,1 mg/kg; bei 0,05 mg/kg wurden noch verminderte Fetalgewichte registriert.

Bei Verabreichung über das Futter vom 1. - 18. Trächtigkeitstag fanden sich embryotoxische Effekte und Missbildungen dosisabhängig bei Konzentrationen von 0,1 - 1,0 % im Futter. Hierbei waren 0,05 % (70 mg/kg/ Tag) ein "no adverse effect level" (Shiota et al., 1982).

Im Rahmen einer Fütterungsstudie über die gesamte Trächtigkeitsperiode von CD-1-Mäusen ergaben sich embryotoxische und teratogene Effekte ab 0,05 % im Futter (70 mg/kg/Tag); der "no adverse effect level" betrug hier 0,025 % (ca. 35 – 44 mg/kg/Tag (Wolkowsky-Tyl et al., 1983 a; Tyl et al., 1988; Melnick et al., 1987).

In beiden genannten Fütterungsstudien wurde ab 0,2 % (Shiota et al., 1982) bzw. 0,1 % (Tyl et al., 1988) auch eine verminderte Gewichtsentwicklung der Muttertiere registriert. Diese ging gleichzeitig mit erhöhten Resorptionsraten einher. Weitere maternale Effekte bei diesen Dosierungen sind jedoch aus anderen Studien bekannt, wie erhöhte Lebergewichte (Moore, 1996; David et al., 1999).

Im Rahmen einer Studie mit Schlundsondenverabreichung an CD-1-Mäusen erwiesen sich 40 mg/kg/Tag als "no adverse effect level" und 200 mg/kg/Tag als "lowest adverse effect level" (Huntingdon, 1997) Ratten sind weniger empfindlich:

Nach Schlundsondenverabreichung von 1.000 mg/kg/Tag (Zubereitung in Olivenöl) vom 6. - 15. Trächtigkeitstag wurde eine Resorptionsrate von 40 % und eine Malformationsrate von 70 % (pro Wurf) registriert. Die Muttertiere zeigten einen Anstieg der relativen Leber- und Nierengewichte. 40 und 200 mg/kg/Tag waren ohne Effekt (Hellwig et al., 1997).

Bei einem Angebot von 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0 % DEHP im Futter (1.055 mg/kg/Tag) über die gesamte Trächtigkeitsperiode zeigten Ratten in der obersten Dosisgruppe nur vermehrte Resorptionsraten ohne teratogene Effekte; bei 1,0 und 1,5 % war die maternale Gewichtsentwicklung beeinträchtigt bei gleichzeitiger Lebervergrößerung; ebenso waren die Fetalgewichte vermindert. 0,5 % zeigten Wirkung auf maternale Gewichtsentwicklung und auf die Feten (Wolkowsky-Tyl et al., 1983 b; Tyl et al., 1988).

Im Rahmen einer Inhalationsstudie mit DEHP-Aerosolen bis 300 mg/m<sup>3</sup> vom 6. - 15. Trächtigkeitstag zeigten sich keine signifikanten Effekte auf Feten und Muttertiere. In der höchsten Dosis fanden sich ein leichter Anstieg von Nierenbeckendilatationen und Hinweise auf Peroxisomenproliferation bei den Muttertieren (eine solche geht immer mit einer Lebervergrößerung einher, allerdings wurden die Organgewichte in dieser Studie nicht gemessen). Ein Teil der Jungtiere wurde aufgezogen und zeigte keine Auffälligkeiten in Erscheinungsbild und altersgemäßer Entwicklung in standardisierten Tests (Merkle et al., 1988).

**b) In vitro-Untersuchungen an embryonalen Zellkulturen ("whole embryo cell cultures"):**

Nach einer noch unveröffentlichten Studie an embryonalen Zellkulturen von Ratten erwiesen sich das Serum DEHP-behandelter Ratten sowie der primäre Metabolit Monoethylhexylphthalat (MEHP) und eine Reihe von MEHP-Metaboliten als embryotoxisch und entwicklungsschädigend. MEHP und die Metaboliten I (2-Ethyl-3-carboxypropylphthalat) und VI (2-Ethyl-5-oxyhexylphthalat) waren etwa gleich in ihrer Wirkung, die Metaboliten V (2-Ethyl-5-carboxypentylphthalat) und IX (2-Ethyl-5-hydroxyhexylphthalat) waren etwas stärker embryotoxisch als MEHP.

Die Untersuchungen zur Embryotoxizität in vitro von DEHP und seinen Metaboliten zeigen, dass MEHP und einige Folgemetaboliten - letztere allerdings mengenmäßig weniger bedeutend - die letztendlich wirksamen Metaboliten sind. Wenig spricht hingegen für eine maßgebliche Rolle von 2-Ethylhexanol (2-EH) und 2-Ethylhexansäure (2-EHA), die sich beide in vivo als weniger fruchtschädigend ausgewiesen haben als DEHP selbst (Hellwig und Jäckh, 1997; Hendrickx et al., 1993; Pennanen et al., 1992).

**c) Pränatale/entwicklungsschädigende Effekte im Rahmen von Mehrgenerationsstudien:**

Generationsstudien an Ratte und Maus, die im Rahmen von Fertilitätsprüfungen durchgeführt werden, ließen ebenfalls anhand erhöhter Resorptionsraten, reduzierter Fetalgewichte und verminderter Überlebensraten der Jungtiere das in hohen Dosen entwicklungsschädigende Potential von DEHP erkennen. Zudem fand sich in einer kürzlich als Abstract publizierten 2-Generationsstudie an der Ratte (Schilling et al., 1999) in der obersten Dosisgruppe (9.000 ppm) bei männlichen Jungtieren im Alter von 15 - 18 Tagen vermehrt Brustdrüsenanlagen und reduzierter Anogenitalabstand (Schilling et al., 1999). Dieser erst postnatal auftretende, vermutlich aber bereits intrauterin im letzten Drittel der Trächtigkeitsperiode angelegte Effekt (Ema et al., 2000) gleicht klinisch dem eines Antiandrogens und wird auch mit anderen Phthalsäureestern wie Dibutylphthalat (DBP) beobachtet. Der Mechanismus ist noch nicht geklärt; eine Interferenz mit dem Androgen-Rezeptor wurde ausgeschlossen (Sar et al., 1999). 9.000 ppm führten außerdem zu erhöhten Lebergewichten bei der F0- und F1-Generation, verringerten Hoden- und Nebenhodengewichten in der F1-Generation, verringerter Wurfgröße (F1 und F2) und erhöhter Mortalität unter den Jungtieren der F1-Generation. Der Fertilitätsindex blieb unbeeinflusst. In der zweiten Folgegeneration traten Brustdrüsenanlagen und reduzierter Anogenitalabstand bei männlichen Tieren auch bei 3.000 ppm auf. 1.000 ppm führten nicht mehr zu Entwicklungsschäden, jedoch noch zu Lebervergrößerungen in der F0-Generation.

**d) Speziesdifferenzen in der Bioverfügbarkeit von DEHP und MEHP:**

Ein Vergleich der validen pränatalen Toxizitätsstudien an Ratte und Maus zeigt eine geringere Empfindlichkeit an der Ratte. Hier lassen sich - im Gegensatz zur Maus - embryonale und teratogene Effekte im Dosisbereich von 1.000 mg/kg und Tag nur durch Schlundsondenverabreichung, nicht aber durch Fütterung oder Inhalation erzielen. Die höhere Empfindlichkeit der Maus könnte die Folge einer rascheren intestinalen Resorption und höheren Bioverfügbarkeit, auch höherer Spitzenkonzentrationen des kritischen Metaboliten MEHP sein, denn es gibt Hinweise darauf, dass der Plasmaspiegel von MEHP während der Trächtigkeitsperiode ansteigt und dass dieser Effekt bei Mäusen ausgeprägter als bei Ratten ist (L'Huguenot et al., 1999).

MEHP wird im Übrigen auch als der kritische Metabolit für die Hodentoxizität (s. u.) angesehen. Untersuchungen am Hamster (Gray et al., 1982) und an Primaten (s. u.) belegen hier ausgeprägte Speziesunterschiede, die mindestens teilweise auf eine geringere Bioverfügbarkeit von MEHP zurückgehen. Damit stellt sich auch die Frage nach einer generell niedrigeren oder fehlenden Empfindlichkeit von Primaten gegenüber den pränatalen Effekten von DEHP.

An Affen gibt es bisher noch keine Untersuchungen an trächtigen Tieren. Doch gibt es Hinweise, dass Primaten eine wesentlich geringere Bioverfügbarkeit von MEHP erreichen, was auch ein Grund für die fehlende Hodentoxizität sein dürfte. So konnten Rhodes et al. (1986) in einer 2-wöchigen Sondierungsstudie an Marmosets zeigen, dass 2.000 mg/kg und Tag (- im Vergleich zur Ratte -) ohne Effekt auf die Hodengewebe blieben. 2 % dieser Dosis wurden bei Marmosets über den Urin ausgeschieden gegenüber ca. 50 % bei der Ratte. Über 60 % blieben bei Marmosets in den Faeces und ca. 1/3 akkumulierte ungelöst im Körper, überwiegend in der Lunge. Die applizierte Menge in dieser Untersuchung war, dies zeigen diese Ergebnisse, artefiziell hoch. Doch lässt sich eine höhere Bioverfügbarkeit kritischer Metaboliten bei der Ratte im Vergleich zum Marmoset hieraus ableiten.

Auch Kurata et al. (1998) fanden im Laufe einer 90-Tage-Studie bei Marmosets, die mit Dosierungen bis 2.500 mg/kg/Tag behandelt wurden, keine Hinweise auf testikuläre Atrophien, wie man sie bei der Ratte im gleichen Dosisbereich erwartet hätte (Bei geschlechtsreifen Ratten treten diese schon in mehr als 10-fach niedrigerer Dosis auf.)

An Cynomolgus-Affen, denen über 2 Wochen 500 mg/kg und Tag DEHP verabreicht wurde, fanden sich ebenfalls keine Hodeneffekte. Die Bioverfügbarkeit von MEHP im Lebergewebe betrug 17,0  $\mu\text{mol/g}$  und war geringer als bei der Ratte (Pugh et al., 1999/2000; Isenberg et al., 2000).

Die bisherige Datenlage gibt orientierende Hinweise auf eine geringe Resorption und Bioverfügbarkeit von MEHP bei Primaten. Für eine Extrapolation auf den Menschen würden auch Daten über die Wiederfindungsraten der Metaboliten im Urin benötigt. Nach oraler Aufnahme von ca. 30 mg DEHP durch Probanden wurden 11-15 % der Dosis im Urin gefunden, überwiegend in Form von Konjugaten (Schmid und Schlatter, 1985). Bereits in einer früheren Untersuchung hatte sich gezeigt, dass beim Menschen wie beim Cynomolgus\*-Affen MEHP und seine Metaboliten konjugiert und - im Gegensatz zur Ratte - überwiegend in Form von Glucuroniden ausgeschieden werden (Albro et al., 1982). Die Ratte scheidet MEHP ohne Konjugation aus; auch bildet sie mehr  $\omega$ -Hydroxylierungsprodukte; hingegen ist beim Menschen die  $\omega$ -1 Hydroxylierung des Monoesters begünstigt (Dirven et al., 1993 b). Die Bedeutung dieser Unterschiede im Metabolitenspektrum für die Bioverfügbarkeit des kritischen Metaboliten MEHP ist allerdings ungeklärt.

---

\* Cynomolgus-Affen (als Altwelt-Affen) stehen in ihrem metabolischen Verhalten dem Rhesus-Affen und damit auch dem Menschen näher als das Marmoset, welches eine Neuwelt-Primatenart ist. Dies konnte den Erfahrungen mit ca. 40 in dieser Hinsicht genau untersuchten Medikamenten entnommen werden (J. Caldwell, 1985; 1977; 1979; Siddall, 1978).



Hiervon abgesehen gibt es auch Hinweise, dass auch (toxikodynamische) Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit der Zielgewebe bestehen könnten (Ward et al., 1995). Daher sind auch weitere Kenntnisse zur Kinetik an Nagern (mit und ohne PPAR $\alpha$ -Rezeptor; Ward et al., 1995) erforderlich, um die Bedeutung der Nagerbefunde für den Menschen richtig einschätzen zu können.

**e) Zur Frage der Einstufung:**

Fruchtschädigende Effekte treten bei Mäusen und Ratten in Fütterungs- und Sondierungsstudien auf. Bei der Ratte erfordert das Auftreten von Missbildungen bei Dosen unterhalb von 1.000 mg/kg und Tag offenbar die Schlundsondenapplikation. Der "no adverse effect level" der Ratte liegt bei 200 mg/kg/Tag, d. h. einer Dosis, die auch zur Lebergewichtsvergrößerung führt und bei trächtigen Tieren zu einer hohen Bioverfügbarkeit von MEHP im Plasma. MEHP kann als der (auch in vitro wirksame) kritische Metabolit aufgefasst werden; seine Bioverfügbarkeit im fetalen Gewebe ist für die pränatalen Effekte vermutlich entscheidend.

Bei Kaninchen wurden entsprechende Studien erst begonnen.

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von MEHP bei Primaten existieren nur wenige (Rhodes et al., 1986; Pugh et al., 1999). Doch sind bei Marmosets (Neuwelt\*-Primaten) 2.000 mg/kg und Tag und bei Cynomolgus-Affen 500 mg/kg und Tag wahrscheinlich noch keine wirksame Dosis, weil die Bioverfügbarkeit von MEHP zu gering ist und auch die üblichen Zielorgane (Hoden) unbeeinträchtigt bleiben.

Wegen der bisher schmalen Datenbasis bestehen hier noch offene Fragen. Speziesdifferenzen sind zwar vorhanden, sie sind jedoch quantitativ zu wenig substantiiert und für den Menschen vorerst nicht verifizierbar.

DEHP wird daher gemäß den EU-Einstufungskriterien als entwicklungsschädigend Kategorie 2 (R<sub>E</sub>: 2) eingestuft und mit dem R-Satz 61 gekennzeichnet.

**2. Schädigungen von Reproduktionsorganen und Fertilität:**

**a) Hodenschädigungen in Versuchen mit Mehrfachapplikation:**

In zahlreichen Untersuchungen der letzten 20 Jahre zeigte sich, dass die Hoden ein typisches Zielorgan im Wirkprofil von DEHP sind. Hodenschädigungen fanden sich bei Ratten und Meerschweinchen (Gangolli, 1982), Frettchen (Lake et al., 1975), Mäusen (Oishi, 1993) und Hamstern (Lake et al., 1984). Das primäre Zielgewebe sind hierbei die Sertoli-Zellen; dies lässt sich

---

\* Cynomolgus-Affen (als Altwelt-Affen) stehen in ihrem metabolischen Verhalten dem Rhesus-Affen und damit auch dem Menschen näher als das Marmoset, welches eine Neuwelt-Primatenart ist. Dies konnte den Erfahrungen mit ca. 40 in dieser Hinsicht genau untersuchten Medikamenten entnommen werden (J. Caldwell, 1985; 1977; 1979; Siddall, 1978).

auch in vitro an Sertoli-Zellkulturen mit dem primären Metaboliten MEHP nachstellen. Sekundär kommt es auch zu einer Beeinträchtigung der Spermio-genese und einem Verlust des Keimepithels. Testosteron und Zink im Hoden können abfallen und das FSH im Plasma ansteigen.

Junge Tiere sind offenbar empfindlicher (Gray and Butterworth, 1980; Dostal et al., 1988). Sjöberg et al. (1986b) vermuteten, dass dies an einer relativ höheren intestinalen Absorption liegt. Andererseits zeigten Li et al. (2000) in vitro an Sertoli-Zellkulturen die besondere Empfindlichkeit neonataler Ratten.

In sehr hohen Dosisbereichen (2.000 mg/kg/Tag) waren die Hodenschädigungen im Rahmen einer 45 Tage langen Nachbeobachtungsperiode nicht voll reversibel (Oishi, 1985).

In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Zinksupplementation die Hodenschädigungen an der Ratte partiell kompensieren kann (Agarwal et al., 1986).

Hodenschädigungen wurden an Primaten bisher nicht beobachtet, weder in einer 2-Wochen-Sondierungsstudie mit 2.000 mg/kg/Tag (Rhodes et al., 1986) noch in einer Fütterungsstudie über 90 Tage an Marmosets (Kurata et al., 1998), noch nach 14-tägiger Verabreichung von 500 mg/kg und Tag an Cynomolgus-Affen (Pugh et al., 1999). Ursachen für diesen Speziesunterschied sind, neben möglichen Unterschieden in der Toxikodynamik, vermutlich eine geringere intestinale Resorption von DEHP und MEHP (Rhodes et al., 1986; Short et al., 1987; Dirven et al., 1993 a; Albro et al., 1981; vgl. auch Kapitel C1d). Daneben gibt es auch Hinweise, dass Spezies ohne funktional aktiven PPAR $\alpha$ -Rezeptor auch toxikodynamisch weniger empfindlich sind (Ward et al., loc. cit.), so dass aus dem Fehlen von Effekten (wie etwa in der Kurata-Studie) allein noch keine quantitativen Rückschlüsse zur Bioverfügbarkeit möglich sind.

Die "no adverse effect level" an der Ratte weisen eine beträchtliche Streubreite auf. Hierbei spielen Alter der Versuchstiere sowie möglicherweise die Empfindlichkeit unterschiedlicher Tierstämme eine Rolle. Der niedrigste bisher berichtete "no adverse effect level" in einer Fütterungsstudie war 50 ppm im Futter (ca. 3,7 mg/kg und Tag; Poon et al., 1997); bei 500 ppm wurde eine vermehrte Vakuolisierung von Sertolizellen bei 7 von 10 Tieren gefunden. Tubulusatrophien traten bei 5.000 ppm auf (aber noch nicht bei 500 ppm). Die Autoren sehen in der Vakuolisierung der Sertolizellen einen Hinweis auf einen frühen adversen Effekt und verweisen auf Beeinträchtigungen der Fertilität bei Mäusen in einer kontinuierlichen Aufzuchtstudie an Mäusen bei 1.000 und 3.000 ppm (Lamb et al., 1987). Bei Wistar-Ratten war jedoch bei 1.000 ppm (110 mg/kg/Tag) im Rahmen einer 2-Generationsstudie keine Fertilitätsbeeinträchtigung zu verzeichnen (Schilling et al., 1999).

Es gibt ferner eine Trinkwasserstudie an Ratten, in der 32,5 und 325  $\mu$ g DEHP/l über die Dauer der Trächtigkeit und bis zum Tag 21 p.p. verabreicht wurde. Es wird über Anstieg von Lebergewichten und Abfall von Nieren- und Hodengewichten berichtet (Arcadi et al., 1998). An der Validität der Studie bestehen Zweifel, insbesondere, was die aufgenommene Dosis betrifft. Unterlagen zur Homogenität der Zubereitung und zum Trinkwasserverbrauch fehlen. Auch die erhöhten Lebergewichte sind ein Hinweis, dass die Dosis de facto wohl höher gewesen sein muss.

In einer 28-Tage-Inhalationsstudie an Wistar-Ratten führte die höchstmögliche Exposition von 1.000 mg/m<sup>3</sup> nicht zu Hodentoxizität oder Fertilitätsbeeinträchtigung (Klimisch et al., 1992).

Nach einer Arbeit von Tandon et al. (1990) verursachten 2.000 mg/kg, mit der Schlundsonde über 21 Tage an laktierende Ratten verabreicht, bei Jungtieren, wenn diese im Alter von 31 Tagen untersucht wurden, Hodenschädigungen. Die Autoren gingen bei den Muttertieren von einer intestinalen Resorption von 13 % aus, was einer Aufnahme von 260 mg/kg/Tag entspräche (Resorptionsquoten zwischen 10 und 15 %, gemessen als "urinary recovery" fanden sich auch bei Schmid und Schlatter (1985, allerdings in weitaus niedrigeren Dosen), erhoben aber keine Daten über die Konzentration von DEHP bzw. seinen Metaboliten in Milch oder Urin. Im Hodenhomogenat 31 Tage alter Jungtiere fanden sich Erhöhungen von LDH,  $\alpha$ -GT und  $\beta$ -Glucuronidase sowie Verminderungen der SDA und AP. Das Serum-Testosteron war nicht signifikant vermindert. Die absoluten Hodengewichte waren am 31. Tag vermindert, allerdings ohne histologisches Korrelat. Im Alter von 61 und 91 Tagen waren die Hodengewichte normal, und auch enzymatische Effekte zeigten eine Tendenz zur Normalisierung.

**b) Schäden am Ovar (Granulosazellen) in Versuchen mit Mehrfachapplikation / Effekte auf Östrogenspiegel:**

Neben der Hodentoxizität verursachten DEHP bzw. MEHP auch eine Schädigung der Granulosazellen. So wurde bei Ratten in hohen Dosen (2.000 mg/kg) in der präovulatorischen Phase die Östradiolproduktion gehemmt; dies führte zu Verminderung des Östradiolspiegels und Hemmung der Ovulation (Davis et al., 1994 a). In vitro ließ sich an Granulosazellkulturen eine Verminderung der Progesteronproduktion feststellen, welche die Autoren über mögliche Interferenz von MEHP mit der FSH-abhängigen c-AMP-Synthese (Davis et al., 1994 b) erklären; ferner diskutierten die Autoren eine verminderte Bioverfügbarkeit von Aromatase.

An männlichen Fischer-Ratten beobachteten Eagon et al. (1996) hingegen nach mehrwöchiger Fütterung von 1,2 % DEHP erhöhte Serum-Östradiolkonzentrationen bei einer gleichzeitig verminderten Rezeptordichte in der Leber.

Im Uterotrophietest an 19 – 25 Tage alten ovariektomierten Sprague-Dawley-Ratten führte DEHP nicht zu erhöhten Uterusgewichten (Zacharewski et al., 1998); antiöstrogene Effekte wurden im Rahmen dieser Untersuchung nicht mitgeprüft.

**c) Effekte auf die Fertilität:**

Die Frage der Fertilität wurde außerdem in kontinuierlichen Aufzuchtstudien ("continuous breeding study") geprüft:

Im Rahmen einer 28-Tage-Inhalationsstudie bei Ratten mit Aerosolkonzentrationen von 10, 70 und 1.000 mg/m<sup>3</sup> zeigten die Tiere keine Hodentoxizität und in zwei nachgeschalteten Paarungsexperimenten auch keine Effekte auf die Fertilität. In der obersten Dosis war hierbei eine leichte Lebervergrößerung zu verzeichnen, ein Hinweis auf eine gewisse Bioverfügbarkeit in dieser Dosisgruppe (Klimisch et al., 1992).

- Ratten erhielten im Rahmen einer solchen Studie 0,25, 0,5 und 1 % DEHP im Futter. Dabei waren 0,25 % (164 mg/kg/Tag) ohne Wirkung. 0,5 % verminderten die maternale Futteraufnahme sowie Überlebensfähigkeit und Gedeihen der Jungtiere. Die Resorptionsquote war erhöht (Hinweise auf pränatale Toxizität). Bei 1,0 % (573 mg/kg/Tag) zeigten sich noch vermehrt Resorptionen und eine reduzierte Gewichtszunahme der Muttertiere, ferner verminderte Fetalgewichte und Wurfgrößen. Die Studie ist bisher nicht publiziert, sondern liegt nur als Bericht des Research Triangle Instituts an NTP vor (Price, 1986).
- Mäuse (CD-1) erhielten im Rahmen einer kontinuierlichen Aufzuchtstudie DEHP über das Futter zunächst über 7 Tage vor der Verpaarungsperiode, dann über eine 98-tägige Verpaarungsperiode, während der die geworfenen Jungtiere entfernt wurden. Die Konzentrationen im Futter betragen 0,01, 0,1 und 0,3 %. 0,01 % (ca. 14 mg/kg/Tag) blieben ohne Wirkung, bei 0,1 % zeigte sich eine Beeinträchtigung der reproduktiven Funktion (Fertilität und pränatale Toxizität) und 0,3 % führten zu einer völligen Blockade der reproduktiven Funktion. Beide Geschlechter waren betroffen, wie in einem Kreuzverpaarungsexperiment gezeigt werden konnte (Lamb et al., 1987).

In einer zur Zeit laufenden 2-Generationsstudie an der Ratte wurden bei 9.000 ppm im Futter Beeinträchtigungen der Fertilität gefunden. Bei 3.000 und 1.000 ppm gab es noch Hodenschäden in leichterem Ausmaß und ohne Beeinträchtigung der Fertilität (Schilling et al., 1999).

#### **d) Zur Frage der Einstufung:**

Hodenschädigende Effekte wurden bei Ratten und Mäusen in Dosierungen von < 1.000 mg/kg/Tag beobachtet. Die "no adverse effect level" in den einzelnen Studien weisen Schwankungen auf und hängen neben Tierstamm offenbar stark vom Alter der Tiere und der Bioverfügbarkeit von MEHP ab. Der niedrigste "no adverse effect level", der berichtet wurde, stammt aus einer Fütterungsstudie an Sprague-Dawley-Ratten und beträgt 50 ppm (Poon et al., 1997). Nach in vitro Studien mit dem kritischen Metaboliten MEHP (Li et al., 2000) muss die Perinatalphase als besonders empfindlich angesehen werden. Die "no adverse effect level" in Mehrgenerationsstudien, welche diese Phase miteinfassen, lagen um 35 mg/kg und Tag bei der Maus und 100 mg/kg und Tag bei der Ratte. PPAR $\alpha$ -Rezeptor-defiziente Mäuse zeigten ferner eine geringere Hodentoxizität als der Wild-Typ (Ward et al., 1998).

Der gültige vom EU Scientific Committee on Food (SCF) angesetzte "tolerable daily intake"-Wert (TDI) liegt mit 50  $\mu$ g/kg und Tag um zwei Größenordnungen unterhalb des niedrigsten "no adverse effect levels" an der Ratte, berücksichtigt jedoch bisher nicht die offenbar geringere Empfindlichkeit von Primaten:

Studien an Marmosets zeigen NOAELs von 2.000 bzw. 2.500 mg/kg/Tag nach oraler Aufnahme über 14 bzw. 90 Tage. Anhand kinetischer Untersuchungen an Primaten muss allerdings weiter untermauert werden, dass MEHP für den Menschen nicht in relevanten Mengen bioverfügbar ist und 1.000 mg/kg/Tag für den Menschen noch keine wirksame Dosis darstellen (vgl. hierzu auch die Ausführungen in Kapitel C. 1.d und e).

Nach heutiger Bestandsaufnahme sind zwar Speziesdifferenzen durchaus vorhanden, diese sind jedoch quantitativ noch zu wenig substanziiert und für den Menschen vorerst nicht verifizierbar. DEHP wird daher gemäß EU-Einstufungskriterien als fertilitätsmindernd Kategorie 2 (R<sub>F</sub>: 2) eingestuft.

## Literatur:

- [1] Agarwal, D.K., Eustis, S., Lamb IV, J.C., Jameson, C.W., and Kluwe, W.M. (1986): Influence of dietary zinc on di(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy and zinc depletion in adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84, 12 – 24
- [2] Albro, P.W., Hass, J.R., Peck, C.C., Odam, D.G., Corbett, J.T., Bailey, F.J., Blatt, H.E., Barrett, B.B. (1981): Identification of the metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate in urine from the african green monkey. *Drug Metab. Disp.* 9, 223 – 225
- [3] Albro, P.W., Corbett, J.T., Schroeder, J.L., Jordan, S., Matthews, H.B. (1982): Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ. Health Perspect.* 45, 19 – 25
- [4] Albro P.W. (1986): The biochemical toxicology of di-(2-ethylhexyl) and related phthalates: Testicular atrophy and hepatocarcinogenesis. *Rev. Biochem. Tox.* 8, 73 – 119
- [5] Anderson, D., Yu, T.W., Hincal, F. (1999): Effect of some phthalate esters in human cells in the Comet assay *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 19, 275 - 280
- [6] Arcadi, F.A., Costa, C., Imperatore, C., Marchese, A., Rapisarda, A., Salemi, M., Trimarchi, G.F., Costa, G. (1998): Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat *Food and Chemical Toxicol.* 36, 963 - 970
- [7] Ashby, J., Brady, A., Elcombe, C.R., Elliott, B.M., Ishmael, J., Odium, J. Tugged, J.D., Kettle, S., Purchase, I.F.H. (1994): Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 13, Suppl. 2, 1 – 117
- [8] Bell, A.R., Savory, R., Horley, N.J., Choudhury, A.I., Dickins, M., Gray, T.J.B., Salter, A.M., Bell, D.R. (1998): Molecular basis of non-responsiveness to peroxisome proliferations: the guinea-pig PPAR $\alpha$  is functional and mediates peroxisome proliferator-induced hypolipidaemia. *Biochem. J.* 332, 689 - 693
- [9] Bentley, P., Calder, I., Elcombe, C., Grasso, P., Stringer, D., Wiegand, H.J. (1993): Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans. *Food Chem. Toxicol.* 31, 857 – 907

- [10] Berger, M.R. (1995): Combination effect of three non-genotoxic carcinogens in male SD rats. *Proc. Amer. Assoc. Canc. Res.* 36, 133, 788 A
- [11] Butterworth, B.E., Smith-Oliver, T., Earle, L., Loury, D.J., White, R.D., Doolittle, D.J., Working, P.K., Cattley, R.C., Jirtle, R., Michalopoulos, G., and Strom, D. (1989): Use of primary cultures of human hepatocytes in toxicology studies. *Cancer Research* 49, 1075 – 1084
- [12] Caldwell, J., Dring, L.G, Franklin, R.B., Koster, U., Smith, R.L., Williams R.T. (1978): Comparative metabolism of the amphetamine drugs of dependence in man and monkeys. *J. Med. Primatol.* 6, 367 – 375
- [13] Caldwell, J., Notarianni, L.J., Smith, R.L., Fafunso, M.A., French, M.R., Dawson, P., Bassir, O. (1979): Non-human primate species as metabolic models for the human situation: Comparative studies on meperidine metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48, 273 – 278
- [14] Caldwell, J. (1985): Non-human primates as models for the human situation, with especial emphasis on reproductive toxicology. Publication Services, Hazleton Münster Laboratory (No. 1)
- [15] Cattley, R.C., DeLuca, J., Elcombe, C., Fenner-Crisp, P., Lake, B.G., Marsman, D.S., Pastoor, T.A., Popp, J.A., Robinson, D.E., Schwetz, B., Tugwood, J., Wahli, W. (1998): Do peroxisome proliferating compounds pose a hepatocarcinogenic hazard to humans? *Regulatory Toxicol. and Pharmacol.* 27, 47 – 60
- [16] Chevalier, S. and Roberts, R.A. (1998): Perturbation of rodent hepatocyte growth control by nongenotoxic hepatocarcinogenesis: mechanisms and lack of relevance for human health (review). *Oncol. Rep.* 6, 1319 – 1327
- [17] David, R.M., Moore, M.R., Cifone, M.A., Finney, D.C., Guest, D. (1999): Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di(2-ethylhexyl)phthalate and the effects of recovery. *Toxicol. Sciences* 50, 195 - 205
- [18] Davis, B.J., Maronpot, R.R., and Heindel, J.J. (1994 a): Di(2-ethylhexyl) phthalate suppresses oestradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, 216 – 223
- [19] Davis, B.J., Weaver, R., Gaines, L.J., and Heindel, J.J. (1994 b): Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses oestradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, 224 - 228
- [20] Dirven, H.A.A.M., van den Broek, P.H.H., Peeters, M.C.E., Peters, J.G.P., Mennes, W.C., Blaauboer, B.J., Noordbhoek, J., and Jongeneelen, F.J. (1993 a): Effects of the peroxisome proliferator mono(2-ethylhexyl) phthalate in primary hepatocyte cultures derived from rat, guinea pig, rabbit and monkey. *Biochem. Pharmacol.* 45, 2425 – 2434
- [21] Dirven, H.A.A.M., van den Broek, P.H.H. and Jongeneelen, F.J. (1993 b): Determination of four metabolites of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in human urine samples. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 64, 555 – 560

- [22] Dostal, L.A., Chapin, R.E., Stefanski, S.A., Harris, M.W., and Schwetz, B.A. (1988): Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 95, 104 – 121
- [23] Doull J., Cattley, R., Elcombe, C. Lake, B.G., Swenberg, J., Wilkinson, C., Williams, G., van Gemert, M. (1999) A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: Application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul. Toxicol. and Pharmacol.* 29, 327 – 357
- [24] Eagon, P.K., Elm, M.S., Epley, M.J., Shinozuka, H., and Rao, K.N. (1996): Sex steroid metabolism and receptor status in hepatic hyperplasia and cancer in rats. *Gastroenterology* 110, 1199 – 1207
- [25] Elcock, F.J., Chipman, J.K., and Roberts, B.A. (1998): The rodent nongenotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin inhibits intercellular communication in rat but not guinea pig hepatocytes, perturbing S-phase but not apoptosis. *Arch. Toxicol.* 72, 439 – 444
- [26] Elcombe, C.R. and Mitchell, A.M. (1986): Peroxisome proliferation due to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Species differences and possible mechanisms. *Environm. Health Persp.* 70, 210 – 219
- [27] Elcombe, C.R., Bell, D.R., Elias, E., Hasmall, S.C., and Plant, N.J. (1997): Peroxisome proliferators species differences in response of primary hepatocyte cultures. *Annals New York Acad. Sci.* 804, 628 – 635
- [28] Ema et al. (2000): Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol. Lett.* 111, 271 - 278
- [29] Gangolli, S.D. (1982): Testicular effects of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* 44, 77 – 84
- [30] Ganning, A.E., Brunk, U., Edlund, C., Elhammer, A., and Dallner, G. (1987): Effects of prolonged administration of phthalate esters on the liver. *Environ. Health Perspect.* 73, 251 – 258
- [31] Ganning, A.E., Olsson, M.J., Brunk, U., and Dallner, G. (1991): Effects of prolonged treatment with phthalate ester on rat liver. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 392 – 401
- [32] Goll, V., Alexandre, E., Viollon-Abadie, C., Nicod, L., Jaeck, D., Richert, L. (1999): Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160, 21 – 32
- [33] Gray, T.J.B. and Butterworth, K.R. (1980): Testicular atrophy produced by phthalate esters. *Arch. Toxicol. Suppl.* 4, 452 – 455
- [34] Gray, T.J.B., Rowland, I.R., Foster, P.M.D., Gangolli, S.D. (1982): Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol. Lett.* 11, 141 – 147

- [35] Hasmall, S.C., James, N.H., Macdonald, N., West, D., Chevalier, S., Cosulich, S.C., Roberts, A.R. (1999): Suppression of apoptosis and induction of DNA synthesis in vitro by the phthalate plasticizers monoethylhexylphthalate (MEHP) and diisononylphthalate (DINP): A comparison of rat and human hepatocytes in vitro. *Arch. Toxicol.* 73, 451 – 456
- [36] Hellwig, J. and Jäckh, R. (1997): Differential prenatal toxicity of one straight-chain and five branched-chain primary alcohols in rats. *Food and Chemical Toxicology* 35, 489 – 500
- [37] Hellwig, J., Freudenberger, H., and Jäckh, R. (1997): Differential prenatal toxicity of branched phthalate esters in rats. *Fd. Chem. Toxicol.* 35, 501 – 512
- [38] Hendrickx, A.G., Peterson, P.E., Tyl, R.W., Fisher, L.C., Fosnight, L.J., Kubena, M.F., Vrbanic, M.A., and Katz, G.V. (1993): Assessment of the developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid in rats and rabbits. *Fund. Appl. Toxicol.* 20, 199 – 209
- [39] Huntingdon (1997): Phthalic acid, di(2-ethylhexyl) ester (DEHP): Study of embryo-foetal toxicity in the CD-1 mouse by oral gavage administration. Huntingdon, Report No. 95/EHM007/0705 IARC (1995):
- [40] Peroxisome proliferation and its role in carcinogenesis. Views and expert opinions of an IARC Working Group Lyon, 7 – 11 Dec. 1995, IARC Technical Report No. 24, Lyon
- [41] IARC (1996): Clofibrate. Gemfibrozil. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, some pharmaceutical drugs, Vol. 66, Lyon
- [42] Isenberg, J.S., Kamendulis, L.M., Smith, J.H., Ackley, D.C., Pugh, G., Lington, A.W. and Klaunig, J.E. (2000): Effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on gap junction intercellular communication (GJIC), DNA synthesis and peroxisomal beta-oxidation in rat, mouse, and hamster liver *Toxicol. Sci.*, accepted.
- [43] Klimisch, H.-J., Gamer, A.O., Hellwig, J., Kaufmann, W., and Jäckh, R. (1992): Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): A short-term repeated inhalation toxicity study including fertility assessment. *Fd. Chem. Toxic.* 30, 915 – 919
- [44] Kurata, Y., Kidachi, F., Yokoyama, M, Toyota, N., Tsuchitani, M., and Kato, M. (1998): Subchronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets: lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicol. Sci.* 42, 49 – 56
- [45] Lake, B.G., Gangolli, S.D., Grasso, P., and Lloyd, A.G. (1975): Studies on the hepatic effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 32, 355 – 367
- [46] Lake, B.G., Gray, T.J.B., Foster, J.R., Stubberfield, C.R., and Gangolli, S.D. (1984): Comparative studies on di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatic peroxisome proliferation in the rat and hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 72, 46 - 60
- [47] Lamb IV, J.C., Chapin, R.E., Teague, J., Lawton, A.D., and Reel, J.R. (1987): Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88, 255 – 269



- [48] Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H, Gonzales, F.J. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012 – 3022
- [49] L'Huguenot, J.C., Nativelle, C., Picard, K., Chagnon, M.C., and Régnier, J.F. (1999): Comparative Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) toxicokinetic profile in pregnant Wistar rats and CD1 mice. *The Toxicologist* 48, 210 (988A)
- [50] Li, L.-H., Jester, W.F. and Orth, J.M. (1998): Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153, 258 - 265
- [51] Maloney, E.K. and Waxman, D.J. (1999): Trans-activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161, 209 – 218
- [52] Marsman, D.S., Cattley, R.C., Conway, J.G., Popp, J.A. (1988): Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators, di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3,-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res.* 48, 6739 – 6744
- [53] Melnick, R.L., Morrissey, R.E., and Tomaszewski, K.E. (1987): Studies by the National Toxicology Program on di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Ind. Health* 3, 99 – 118
- [54] Merkle, J., Klimisch, H.J. and Jäckh, R. (1988): Developmental toxicity in rats after inhalation exposure of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Toxicol. Lett.* 42, 215 – 223
- [55] Moore, M.R. (1996/1997): Oncogenicity study in mice with Di (2-ethylhexyl)phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses. Corning Hazleton Incorporated (CHV), 9200 Leesburg Pike, Vienna, Virginia 22182-1699. Laboratory Study Identification: CHV 663-134 and 663-135; Sponsor: Eastman Chemical Company, First America Center, P.O. Box 1994, Kingsport, Tennessee 37662-5394
- [56] Nakamura, Y., Yagi, Y., Tomita, I., and Tsuchikawa, K. (1979): Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in mice. *Toxicol. Lett.* 4, 113 – 117
- [57] NTP (1982): National Toxicology Program. Carcinogenesis bioassay of di(2-ethylhexyl)phthalate (CAS-No. 117-81-7) in F 344 rats and B6C3F1 mice. NTP Technical Report Series No. 217
- [58] Oishi, S. (1985): Reversibility of testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Environ. Research* 36, 160 – 169
- [59] Oishi, S. (1993): Strain differences in susceptibility to di-2-ethylhexyl phthalate-induced testicular atrophy in mice. *Toxicol. Lett.* 66, 47 – 52
- [60] Palmer, C.A.N., Hsu, M.H., Griffin, K.J., Raucy, J.L., Johnson, E.F. (1998): Peroxisome proliferator activated receptor- $\epsilon$  expression in human liver. *Mol. Pharmacol.* 53, 14 – 22

- [61] Pennanen, S., Tuovinen, K., Huuskonen, H., Komulainen, H. (1992): The developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid in Wistar rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 19, 505 – 511
- [62] Peters, J.M., Cattley, R.C., and Conzalez, F.J. (1997): Role of PPAR $\alpha$  in the mechanism. *Food Additives and Contaminants* 8, 701 – 706
- [63] Poon, R., Lecavalier, P., Mueller, R., Valli, V.E., Procter, B.B., and Chu, I. (1997): Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 35, 225 – 239
- [64] Price, C.J., Tyl, R.W., Marr, M.C., Sadler, B.M., Kimmel, C.A. (1986): Reproduction and fertility evaluation of diethylhexyl phthalate (CAS No. 117-81-7) in Fischer 344 rats reexposed during gestation. NIEHS/NTP (NTP 86-309)
- [65] Pugh G. et al. (1999): Absence of liver effects in Cynomolgus monkeys treated with peroxisomal proliferators. *The Toxicologist* 48, 235; 1102A; *Toxicol. Sci.* (2000); submitted for publication
- [66] Rhodes, C., Orton, T.C., Pratt, I.S., Batten, P.L., Bratt, H., Fackson, S.J. and Elcombe, C.R. (1986): Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. *Environ. Health Perspect.* 65, 299 – 308
- [67] Roberts, R.A., James, N.H. Woodyatt, H.J., Macdonald, N. Tugwood, J.D. (1998): Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha). *Carcinogenesis* 19, 43- 48
- [68] Rose, M.L., Germolec, D.R., Schoonhoven, R., Thurman, R.G. (1997): Kupffer cells are causally responsible for the mitogenic effect of peroxisome proliferators. *Carcinogenesis* 18, 1453 – 1456
- [69] Sar, M., Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C., and Foster, P.M.D. (1999): Di(n)butylphthalate induces changes in morphology and androgen receptor levels in the fetal testis. *The Toxicologist* 48, 19, 91A
- [70] Schilling, K., Gembardt, C., and Hellwig, J. (1999): Reproduction toxicity of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *The Toxicologist* 48, 147; 692A
- [71] Schmid, P. and Schlatter, Ch. (1985): Excretion and metabolism of di-(2-ethylhexyl) phthalate in man. *Xenobiotica* 15, 251 – 256
- [72] Shiota, K., and Nishimura, H. (1982): Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ. Health Perspect.* 45, 65 - 70
- [73] Short, R.D., Robinson, E.C., Lington, A.W., and Chin, A.E. (1987): Metabolic and peroxisome proliferation studies with di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats and monkeys. *Toxicol. Ind. Health* 3, 185 – 195
- [74] Siddall, R.A. (1978): The use of marmosets (*Callithrix jacchus*) in teratological and toxicological research. *Primates Med.* 10, 215 – 224
- [75] Sjöberg, P., Lindqvist, N.G., and Plöen, L. (1986): Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 65, 237 – 242

- [76] Tamura, H., Iida, T., Watanabe, T., and Suga, S. (1990 a): Long-term effects of peroxisome proliferators on the balance between hydrogen peroxide-generating and scavenging capacities in the liver of Fischer-344 rats. *Toxicology* 63, 199 – 213
- [77] Tamura, H., Iida, T., Watanabe, T., and Suga, S. (1990 b): Long-term effects of hypolipidemic peroxisome proliferator administration on hepatic hydrogen peroxide metabolism in rats. *Carcinogenesis* 11, 445-450
- [78] Tandon, R., Chowdhary, S.R., Seth, P.K., and Srivastava, S.P. (1990): Altered development of testis of rat exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during lactation. *J. Environ. Biol.* 11, 345 - 354
- [79] Thomas, J.A., Schein, L.G., Gupta, P.K., McCafferty, R.E., Felice, P.R., and Donovan, M.P. (1979): Failure of monoethylhexylphthalate to cause teratogenic effects in the offspring of rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 51, 523 – 528
- [80] Tugwood, J.D., Aldridge, T.C., Lambe, T.G., MacDonald, N. and Woodyatt, N.J. (1997): Peroxisome proliferator activated-receptor: Structure and function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 804, 252 – 265
- [81] Tyl, R.W., Price, C.J., Marr, M.C., and Kimmel, C.A. (1988): Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate in Fischer-344 rats and CD-1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10, 395 – 412
- [82] Ward, J.M., Peters, J.M., Perella, C.M., Gonzalez, F.J. (1998): Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ -null mice. *Toxicol. Pathol.* 26, 240 – 246
- [83] Wolkowsky-Tyl, R., Jones-Price, C., Marr, M.C., Kimmel, C.A. (1983 a): Teratologic evaluation of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in CD1 mice. *Teratol.* 27, 84
- [84] Wolkowsky-Tyl, R., Jones-Price, C., Marr, M.C., Kimmel, C.A. (1983 b): Teratologic evaluation of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in Fischer-344 rats. *Teratol.* 27, 85A
- [85] Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu, Z.F., Fielden, M.R., and Matthews, J.B. (1998): Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 46, 282 – 293

## Enclosure 1

## Summary of the Carcinogenicity studies with DEHP

SPECIES	PROTOCOL	RESULTS	REFERENCES
hamster, Syrian golden 65 treated animals and 80 controls/sex/group	life-time, inhalation, 15 µ/m <sup>3</sup> (total exposure of 7 – 10 mg/kg bw)	No significant differences in tumour incidence	Schmezer et al., 1988
rat, F344 50 rats/sex/group	103 weeks, diet 0, 6000, 12000 ppm (0, 322/394, 674/774 males/females, mg/kg bw/day)	↑ incidence of hepatocellular carcinomas and neoplastic nodules ↓ incidence of pituitary, thyroid C-cell, and testicular interstitial- cell tumours in males	NTP (1982)
rat, F344, only females 20 animals/group	2 years, diet 0, 0.03, 0.1, 1.2% (ca. 0, 15, 50, 550 mg/kg bw/day*)	↑ incidence of hepatocellular carcinomas and neoplastic nodules at 1.2%-dose group	Cattley et al. (1987)
rat, F344, only males 10 treated, 8 controls	95 weeks, diet 2% (ca. 1000 mg/kg/d*)	liver tumours in 6/10 dosed rats and in 0/8 controls	Rao et al. (1987)
rat, F344, only males 14 treated, 10 controls	108 weeks, diet 2% (ca. 1000 mg/kg/d*)	hepatocellular carcinomas and neoplastic nodules in 11/14 dosed rats and in 1/10 controls	Rao et al. (1990)
rat, F344, only males 4 – 6 rats/group	up to 79 weeks, 2% DEHP in diet	hepatocellular carcinomas in 1/4 and 2/4 given DEHP for 52 and 78 weeks, respectively	Tamura et al. (1990 a, b)
rat, Wistar, only males 4 – 6 rats/group	up to 79 weeks, 2% DEHP in diet	No neoplastic lesions	Tamura et al. (1990 b)
rat, F344 70 – 85 rats/sex/group	104 weeks, diet 0, 100, 500, 2500 and 12500 ppm (0, 6/7, 29/36, 147/182, 789/939 mg/kg bw/day for males/females)	↑ incidence of hepatocellular adenoma and carcinomas ↑ incidence of monocellular leukemia	Moore (1996)
mouse, B6C3F1 50 mice/sex/group	103 weeks, diet 0, 3000, 6000 ppm (0, 672/799, 1325/1821 males/females; mg/kg bw/day)	↑ incidence of hepatocellular carcinomas	NTP (1982)
mouse, B6C3F1 70 mice/sex/group	104 weeks, diet 0, 100, 500, 1500, 6000 ppm (0, 6/7, 29/36, 147/182, 789/939 mg/kg bw/day for males/females)	↑ incidence of hepatocellular adenoma and carcinomas	Moore (1997)

\* = quoted from IUCLID

↑/↓ = decreased/increased, respectively