

Dibutylphthalat (DBP)

(CAS-Nr.: 84-74-2)

A) MUTAGENE EFFEKTE:

Di-n-butylphthalat (DBP) wurde in mehreren Testmodellen auf Genotoxizität geprüft. Die Daten sind überwiegend negativ.

Eine tabellarische Übersicht zu den Mutagenitätstesten mit DBP findet sich im Entwurf des EU Risk Assessment Report der EU, Kap. 4.1.2.7 sowie im WHO/IPCS Dokument (WHO 1997; Kap. 7.6.). Darin referiert sind:

In vitro-Studien:

- 7 Ames-Tests (5 negativ, 2 fraglich bzw. grenzwertig)
- 1 Genmutationstest an Hefen; fraglich
- 2 Genmutationstests an Säugerzellen (Maus-Lymphoma Assay) (1 negativ, 1 positiv; möglicherweise klastogener Effekt?)
- 1 Zytogenetiktest an Humanlymphozyten; negativ
- 2 Zytogenetiktests an CHL- und CHO-Zellen; negativ

In-vivo-Studien:

- SLRL-Test an *Drosophila melanogaster*; negativ
- 2 Mikronukleustests an der Maus; negativ

Auch andere Phthalsäureester (besonders ausführliche Datenlage bei DEHP) und ihre Metaboliten haben sich in Mutagenitätstests fast durchgehend als nicht mutagen / nicht genotoxisch erwiesen. Strukturell bestehen keine Verdachtsmomente (WHO, 1997).

B) Kanzerogene Effekte:

Eine Langzeitstudie zu Di-n-butylphthalat (DBP) existiert nicht. Doch sind für DBP tumorigene Effekte an Nagern nicht auszuschließen, denn DBP verursacht in subakuten/subchronischen Studien an Nagern eine Hepatomegalie (Lebervergrößerung), die mit einer bestimmten Form von Enzyminduktion (Peroxisomenproliferation) einhergeht. Dabei handelt es sich um einen schwellenabhängigen pleiotropen Effekt, der zumindest initial mit vermehrter DNA-Synthese verbunden ist. Bei Ratte und Maus stellt dieses Phänomen potentiell eine Lebertumor-disponierende Stoffwechselsituation dar.

Die tatsächliche Kanzerogenität der einzelnen Peroxisomenproliferatoren ist 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 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 α -)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 α -)Rezeptor fehlt, zeigten mit dem in dieser Hinsicht wohl aktivsten Phthalsäureester 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 α -Knock-out-Mäusen mehr erkennbar (Peters et al., 1997).

Die menschliche Leber weist 1 - 10 % der funktionalen PPAR α -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.

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

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.).

C) Reproduktionstoxizität und Entwicklungsschäden:

Wirkungen von Di-n-butylphthalat (DBP) auf die Hoden und auf die pränatale Entwicklung sind seit vielen Jahren bekannt. Die Studien sind im Entwurf zum EU Risk Assessment Report, im BUA-Report und im WHO/IPCS-Dokument (WHO, 1997) dargestellt. Wesentliche Schlüsselstudien werden nachfolgend beschrieben:

1. Entwicklungsschädigung:

Pränatale Toxizitätsstudien

Entwicklungsschädigende Effekte fanden sich an Ratte und Maus, wobei Mäuse – wie bei anderen Phthalsäureestern auch – offenbar empfindlicher reagierten.

An trächtigen Mäusen wurden 2 Fütterungsstudien durchgeführt:

ICL-ICR-Mäuse erhielten DBP vom 1. – 18. Trächtigkeitstag in Konzentrationen von 0,5 – 1,0% im Futter. In den höheren Dosisbereichen kam es zu einem dosisabhängigen Anstieg embryotoxischer Effekte und bei 1,0% zu einer hohen Resorptionsrate. Nur 3 Feten in dieser Gruppe wurden nicht resorbiert, von diesen hatten 2 eine Exencephalie. 0,05% (80 mg/kg/ Tag) wurden als "no adverse effect level" registriert. In der obersten Dosisgruppe waren die Gewichte der Muttertiere stark vermindert, wobei in solchen Fällen schon die hohe Resorptionsrate per se zu einer Gewichtsverminderung führt (Shiota et al., 1982).

In einer weiteren Studie am gleichen Mäusestamm wurde DBP im Futter ebenfalls vom 1. – 18. Tag verabreicht. Die beiden unteren Dosisgruppen (0,005 und 0,05%, entspr. 6.25 bzw. 62.5 mg/kg KG und Tag) waren frei von maternalen und fetalen Effekten. 625 mg/kg KG und Tag führten jedoch zu externen und skeletalen Malformationen und verminderten Wurfgrößen. Maternale Effekte, wie vergrößerte Nieren, waren in der obersten Dosisgruppe zu verzeichnen (Hamano et al., 1977).

An trächtigen Ratten gibt es 2 Studien mit Schlundsondenverabreichung:

10 trächtige Tiere pro Gruppe erhielten 120 bzw. 600 mg/kg/Tag (Zubereitung in Olivenöl) vom 1. – 21. Trächtigkeitstag. Bei 600 mg/kg/Tag war die Resorptionsrate erhöht; Wurfgröße und Fetalgewichte waren vermindert. Missbildungen wurden nicht beobachtet: Bei 120 mg/kg wurde noch ein vermindertes Placentagewicht registriert, dessen toxikologische Wertigkeit fraglich ist (Nikoronow et al., 1973).

In einer neueren Studie erhielten Ratten 500, 630, 750 und 1.000 mg/kg und Tag vom 7. – 15. Trächtigkeitstag. Bei 1.000 mg/kg und Tag wurden alle Würfe resorbiert, und bei 750 mg/kg waren es 10/12. Auch in den beiden unteren Dosisgruppen (630 und 500 mg/kg) wurden jeweils 2/12 bzw. 2/11 Würfen komplett resorbiert. In den 3 unteren Gruppen zeigten sich ein dosisabhängiger Anstieg abgestorbener Feten und verringerte Fetalgewichte. Externe Malformationen (bes. Gaumenspalten, skeletale Anomalien) waren bei 750 mg/kg und Tag statistisch signifikant, bei 630 mg/kg und Tag numerisch vermehrt. Die Gewichte der Muttertiere waren dosisabhängig in allen Gruppen vermindert (Ema et al., 1993).

Spätere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe fanden dann einen NOAEL (an der Ratte) von 250 mg/kg und Tag, während Resorptionen und Malformationen bei 500 und 625 mg/kg und Tag (7. – 15. Trächtigkeitstag) vermehrt auftraten (Ema et al., 1995).

Schließlich zeigten die Autoren auch für die späte Phase der Trächtigkeit (15. – 17. Tag; 500 – 1.500 mg/kg und Tag) spezifische Entwicklungsstörungen an den männlichen Feten (Maldescensus testis, verminderter Anogenitalabstand bei männlichen Tieren; Ema et al., 2000).

Prä- und perinatal induzierte Schäden der Sexualorgane und –entwicklung und der Fertilität männlicher Jungtiere wurden auch in einer „continuous breeding“-Studie an der Ratte bei 650 mg/kg und Tag berichtet (Foster et al., 2000, vgl. auch Kap. C.2b). Dem klinischen Erscheinungsbild nach glichen die Effekte denen einer Antiandrogen-Verabreichung während des kritischen Zeitfensters Trächtigkeitstage 12 – 20 (Mylchreest et al., 1998a und b); doch wird der Effekt nicht durch Interferenz mit dem Androgenrezeptor vermittelt (Sar et al., 1999).

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

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 DBP sind. Nach oraler Aufnahme von DBP (im Dosisbereich von ca. 0,5 – 2 g/kg) zeigen sich bei Ratten innerhalb weniger Tage charakteristische Hodenläsionen (Cater et al., 1977; Foster et al., 1980/1982; Gangolli, 1982; Oishi & Higara, 1980; Rehnberg et al., 1984) mit Vakuolisierung der Sertoli-Zellen und Verminderung des Spermiengehaltes. Auch die Anzahl der Zellorganellen in den Leydig'schen Zellen und die Serum-Testosteron-Spiegel sinken ab; kompensatorisch steigen die Aktivitäten LH- und FSH-produzierender Zellen der

Hypophyse („Kastrationszellen“). Der Zinkgehalt im Hoden nimmt bei gleichzeitigem Anstieg der renalen Zinkausscheidung ab. Durch Zufuhr von Zink lässt sich offenbar der Entwicklung der Hodenschädigungen partiell entgegenwirken (Cater et al., 1977; Agarwal et al., 1986).

Der „no observed effect level“ im Rahmen oraler Exposition junger Ratten über 55 Tage liegt bei ca. 250 mg/kg und Tag (Gray et al., 1982/1983), der LOEL bei 300 mg/kg und Tag. Hodenschädigungen fanden sich außerdem an Meerschweinchen (Gangolli, 1982), Frettchen (Lake et al., 1975), Mäusen (Oishi, 1993) und Hamstern (Lake et al., 1984), wobei Hamster wohl weniger empfindlich sind.

Junge Tiere sind möglicherweise empfindlicher. Zumindest wurde dies so mit DEHP beobachtet (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.

Arbeiten von Fukuoka et al. (1995) zeigen, dass es nach Gabe von DBP bereits innerhalb von wenigen Stunden zum Verlust des ausgereiften Keimepithels kommt, die Vakuolisierung der Sertoli-Zellen kommt später und vermutlich als Folge hiervon. Doch gibt es auch Hinweise, dass auch die Sertoli-Zellen selbst primäres Ziel inhibitorischer Effekte auf den Zellstoffwechsel sein können.

Untersuchungen mit einem anderen Phthalsäureester (DEHP) zeigen, dass die Hodenschädigungen an Primaten möglicherweise nicht auftreten. Mit DEHP waren sie jedenfalls an Marmosets weder in einer 2-Wochen-Sondierungsstudie mit 2.000 mg/kg/Tag (Rhodes et al., 1986) noch in einer 90-Tage-Fütterungsstudie (Kurata et al., 1998), noch an Cynomolgus-Affen nach 14-tägiger Verabreichung von 500 mg/kg und Tag zu beobachten (Pugh et al., 1999). Die Ursachen für diesen Speziesunterschied sind noch unklar; sie liegen wohl teilweise in einer geringeren Bioverfügbarkeit begründet (Rhodes et al., 1986; Short et al., 1987; Dirven et al., 1993; Albro et al., 1981/82). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, dass Spezies ohne funktional aktiven PPAR α -Rezeptor auch toxikodynamisch weniger empfindlich sind (Ward et al., loc. cit.).

b) Effekte auf die Fertilität:

Ratten erhielten im Rahmen einer kontinuierlichen Aufzuchtstudie („continuous breeding study“) 0,1; 0,5 und 1,0% DBP im Futter (ca. 66, 320 und 651 mg/kg KG und Tag*).

In allen Dosisgruppen wurde eine um 8 – 17% verminderte Anzahl lebender Jungtiere pro Wurf registriert. Die Fetalgewichte waren in den beiden oberen Dosisgruppen um bis zu 13% vermindert. Die Leber- und Nierengewichte der F0-Generation waren in der höchsten Dosisgruppe um ca. 10 – 15% erhöht.

* m Tiere: ca. 52, 256 und 509 mg/kg KG und Tag
w Tiere: ca. 80, 385 und 794 mg/kg KG und Tag

Verpaarungs-, Trächtigkeits- und Fertilitätsindices waren in der 1. Folgegeneration bei 1,0% stark vermindert (1 Wurf auf 20 Elternpaare), bei gleichzeitiger Verminderung maternaler Gewichte um ca. 13%. In der 2. Generation waren die Effekte insgesamt noch ausgeprägter als in der 1. Generation, so dass hier auch in allen Dosisgruppen noch um ca. 8% verminderte Fetalgewichte registriert wurden. 8/10 männlichen Tieren der mit 1% exponierten F1-Generation zeigten histologisch Hodenatrophien (NTP, 1991; Wine et al., 1997).

Mäuse (CD-1) erhielten im Rahmen einer kontinuierlichen Aufzuchtstudie DBP 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 300, 3.000 und 10.000 ppm (ca. 39, 390 und 1.300 mg/kg KG/Tag). Bei 10.000 ppm zeigten sich Effekte an den weiblichen Elterntieren (erhöhte Leber- und verminderte Uterusgewichte). Hodenatrophien wurden nicht beobachtet. Fertilitätsindex, Wurfgröße, Überlebensraten und Fetalgewichte der Jungtiere waren in dieser Dosisgruppe signifikant vermindert. 3.000 ppm blieben ohne Wirkung. Die Störung der reproduktiven Funktion betraf im Wesentlichen die weiblichen Tiere, wie in einem Kreuzverpaarungsexperiment gezeigt werden konnte (NTP, 1984; Lamb IV et al., 1987). Hierin spiegelt sich auch der entwicklungsschädigende Effekt, der zumindest bei der Maus mehr ins Gewicht fällt als die hodenschädigende Wirkung, die bei der Maus nur schwach ausgeprägt ist (Gray et al., 1982).

Fazit:

Mutagenität:

Aus den vorliegenden Studien zur Genotoxizität in vivo ergeben sich keine Anhaltspunkte für eine mutagene Wirkung von Di-n-butylphthalat. Daher erfolgt gemäß EU-Einstufungskriterien keine Einstufung (M: -).

Kanzerogenität:

DBP ist als Peroxisomenproliferator möglicherweise tumorigen an der Leber von Nagetieren. Allerdings bestehen zwischen Nagern und Primaten bedeutende Unterschiede in der Toxikodynamik der Peroxisomenproliferation. Nach einer Gewichtung des gegenwärtigen Kenntnisstandes wäre im Falle einer mit Peroxisomenproliferation assoziierten Kanzerogenität für DBP gemäß EU-Einstufungskriterien eine Kennzeichnung im Hinblick auf Kanzerogenität nicht erforderlich. Weitere Verdachtsmomente sind gering, doch ist in Ermangelung einer geeigneten Langzeitstudie eine Einstufung gemäß EU-Einstufungskriterien nicht möglich (C: -).

Fertilität:

Hodenschädigende und fertilitätshemmende 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 Spezies und Tierstamm möglicherweise stark vom Alter der Tiere und der Bioverfügbarkeit von DBP bzw. des Monoesters MBP ab. Ob ein genereller Trend zu einer geringeren Empfindlichkeit zu Primaten bzw. Tierarten mit einem funktionell inaktiven PPAR α -Rezeptor besteht, ist noch ungeklärt (Ward et al., 1998). DBP wird daher gemäß EU-Einstufungskriterien in die Kategorie 2 fortpflanzungsgefährdend (Fruchtbarkeit) (R_F: 2) eingestuft.

Entwicklungsschädigung:

Ausgeprägte fruchtschädigende Effekte inkl. Missbildungen traten bei Mäusen und Ratten in Fütterungs- und Sondierungsstudien bei Dosen unterhalb von 1.000 mg/kg und Tag auf. Der "no adverse effect level (NOAEL)" der Ratte liegt nach den in Kap. C.1 aufgeführten Studien bei ca. 250 mg/kg/Tag, doch schließen Ergebnisse aus Mehrgenerationsstudien (Kap. C.2b) auch einen tieferen NOAEL nicht aus. Maternale Effekte wie Gewichtsverminderungen sind mindestens teilweise Folge der fetalen Resorptionen. Die fetalen Effekte sind Ausdruck einer selektiven Wirkung und können nicht als Folge einer maternalen Toxizität gewertet werden. DBP wird daher gemäß den Einstufungskriterien in die Kategorie 2 fortpflanzungsgefährdend (entwicklungsschädigend) (R_E: 2) eingestuft.

Quellenangaben:

- [1] Agarwal, D.K., Eustis, S., Lamb IV, J.C., Jameson, C.W., and Kluwe, W.M. (1986a): 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., and 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] 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
- [7] 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 α is functional and mediates peroxisome proliferator-induced hypolipidaemia. *Biochem. J.* 332, 689 – 693
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Caldwell, J., Dring, L.G, Franklin, R.B., Koster, U., Smith, R.L., Williams R.T. (1977): *J. Med. Primatol.* 6, 367 – 375
- [11] Caldwell, J., Notarianni, L.J., Smith, R.L., Fafunso, M.A., French, M.R., Dawson, P., Bassir, O. (1979): *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48, 273 – 278
- [12] 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)
- [13] Cater et al. (1977): Studies on dibutyl phthalate-induced testicular atrophy in the rat: Effect on zinc metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 41, 609 – 618
- [14] 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
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Davis, B.J., Maronpot, R.R., and Heindel, J.J. (1994a): Di(2-ethylhexyl) phthalate suppresses oestradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, 216 – 223
- [18] Davis, B.J., Weaver, R., Gaines, L.J., and Heindel, J.J. (1994b): Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses oestradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128, 224 – 228

- [19] 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., Noordhoek, J., and Jongeneelen, F.J. (1993a): 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
- [20] 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
- [21] 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
- [22] 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
- [23] Ema, M., Amano, H., Itami, T., Kawasaki, H. (1993): Teratogenic evaluation of di-n-butyl phthalate in rats. *Toxicol. Lett.* 69, 197 – 203
- [24] Ema et al. (1995): Comparative developmental toxicity of n-butyl benzyl phthalate and di-n-butyl phthalate in rats. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 28, 223 – 228
- [25] 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
- [26] Foster, P.M.D., Thomas, L.V., Cook, M.W., Gangolli, S.D. (1980): Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54, 392 - 398
- [27] Foster, P.M.D., Cook, M.W., Thomas, L.V., Walters, D.G., Gangolli, S.D. (1982): Differences in urinary metabolic profile from di-n-butyl phthalate-treated rats and hamsters: A possible explanation for species differences in susceptibility to testicular atrophy. *Drug Metab. Dispos.* 11, 59 – 61
- [28] Foster et al. (2000): Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.*, 55, 143 – 151
- [29] Foster et al. (2000): Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* 38, Suppl. 1, 97 – 99
- [30] Fukuoka et al. (1993): Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part 4. Changes in the activity of succinate dehydrogenase and the levels of transferrin and ferritin in the Sertoli and germ cells. *J. Appl. Toxicol.* 13, 241 – 246
- [31] Fukuoka et al. (1994): Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. VI, A possible origin of testicular iron depletion. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1609 – 1612

- [32] Fukuoka, M., Kobayashi, T., Hayakawa, T. (1995): Mechanism of Testicular Atrophy Induced by Di-n-butyl Phthalate in Rats. Part. 5. Testicular Iron Depletion and Levels of Ferritin, Haemoglobin and Transferrin in the Bone Marrow, Liver and Spleen. *J. Appl. Toxicol.* 15, 379 – 386
- [33] Gangolli, S.D. (1982): Testicular effects of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* 44, 77 – 84
- [34] 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
- [35] 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
- [36] 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
- [37] Gray, T.J.B. and Butterworth, K.R. (1980): Testicular atrophy produced by phthalate esters. *Arch. Toxicol. Suppl.* 4, 452 – 455
- [38] Gray, T.J.B., Rowland, J.R., Foster, P.M.D., Gangolli, S.D. (1982): Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol. Lett.* 11, 141 – 147
- [39] Hamano, Y., Kuwano, A., Inoue, K., Oda, Y., Yamamoto, H., Mitsuda, B. Kunita, N. (1977): Studies on toxicity of phthalic acid esters. First report: Teratogenic effects in mice administered orally. *Osaka-furitsu Koshu Esei kenkyusho Kenkyu Hokoka Shokukhim Eisei Hen* 8, 29 - 33
- [40] 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
- [41] IARC (1995): 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
- [42] IARC (1996): Clofibrate. Gemfibrozil. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, some pharmaceutical drugs, Vol. 66, Lyon
- [43] 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
- [44] Lake et al. (1975): Studies on the hepatic effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, No. 2, 355 – 367

- [45] 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
- [46] 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
- [47] 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
- [48] 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
- [49] Maloney, E.K. and Waxman, D.J. (1999): trans-Activation of PPAR α and PPAR γ by Structurally Diverse Environmental Chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161, 209 – 218
- [50] 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,-xyli-dino)-2-pyrimidini-[thio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res.* 48, 6739 – 6744
- [51] 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
- [52] Morrissey, R.E., Lamb, J.C., Morris, R.W., Chapin, R.E., Gulati, D.K., Heindel, J.J. (1989): Results and evaluations of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13, 747 – 777
- [53] Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M.D. (1998): Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.*, 43, No. 1, 47 – 60
- [54] Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R.C., Foster, P.M.D. (1999): Disruption of Androgen-Regulated Male Reproductive Development by Di(n-Butyl) Phthalate during Late Gestation in Rats is Different from Flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156, No. 2, 81 – 95
- [55] Mylchreest et al. (2000): Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.*, Vol. 55, 1, 143 – 151
- [56] Nikoronow, M., Mazure, H., Piekacz, H. (1973): Effect of orally administered plasticizers and polyvinyl chloride stabilizers in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 253 – 259

- [57] NTP (1984): Di(n-butyl) phthalate: Reproduction and fertility assessment in CD-1 mice when administered in the feed. Research Triangle Park, North Carolina, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (Report No. T-0035C; NTIS Publication No. PB92-111996)
- [58] NTP (1991): Final Report on the Reproduction Toxicity of Di-n-Butyl-Phthalate in Sprague-Dawley Rats. National Institute of Environmental Health Sciences Rep. T-0035C)
- [59] NTP (1995): NTP technical report on toxicity studies of dibutyl phthalate (CAS No. 84-74-2) administered in feed to F344/N rats and B6C3F₁ mice. Research Triangle Park, North Carolina, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (Toxicity Series No. 30)
- [60] Oishi, S. (1985): Reversibility of testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Environ. Research* **36**, 160 – 169
- [61] Oishi, S. (1993): Strain differences in susceptibility to di-2-ethylhexyl phthalate-induced testicular atrophy in mice. *Toxicol. Lett.* **66**, 47 – 52
- [62] Oishi & Higara (1980a): Testicular atrophy induced by phthalic acid esters. Effect on testosterone and zinc concentrations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **53**, 35 – 41
- [63] Oishi & Higara (1980b): Effect of phthalic acid esters on mouse testes. *Toxicol. Lett.* **5**, 413 – 416
- [64] Oishi & Higara (1980c): Testicular atrophy induced by phthalic acid monoesters: Effects of zinc and testosterone concentrations. *Toxicol.* **15**, 197 – 202
- [65] Oishi & Higara (1980d): Effects of phthalic acid monoesters on mouse testes. *Toxicol. Lett.* **6**, 239 – 242
- [66] Palmer, C.A.N., Hsu, M.H., Griffin, K.J., Raucy, J.L., Johnson, E.F. (1998): Peroxisome proliferator activated receptor- α expression in human liver. *Mol. Pharmacol.* **53**, 14 – 22
- [67] Peters, J.M., Cattley, R.C., and Conzalez, F.J. (1997): Role of PPAR α in the mechanism. *Food Additives and Contaminants* **8** (6), 701 – 706
- [68] Pugh G. et al. (1999): Absence of liver effects in Cynomolgus monkeys treated with peroxisomal proliferators. *The Toxicologist* **48**, 235; 1102A (1999); *Toxicol. Sci.* (2000); submitted for publication
- [69] Rhenberg et al. (1984): Effect of dibutyl phthalate on testosterone concentrations in serum and interstitial fluid. *Biol. Reprod.* **30** (Suppl. 1), 306
- [70] 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-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: Extrapolation of effects in rodents to man. *Environ. Health Perspect.* **65**, 299 – 308
- [71] 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 (1998)

- [72] 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
- [73] Sar, M., Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C., and Foster, P.M.D. (1999): Di(n)butyl phthalate induces changes in morphology and androgen receptor levels in the fetal testis. *The Toxicologist* 48, 19, 91A (1999)
- [74] 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
- [75] 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
- [76] Siddall, R.A. (1978): *Prim. Med.* 10, 215 – 224
- [77] Sjöberg, P., Lindqvist, N.G., and Plöen, L. (1986b): Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 65, 237 – 242
- [78] Tamura, H., Iida, T., Watanabe, T., and Suga, S. (1990a): 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
- [79] 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
- [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] 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 α -Null Mice. *Toxicol. Pathol.* 26, 240 – 246
- [82] Wine, R.N., Li, L.-H., Barnes, L.H., Gulati, D.K., Chapin, R.E. (1997): Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in SD rats. *Environ. Health Perspect.* 105, 102 – 107
- [83] 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.