

The MAK Collection for Occupational Health and Safety

Di-n-butylphthalat

MAK-Begründung, Nachtrag

A. Hartwig^{1,*}, MAK Commission^{2,*}

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

² Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn

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

Keywords: Di-n-butylphthalat; MAK-Wert; maximale Arbeitsplatzkonzentration; Entwicklungstoxizität

Citation Note: Hartwig A, MAK Commission. Di-n-butylphthalat. MAK-Begründung, Nachtrag. MAK Collect Occup Health Saf [Original-Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH; 2017 Jan;2(1):99-118]. Korrigierte Neuveröffentlichung ohne inhaltliche Bearbeitung. Düsseldorf: German Medical Science; 2026. https://doi.org/10.34865/mb8474yold0062_w

Neuveröffentlichung (Online): 07 Aug 2026

Vormals erschienen bei Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb8474yold0062>

Addendum abgeschlossen: 08 Okt 2015

Erstveröffentlichung (Online): 26 Jan 2017

Zur Vermeidung von Interessenkonflikten hat die Kommission *Regelungen und Maßnahmen* etabliert.



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Di-n-butylphthalat

84-74-2

Nachtrag 2016

MAK-Wert (2009)	0,05 ml/m³ (ppm) $\triangleq$ 0,58 mg/m³
Spitzenbegrenzung (2009)	Kategorie I, Überschreitungsfaktor 2
Hautresorption	–
Sensibilisierende Wirkung	–
Krebserzeugende Wirkung (2014)	Kategorie 3 B
Fruchtschädigende Wirkung (2009)	Gruppe C
Keimzellmutagene Wirkung	–
BAT-Wert	–

Entwicklungstoxizität

Seit Februar 2015 dürfen die Weichmacher Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), Di-n-butylphthalat (DBP), Diisobutylphthalat (DIBP) und Benzylbutylphthalat (BBP) nur noch mit einer chemikalienrechtlichen Zulassung verwendet werden (EU 2011).

Zum toxikologischen Wirkprofil von Di-n-butylphthalat existieren Übersichtsarbeiten der Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR 2001) und ein EU Risk Assessment Report (ECB 2003), die schon für die Begründung 2010 berücksichtigt wurden, sowie eine toxikologische Bewertung von NICNAS (2013) und Datenzusammenstellungen bei der ECHA (2016), die auf bewertungsrelevante Studien geprüft wurden.

Dieser Nachtrag zu Di-n-butylphthalat wird erstellt, da seit der Begründung 2010 weitere Untersuchungen zur fruchtschädigenden Wirkung publiziert wurden.

Erfahrungen beim Menschen

In einer Studie an den Nachkommen von 71 Kriegsveteranen wurde eine erhöhte Inzidenz von Hypospadie ($p < 0,05$), Kryptorchismus ($p < 0,05$) und Brustkrebs ($p < 0,05$) beobachtet. Die ehemaligen Soldaten waren in den Jahren 1948 bis 1960 täglich über ihre Kleidung gegen Di-n-butylphthalat (als Insektizid gegen Typhusüberträger) exponiert. Die Autoren modellierten die Hautresorption von Di-n-butylphthalat aus

der Kleidung und berechneten eine theoretische Dosis von 64 mg/kg KG und Tag. Mittels Fragebögen wurde das Auftreten von Kryptorchismus, Penismissbildungen wie Hypospadie, Pubertas präcox (nur bei weiblichen Nachkommen), geringe Spermienzahl, reduzierte Fertilität, Störungen von Ovar oder Uterus sowie Brustkrebs untersucht. Von den 71 Kriegsveteranen hatten 58 (81,7%) Nachkommen. Von den insgesamt 155 Nachkommen waren 79 (51%) männlich und 76 (49%) weiblich. Es traten vier Fälle (5,1%) von Kryptorchismus auf, wofür der Wert in der Allgemeinbevölkerung 0,91% (Jahr 2005) oder 1,09% (Jahr 2000) betrug. Mit Hypospadie wurden zwei Fälle (2,5%) beobachtet, in der Allgemeinbevölkerung waren es 0,33% (2000) und 0,3% (2005); es gab drei Fälle (4,0%) mit Brustkrebs im Vergleich zu 0,48% bei der Allgemeinbevölkerung (2008) (Carran und Shaw 2012).

In Kommentaren zu dieser Veröffentlichung wird folgendes kritisch angemerkt: Es handelt sich weder um eine Kohorten- noch um eine Fall-Kontroll-Studie, sondern um eine Querschnitts-Stichprobe und eine Cluster-Untersuchung ohne Bestimmung der Größe des Clusters. Die berichteten Fälle haben statistisch keine Aussagekraft. Confounder wurden nicht mit einbezogen. Von den befragten Kriegsveteranen nahmen nur 33% an der Untersuchung teil, was eine gewisse Verzerrung (Reaktionsneigung/Befangenheit) vermuten lässt. Die Annahmen für die täglichen resorbierten Mengen sind mangelhaft (McBride und Schep 2012). Es fehlen Altersangaben der Nachkommen. Der Vergleich mit den Inzidenzen in der Allgemeinbevölkerung ist nicht korrekt, da alle aufgetretenen Brustkrebsfälle (4,0%), das heißt eine kumulative Inzidenz, mit einer jährlichen Inzidenzrate (0,48%) verglichen wurden. Tatsächlich liegen die aufgetretenen Fälle im normalen Bereich. Die für die Hypospadie angegebenen Inzidenzen betrugen tatsächlich 0,65% im Jahr 2000 und 0,55% im Jahr 2005; vermutlich haben die Autoren männliche und weibliche Nachkommen bei der Ableitung mit einbezogen. Die Geburtsjahre der Nachkommen der Kriegsveteranen fehlen, aber eine erneute Abschätzung führt zu einem relativen Risiko von 3,90 mit einem 95%igen Konfidenzintervall von 0,99 bis 15,3, welches zeigt, dass die Fälle von Hypospadie in der Studie zwar statistisch signifikant erhöht sind, aber nur marginal und nicht in dem Ausmaß wie in der Studie von Carran und Shaw (2012) dargestellt. Ähnlich verhält es sich mit den Berechnungen für Kryptorchismus, die auf 2,13% im Jahr 2000 und 1,79% im Jahr 2005 korrigiert, zu einem relativen Risiko von 2,56 mit einem 95%igen Konfidenzintervall von 0,98 bis 6,65 führen, was nicht eindeutig statistisch signifikant erhöht ist. Die wenigen Fälle von Hypospadie und Kryptorchismus in der Studie von Carran und Shaw (2012) könnten auch im Zufallsbereich liegen, und die Einflüsse der Antwort- und Selektionsverzerrungen durch Aufnahme von Daten ausschließlich von den Vätern, von denen nur eine geringe Zahl Rückmeldungen erhalten wurden, ist hoch (Elwood und Borman 2012).

Tierexperimentelle Befunde und In-vitro-Untersuchungen

Hier werden Studien beschrieben, die seit der letzten Begründung 2010 hinzugekommen sind. Studien mit Dosierungen über 500 mg/kg KG und Tag werden nicht berücksichtigt, da sie nicht den kritischen Dosisbereich umfassen.

Die betroffenen Studien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1. Studien mit prä- und postnataler Exposition gegen Di-n-butylphthalat

Spezies	Exposition	Befunde	Literatur
pränatale Behandlung			
Ratte, SD, 4–5 ♀, Kontrolle: 10 ♀	GD 12–20, 0,1; 1; 10; 30; 50; 100; 500 mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Untersuchung: GD 21; für zeitlichen Verlauf: GD 12–16, 12–17, 12–18, 12–19, 12–20, 0, 500 mg/kg KG u. Tag; Untersuchung GD 17–21 täglich; Nachkommen: PND 1, PND 2 dazu 3 Feten/Wurf u. ein Hoden (rechts) pro Endpunkt untersucht	30 mg/kg KG: NOAEL für Effekte auf die ♂ Reproduktionsorgane; ab 30 mg/kg KG: Feten: Zellzahl in Hoden ↓ (reversibel, am PND 2 bei 500 mg/kg KG normalisiert, lt. Aussage der Autoren bei 30 mg/kg KG transient u. normalisiert postnatal); ab 50 mg/kg KG: Feten: Hodenvolumen ↓ (reversibel, am PND 2 bei 500 mg/kg KG normalisiert), veränderte Morphometrie der Hodenstränge (Größe u. Organisation; unklar, ob reversibel, da nicht untersucht am PND 2); ab 100 mg/kg KG: Feten: Anzahl multinukleärer Keimzellen in Hoden ↑; 500 mg/kg KG: Leydigzell-Cluster; k. A. zur Maternaltoxizität; gleicher Stamm: 500 mg/kg KG NOAEL für Maternaltoxizität (Barlow u. Foster 2003; Mylchreest et al. 2000);	Boekelheide et al. 2009
Ratte, SD, 4 ♀	GD 12–21, 0, 10, 30, 50, 100 mg/kg KG u. Tag, intrastral, Vehikel: Maiskeimöl, nach Geburt: Reduktion der Würfe auf je 4 ♂ u. 4 ♀ Nachkommen u. Aufzucht durch ein weder mit DBP noch mit Maiskeimöl behandeltes Muttertier; Untersuchungen im Alter von 5, 7, 9, 14, 17 Wochen, je 4 ♂ Tiere pro Dosis u. Zeitpunkt	50 mg/kg KG: NOAEL für Effekte auf die ♂ Reproduktionsorgane; 100 mg/kg KG: Nachkommen: rel. Hodengew. ↓ (9, 14, 17 Wochen, zeitabhängig, 5 u. 7 Wochen nicht ↓), Anzahl der Leydigzellen/Fläche ↑ (9, 14, 17 Wochen, zeitabhängig, 5 u. 7 Wochen nicht ↑), Hoden: Menge sER ↓ (9, 14, 17 Wochen; 5, 7 nicht ↓), Serum: Testosteron ↓ (5, 7, 9, 14, 17 Wochen), Serum: LH (↓ 5, 7 Wochen, ↑ 9, 14, 17 Wochen); ohne auffällige Veränderungen: <u>Nachkommen:</u> KG, Wurfgröße, Geschlechterverhältnis; k. A. zur Maternaltoxizität	Shirai et al. 2013
Ratte, SD, 4 ♀	GD 12–21, 0, 100 mg/kg KG u. Tag, intrastral, Vehikel: Maiskeimöl, nach Geburt: Reduktion der Würfe auf je 4 ♂ u. 4 ♀ Nachkommen u. Aufzucht	100 mg/kg KG: <u>Nachkommen:</u> rel. Hodengew. ↓, Serum: Testosteron ↓ u. LH ↑, Hoden: Leydigzellhyperplasie, degenerierte Hodenkanälchen, Leydigzellen: atypische Nuklei, vermehrt freie Ribosomen, „stripped“ rER, Filamente in Zwischengröße, verlängerte zytoplasmatische Filopodien, atypische Tight junctions und Zilienformationen, sER kaum nachweisbar;	Wakui et al. 2013

Tab. 1. (Fortsetzung)

Spezies	Exposition	Befunde	Literatur
	durch ein weder mit DBP noch mit Maiskeimöl behandeltes Muttertier; Untersuchungen im Alter von 20 Wochen	ohne auffällige Veränderungen: <u>Muttertiere</u> : KG, Wurfgröße, <u>Nachkommen</u> : KG, Überleben, Geschlechterverhältnis	
Ratte , SD Crl:CD (SD)IGS BR, 7–9 ♀	GD 12–19 , 0, 1260–1520, 6300– 7600 mg/kg Futter (0, 112, 582 mg/kg KG u. Tag), Untersuchung GD 19 od. 20, d.h. 4 od. 24 h nach Beendigung der Gabe über das Futter	kein NOAEL ; ab 112 mg/kg KG : <u>Feten</u> : Hoden: Testosteronekonzentration nach 24 h ↓, Leydigzell-Cluster ↑, Anzahl multinukleärer Keimzellen ↑, Durchmesser Hodenstränge ↑, mRNA verschiedener an Cholesterinsynthese u. -transport u. Steroidgenese beteiligter Proteine bzw. Enzyme ↓ (nach 4 h, nach 24 h bei 112 mg/kg KG reversibel); 583 mg/kg KG : <u>Feten</u> : Hoden: Testosteronekonzentration nach 4 h ↓, AGD ↓; keine Maternaltoxizität	Struve et al. 2009
Ratte , SD, mindestens 3 ♀	GD 10–19 , 0, 250, 500, 700 mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Untersuchung PND 31	kein NOAEL ; ab 250 mg/kg KG : <u>Nachkommen</u> : ♂: Präputialseparation verzögert; ab 500 mg/kg KG : <u>Nachkommen</u> : ♂: abs. Gew. von LABC ↓, AGD/KG ↓, Retention der Brustwarzen, ERα, AR u. Shh Protein ↓; 700 mg/kg KG : <u>Nachkommen</u> : ♂: KG ↓ (PND 25, PND 31), Kryptorchismus, Hypospadie, abs. Gew. von Hoden, Nebenhoden, ventraler Prostata, Samenbläschen, Cowper'sche Drüse, Glans Penis ↓, Serum: Dihydroxytestosteron ↓, Caudaagenesie in den Nebenhoden, Atrophie der ventralen Prostata, Serum: Testosteron u. Dihydroxytestosteron ↓, 5α-Reduktase II ↓	Kim et al. 2010
Ratte , Wistar, 6–9 ♀	GD 13–21 , 0, 100, 500 mg DBP/kg KG u. Tag, 150 mg DEHP/kg KG u. Tag, 100 mg DBP + 150 mg DEHP/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Rapsöl, Untersuchung GD 21, PND 13, PND 90	100 mg/kg KG : NOAEL für Effekte auf die ♂ Reproduktionsorgane ab 100 mg/kg KG : <u>Feten</u> : ♂: rel. AGD (bezogen auf KG) ↓, vergrößerte Cluster von Leydigzellen (1 Tier, bei 500 mg/kg KG: 2 Tiere, k. A. wie viele Tiere untersucht: 3 Tiere pro Wurf, aber 6–9 Muttertiere pro Gruppe); 500 mg DBP/kg KG : <u>Feten</u> : Hoden: Testosteronekonzentration ↓, Hodenstränge Durchmesser ↑, Prozentsatz von Hodensträngen mit multinukleären Keimzellen ↑, <u>Nachkommen</u> : ♂: mittlere Anzahl von Brustwarzen ↑ (PND 13);	Martino- Andrade et al. 2009

Tab. 1. (Fortsetzung)

Spezies	Exposition	Befunde	Literatur
		bei 100 mg DBP + 150 mg DEHP/kg KG: <u>Feten:</u> Hoden: Testosteronkonzentration ↓, Hodenstränge Durchmesser ↑, Prozentsatz von Hodensträngen mit multinukleären Keimzellen ↑; keine Maternaltoxizität, ohne auffällige Ver- änderungen, <u>Nachkommen:</u> Alter zum Zeit- punkt der Präputialtrennung, Gew. von Hoden, Nebenhoden, Samenbläschen, LABC, Anzahl der Spermatiden pro Hoden bei adulten Ratten	
Ratte, Wistar, mindestens 3 ♀	GD 13–21, 0, 100, 500 mg DBP/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Untersuchung PND 25	ab 100 mg/kg KG: <u>Nachkommen:</u> abs. Gew. ventrale Prostata ↓ (nicht dosisabhängig); 500 mg DBP/kg KG: <u>Nachkommen:</u> abs. Hodengew. ↓, abs. Gew. Samenbläschen ↓, AGD ↓, Penislänge ↓; k. A. zum KG u. k. A. rel. Organgew. Studie aufgrund des geringen Unter- suchungsumfangs nicht geeignet zur Bewer- tung der Entwicklungstoxizität	Macleod et al. 2010
Ratte, Albino, k. w. A., mindestens 6 ♀	GD 14–Geburt, 0, 2, 10, 50 mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Positivkontrolle: 6 µg DES/kg KG u. Tag, Untersuchung nur ♂ Nachkommen: PND 0, PND 75	ab 2 mg/kg KG: <u>Muttertiere:</u> Gestations- dauer ↑, KG-Zunahme am GD 21 ↓; <u>Nachkommen:</u> KG am PND 21 ↓ (16%, bei 10 mg/kg KG: 13%, keine Dosisabhängigkeit); ab 10 mg/kg KG: <u>Nachkommen:</u> KG am PND 0 ↓ (3,6%; bei 10 mg/kg KG: 1,7%; keine Dosisabhängigkeit), 50 mg/kg KG: <u>Nachkommen:</u> KG am PND 75 ↓ (3,7%), abs. <u>Organgew.</u> von Neben- hoden, Hoden, Prostata, Samenbläschen ↓, rel. <u>Organgew.</u> nicht (nachgerechnet anhand der Tabellenwerte, daher Erniedrigung der abs. <u>Organgew.</u> auf erniedrigtes KG zurück- zuführen), Anzahl der Spermien ↓ (7,7%), Prozentsatz beweglicher Spermien ↓ (3,2%), Prozentsatz von Spermienabnormalitäten ↑ (45,6%); ohne auffällige Veränderungen: Wurfgröße, Anzahl lebender Nachkommen, fetale Mor- talitätsrate, Geschlechterverhältnis, Ergebnisse nicht plausibel, da 21 Tage nach Expositionsende nicht weitere Erniedrigung des KG der Nachkommen als beim Expositi- onsende zu erwarten ist, erhöhter Prozent- satz Spermienabnormalitäten fraglich wegen hoher Anforderungen an Methodik, Studie deshalb nicht geeignet zur Bewertung der Entwicklungstoxizität	Ahmad et al. 2014

Tab. 1. (Fortsetzung)

Spezies	Exposition	Befunde	Literatur
Ratte, F344 (Mikro- array), SD (SREBP), 3–4 ♀	GD 12–20 (50 mg/kg KG), GD 12–19 (500 mg/kg KG), nur GD 10 (500 mg/kg KG, F344), GD 12– 20 (SD), 0, 50, 500 (F344), 0, 100, 500 (SD) mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Untersuchung: 1–18 h nach letzter Dosierung	F344: 500 mg/kg KG: Feten: Kohlenhydrat-, Aminosäure-, Energiestoffwechselwege ↓, Lipidstoffwechselweg ↓, insb. durch SREBP- regulierter; SD: ab 100 mg/kg KG: Feten: multinukleäre Keimzellen ↑; 500 mg/kg KG: Feten: AGD ↓, Hoden: Testosteron u. Gesamtcholesterin ↓, SREBP2 in Leydigzellen ↓, in Hodensträngen nicht	Johnson et al. 2011
Maus, CD1, 3 ♀	GD 14–GD 17, nur GD 18 0, 250 (GD 14–17), 500 (nur GD 18) mg/ kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Untersuchung: GD 17 (6 h nach letzter Dosierung) od. GD 18 (2, 4, 8 h nach letzter Dosierung)	ab 250 mg/kg KG: Feten: Kohlenhydrat-, Aminosäure-, Energiestoffwechselwege ↓, Lipidstoffwechselweg ↑, insb. durch SREBP- regulierter	Johnson et al. 2011
Maus, Wildtyp, p53-Hete- rozygot, p53-null, mindestens 3 ♀	GD 12–Geburt, 0, 250 (Untersuchung nur Adulte), 500 (zeit- licher Verlauf) mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Untersuchung: nur Hoden von ♂ Feten/ Adulte untersucht, GD 19, PND 1, 4, 7, 10, 87–515 (nur 250 mg/kg KG u. Tag)	250 mg/kg KG: Adulte: keine Auffälligkeiten bei Keimzellen der Wildtyp-Mäuse, DBP-be- handelten Heterozygoten u. Vehikelkontrol- len der p53-Null-Mäuse, aber abnormale Keimzellen bei p53-null-Mäusen; 500 mg/kg KG: Feten: keine Auffälligkeiten bei Keimzellen der Wildtyp-Mäuse, ver- mehrte Bildung von MNG in Hoden am GD 19 bei p53-null (stärker als bei p53-Hetero- zygot), die mit der Zeit abnimmt u. am PND 10 nicht mehr nachweisbar war; immunhistochemische Färbung von perina- talen multinukleären Keimzellen u. adulten abnormalen Keimzellen negativ für Okta- mer-Bindungsprotein-3/4 u. plazentale Alka- lische Phosphatase (Marker für primordiale Keimzellen u. CIS-Zellen); Studie nicht geeignet zur Bewertung der Ent- wicklungstoxizität, da Knockout-Mäuse artifi- zielles System ohne Arbeitsplatzrelevanz	Saffarini et al. 2012

Tab. 1. (Fortsetzung)

Spezies	Exposition	Befunde	Literatur
prä- und postnatale Behandlung			
Ratte, Wistar, 10 ♀	GD 12–PND 21, 0, 100 mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Untersuchung: GD 20, PND 1, 90	100 mg/kg KG: <u>Nachkommen:</u> ♂: ventrale Prostata: rel. Prozentsatz von epithelialem u. stromalem Kompartiment ↑ u. von lumenalem Kompartiment ↓, entzündliche Infiltrate im Stroma mit od. ohne epithelialer Dysplasie u. intraepithelialer Neoplasie, Akkumulation von Kollagenfibrillen angrenzend an Epithel, AR ↑ (Protein), Proliferationsindex ↑, Metalloproteinase-9-Aktivität ↑; keine auffälligen Befunde: KG (Geburt, PND 90), abs. u. rel. Gew. der ventralen Prostata (PND 90), Serum-Testosteron u. testikuläres Testosteron (PND 90)	Scarano et al. 2009
Ratte, Wistar, 10 ♀	GD 12–PND 21, 0, 100 mg/kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl, Untersuchung: PND 90	100 mg/kg KG: <u>Nachkommen:</u> ♂: Hoden: Leydigzell-Cluster, multinukleäre Keimzellen, interstitielles Kompartiment ↑ (GD 20); keine auffälligen Befunde: AGD (PND 1), KG (PND 90), abs. u. rel. Gew. von Hoden, Nebenhoden, ventrale Prostata, Samenbläschen (PND 90), Serum Testosteron u. testikuläres Testosteron (PND 90), Nebenhoden: Proliferationsindex, Spermienzahl im Hoden u. Nebenhoden (PND 90), Spermientransitzeit (PND 90), Spermienmorphologie u. -beweglichkeit (PND 90), AR u. AQP9 Immunoreaktivitäten (PND 90), Nebenhoden: rel. Verhältnis von epithelialen, stromalen od. luminalen Kompartimenten; Hoden am PND 90 nicht untersucht	Scarano et al. 2010
Ratte, Wistar, 9–10 ♀	GD 6–PND 28, 0; 0,037; 0,111; 0,333; 1% im Futter (GD 6– 21: 0; 31; 94; 291; 797 mg/kg KG u. Tag; PND 0–15: 0; 55; 165; 486; 1483 mg/kg KG u. Tag; PND 16–28: 0; 47; 140; 433; 1283 mg/kg KG u. Tag)	94 mg/kg KG: NOEL für ♂ Nachkommen AGD ↓; 291 mg/kg KG: NOAEL für verhaltensbiologische Effekte auf die Nachkommen; ab 291 mg/kg KG: <u>Nachkommen:</u> ♂: AGD ↓ (PND 1); 797 mg/kg KG: <u>Muttertiere:</u> Gestationsdauer ↑; <u>Nachkommen:</u> ♂ u. ♀: KG ↓ (PND 0, PND 7, PND 14, PND 21, PND 28), rel. Lebergew. ↑ (PND 28); ♂: rel. Hodengew. ↓ (PND 28), ♂: Zeit für das Aufrichten in den Vierfüßlerstand aus der Rückenlage ↑ (PND 7), Haltezeit des Vorderpfotengriffs ↓ (PND 10, auch bei 30,6; nicht bei 93,9 u. 291,4 mg/kg KG);	Li et al. 2009

Tab. 1. (Fortsetzung)

Spezies	Exposition	Befunde	Literatur
		keine auffälligen Befunde: Anzahl lebender Nachkommen/Wurf, Geschlechterverhältnis, Nachkommen: ♂ u. ♀: Alter bei Eintritt der Entwicklungsmeilensteine (Loslösung der Ohrmuschel, Durchbruch der Schneidezähne, Augenöffnung), Zeit für das Aufrichten in den Vierfüßlerstand aus der Rückenlage (PND 4), Landung auf vier Füßen nach Rückenlage aus der Luft (PND 16), negative Geotaxis (PND 4 od. PND 7), Cliff Avoidance-Test (PND 7), Verhalten im Open-Field-Test (PND 28); Ergebnisse aus Morris-Water-Maze-Test gegenläufig (räumliches Lernen u. Referenzgedächtnis bei niedrigster Dosis gehemmt, bei höchster Dosis verstärkt)	
Ratte, Wistar, 10 ♀	GD 6–PND 28, 0, 25, 75, 225, 675 mg/ kg KG u. Tag, Schlundsonde, Vehikel: Maiskeimöl	225 mg/kg KG: NOAEL für Fetotoxizität; 675 mg/kg KG: Nachkommen: ♂ u. ♀: KG ↓ (PND 1, PND 21), ♂: rel. AGD (bezogen auf KG) ↓ (PND 1), ♂: rel. Lebergew. ↑ (PND 21); ♂: rel. Hodengew. ↓ (PND 21), ♂: Morris-Water-Maze-Test: Verbesserung der räumlichen Akquisition (PND 30–33), Retention des räumlichen Gedächtnisses ↑ (PND 60–62) (Widerspruch zu Studie von 2009), Hippocampus: mRNA u. Protein BDNF ↑ (PND 21); keine auffälligen Befunde: Anzahl lebender Nachkommen/Wurf, Überleben der Nachkommen, Immunogehalt p-CREB im Hippocampus unverändert	Li et al. 2010

AGD: anogenitaler Abstand; AR: Androgenrezeptor; AQP9: Aquaporin 9; BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor; CIS: Carcinoma in situ; CREB: Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) Response Element-Binding Protein; DES: Diethylstilbestrol; DBP: Di-n-butylphthalat; DEHP: Di-(2-ethylhexyl)phthalat; ER: Östrogenrezeptor; GD: Gestationstag; LABC Muskel: Levator ani-bulbocavernosus Muskel; LH: Luteinisierendes Hormon; PND: Postnataltag; rER: rauhes endoplasmatisches Retikulum; Shh: Sonic Hedgehog; SD: Sprague Dawley; sER: glattes endoplasmatisches Retikulum; SREBP: Sterol Regulatory Element-Binding Protein

Pränatale Behandlung

Die Hoden von Feten männlicher Sprague-Dawley-Ratten, die in utero vom 12. bis zum 20. Gestationstag gegen 0; 0,1; 1; 10; 30; 50; 100 oder 500 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag per Schlundsonde exponiert worden waren, wurden am 21. Gestationstag histopathologisch und morphometrisch untersucht. Ab 30 mg/kg KG und Tag traten eine verminderte Anzahl an Hodenzellen und ab 50 mg/kg KG und Tag ein erniedrigtes Hodenvolumen und eine veränderte Morphometrie (Größe

und Organisation) der Hodenstränge, der Vorläufer der Hodenkanälchen, auf. Für die zeitliche Entwicklung wurden Expositionen mit 0 oder 500 mg/kg KG und Tag ab dem 12. Gestationstag bis zum Tag vor der Untersuchung eingesetzt, und die Hoden der männlichen Feten am 17., 18., 19., 20. und 21. Gestationstag sowie am 1. und 2. Postnataltag untersucht. Bei der einzigen untersuchten Dosis von 500 mg/kg KG und Tag kam es ab dem 19. Gestationstag zu einem erniedrigten Hodenvolumen und einer erniedrigten Zellzahl in den Hoden, wobei sowohl die tubulären als auch die interstitiellen Zellen betroffen waren. Bei dieser Dosis erwiesen sich die verminderte Zellzahl im Hoden und das erniedrigte Hodenvolumen als reversibel. Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass Di-n-butylphthalat reversibel die über die Bromdesoxyuridin-Inkorporation bestimmte Proliferation von somatischen Zellen im Hoden von fetalen Ratten inhibiert. Die mittels der TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase-Mediated Deoxy-UTP Nick Labeling)-Technik erfasste Anzahl apoptotischer Zellen in den Hoden blieb unbeeinträchtigt. Somit ist die verminderte Proliferation mechanistisch eher als die verstärkte Apoptose der Zellen als Erklärung für die verminderte Zellzahl in den Hoden anzusehen. Den Autoren zufolge ist die erniedrigte Zellzahl in den Hoden bei 30 mg/kg KG und Tag transient und normalisiert sich postnatal wieder (Boekelheide et al. 2009). In der Methodenbeschreibung wird von keiner postnatalen Untersuchung der Dosis von 30 mg/kg KG und Tag berichtet und eine Abbildung mit dieser Information ist in der Veröffentlichung nicht beinhaltet. Da die verminderte Anzahl an Hodenzellen bei der höchsten Dosis von 500 mg/kg KG und Tag reversibel ist, kann auch für die geringeren Dosierungen Reversibilität angenommen werden. Die Reversibilität der verminderten Zellzahl wird als Regeneration gewertet und daher als nicht advers angesehen. Als kritischer Effekt verbleibt die veränderte Morphometrie der Hodenstränge ab 50 mg/kg KG und Tag. Am 2. Postnataltag wurde keine morphometrische Untersuchung der Hodenstränge durchgeführt. Daher ist nicht auszuschließen, dass die veränderte Morphometrie verbleiben kann, und es wird ein NOAEL für Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane von 30 mg/kg KG und Tag abgeleitet.

Bei den männlichen Nachkommen der in utero vom 12. bis zum 21. Gestationstag behandelten Sprague-Dawley-Ratten wurden bei 100 mg/kg KG und Tag im Alter von neun, 14 und 17 Wochen erniedrigte relative Hodengewichte und Leydigzellhyperplasie festgestellt. Das Ausmaß der Hodengewichtserniedrigung und der Grad der Leydigzellhyperplasie nahmen zeitabhängig zu. Die Serumkonzentrationen von Testosteron waren bei 100 mg/kg KG und Tag von fünf bis 17 Wochen zeitabhängig erniedrigt. Luteinisierendes Hormon (LH) im Serum hingegen war bei dieser Dosierung nach fünf und sieben Wochen erniedrigt und anschließend erhöht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Leydigzellen ergaben ab dem Alter von neun Wochen bei der höchsten Dosis von 100 mg/kg KG und Tag im Vergleich zu den Kontrolltieren ein vermindertes Auftreten des glatten endoplasmatischen Reticulum (sER) mit nicht-dilatierten Cisternae. Im Alter von 17 Wochen war ein sER lichtmikroskopisch nicht mehr erkennbar (Shirai et al. 2013). Es leitet sich ein NOAEL für Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane von 50 mg/kg KG und Tag ab. Die erniedrigten Testosteronkonzentrationen gehen der Leydigzellhyperplasie voraus, weshalb dies als kompensatorische Antwort zu interpretieren ist. Angaben zur Zytotoxizität fehlen. In einer weiteren Studie ist bei 100 mg/kg KG und Tag das raue endoplasmatische Retikulum (rER) noch nachweisbar (Wakui et al. 2013). Während

das rER für die Energiegewinnung zuständig ist, werden im sER Steroidhormone gebildet. Auch wenn das sER nicht nachweisbar ist, ist die Zelle dennoch lebensfähig, solange das rER nicht beeinträchtigt wird.

Die männlichen Nachkommen von Sprague-Dawley-Ratten, die vom 12. bis zum 21. Gestationstag intraanal mit nur einer Dosis von 100 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag behandelt worden waren, wiesen im Alter von 20 Wochen erniedrigte relative Hodengewichte sowie lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch erfassbare Veränderungen in den Hoden wie Leydigzellhyperplasie auf (Wakui et al. 2013).

Die männlichen Feten von Sprague-Dawley-Ratten, die vom 12. bis zum 19. Gestationstag über das Futter Di-n-butylphthalat erhalten hatten, wiesen ab der niedrigsten Dosis von 112 mg/kg KG und Tag vermehrt Leydigzellen-Cluster, eine erhöhte Anzahl multinukleärer Keimzellen und einen erhöhten Durchmesser der Hodenstränge auf. Die Autoren folgern, dass die Exposition über das Futter im Vergleich zur Schlundsondengabe bei gleichen Dosen zu ähnlichen Antworten bei den männlichen Feten führt (Struve et al. 2009). Ein NOAEL konnte nicht abgeleitet werden.

Die männlichen Nachkommen von Sprague-Dawley-Ratten, die vom 10. bis zum 19. Gestationstag per Schlundsonde behandelt worden waren, wiesen ab der niedrigsten eingesetzten Dosis von 250 mg/kg KG und Tag am 31. Postnataltag eine verzögerte Präputialseparation auf (Kim et al. 2010). Ein NOAEL kann daher nicht abgeleitet werden.

Bei männlichen Wistar-Ratten, die in utero vom 13. bis zum 21. Gestationstag gegen Di-n-butylphthalat per Schlundsonde exponiert waren, war ab 100 mg/kg KG und Tag der anogenitale Abstand, bezogen auf das Körpergewicht, erniedrigt. Bei einem Tier zeigten sich am 21. Gestationstag vermehrt vergrößerte Cluster von Leydigzellen, die mit zunehmender Dosis vermehrt auftraten. Im Erwachsenenalter verblieb die Behandlung mit bis zu 500 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag ohne Effekt auf die Gewichte der männlichen Reproduktionsorgane oder die Anzahl der Spermatozoen pro Hoden. Die gleichzeitige Gabe von 100 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag und 150 mg DEHP/kg KG und Tag führte in den fetalen Hoden zu erniedrigten Testosteronkonzentrationen sowie zu deformierten Hodensträngen und multinukleären Keimzellen, während die gleichen Dosen der Einzelsubstanzen nicht diese Effekte auslösten (Martino-Andrade et al. 2009). Da bei 100 mg/kg KG und Tag nur ein Tier einen vergrößerten Cluster von Leydigzellen aufwies und die Veränderung des anogenitalen Abstands nicht als advers angesehen wird, wird ein NOAEL für Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane von 100 mg/kg KG und Tag abgeleitet. Im Erwachsenenalter wurde keine histologische Untersuchung der Hoden vorgenommen.

In einer Studie an Wistar-Ratten mit Schlundsondengabe wurden nur absolute Organengewichte ermittelt. Angaben zum Körpergewicht und zu den relativen Organengewichten fehlen (Macleod et al. 2010). Weil das Körpergewicht als Confounder für den anogenitalen Abstand gilt, ist es auch bei der Interpretation von Veränderungen des anogenitalen Abstands zu berücksichtigen (US EPA 2005). Daher wird die Studie nicht zur Bewertung herangezogen.

Die Ergebnisse einer Studie an Albino-Ratten (Ahmad et al. 2014) waren nicht konsistent zu den anderen Studien. Eine weitere Erniedrigung des Körpergewichts der Nachkommen 21 Tage nach dem Expositionsende der Muttertiere, die vom 14. Gestationstag bis zum Tag der Geburt exponiert wurden, ist nicht plausibel. Der

erhöhte Prozentsatz der Spermienanomalien wird nicht für die Bewertung herangezogen, da es fraglich ist, ob für die Bestimmung dieses Parameters eine valide Methode verwendet wurde.

Bei männlichen Nachkommen von Sprague-Dawley-Ratten, die per Schlundsonde vom 12. bis zum 20. Gestationstag behandelt worden waren, traten ab 100 mg/kg KG und Tag im Hoden multinukleäre Keimzellen auf. Eine vergleichende Untersuchung an den männlichen Nachkommen von in-utero-behandelten Ratten und Mäusen ergab, dass bei Ratten der Lipidstoffwechselweg, insbesondere der durch SREBP-(Sterol Regulatory Element-Binding Protein) regulierte, vermindert wurde, während er bei Mäusen induziert war. Dies korrelierte auch mit der Repression der Steroidogenese (Johnson et al. 2011).

In einer Studie an in-utero-behandelten männlichen p53-null-Mäusen wurde eine Rolle von p53 an der perinatalen Apoptose von Di-n-butylphthalat-induzierten multinukleären Keimzellen identifiziert. Die In-utero-Behandlung führte an den Keimzellen in den Hoden von Wildtyp-Mäusen bei bis zu 500 mg/kg KG und Tag zu keinen Auffälligkeiten. Hingegen wiesen die Hoden bei fetalen p53-null-Mäusen vermehrt multinukleäre Keimzellen auf, deren Anzahl mit dem Alter abnahm und die am 10. Postnataltag nicht mehr nachweisbar waren (Saffarini et al. 2012). Das Knockout-System ist artifizuell und besitzt daher keine Arbeitsplatzrelevanz.

Prä- und postnatale Behandlung

Die männlichen Nachkommen von Wistar-Ratten, die vom 12. Gestationstag bis zum 21. Postnataltag per Schlundsonde mit 100 mg/kg KG und Tag behandelt worden waren, wiesen am 90. Postnataltag histopathologische Veränderungen in der ventralen Prostata auf (Scarano et al. 2009). Da nur eine Dosis eingesetzt wurde, bei der Effekte auftraten, ist die Angabe eines NOAEL nicht möglich. In einer weiteren Untersuchung der gleichen Arbeitsgruppe am gleichen Rattenstamm und dem gleichen Expositionsschema ergaben sich bei 100 mg/kg KG und Tag Leydigzell-Cluster, vermehrt multinukleäre Keimzellen und vermehrt interstitielles Kompartiment in den fetalen Hoden. Im Erwachsenenalter waren bei dieser Dosis keine Effekte auf die Spermien sowie keine histologischen Effekte auf die Nebenhoden nachweisbar (Scarano et al. 2010). Da die Hoden in beiden Studien am 90. Postnataltag histologisch nicht untersucht wurden, ist keine Aussage über die Reversibilität der histologischen Befunde in den fetalen Hoden möglich.

Bei den männlichen Nachkommen von Wistar-Ratten traten ab 291 mg/kg KG und Tag bei Gabe über das Futter vom 6. Gestationstag bis zum 28. Postnataltag erniedrigte anogenitale Abstände auf. Bei der höchsten Dosis von 797 mg/kg KG und Tag wurden am 7. Postnataltag bei männlichen und weiblichen Nachkommen systemische Toxizität sowie bei männlichen Nachkommen verhaltensbiologische Veränderungen wie eine verlängerte Zeit für das Aufrichten in den Vierfüßlerstand aus der Rückenlage und erniedrigte Haltezeit des Vorderpfotengriffs festgestellt. Während die niedrigste Dosis das räumliche Lernvermögen und das Referenzgedächtnis im Morris-Water-Maze-Test hemmte, wirkte die höchste Dosis verstärkend. Die beiden mittleren Dosierungen hatten bei diesem Test keinen Effekt (Li et al. 2009). Die gegenteiligen Effekte bei niedrigster und höchster Dosierung im Morris-Water-Maze-Test sind nicht plausibel. Das verminderte Lernvermögen bei der niedrigsten

Dosis kann durch vermehrten Stress entstanden sein. Gestresste Tiere erzielen schlechtere Testergebnisse, weshalb zu Stress führende Umweltfaktoren wie Temperatur, Licht und Lärm während des Tests konstant gehalten werden müssen (Bromley-Brits et al. 2011). Der NOAEL für verhaltensbiologische Effekte auf die männlichen Nachkommen lag bei 291 mg/kg KG und Tag.

Beim Morris-Water-Maze-Test zeigten männliche Nachkommen von Wistar-Ratten, die vom 6. Gestationstag bis zum 28. Postnataltag per Schlundsonde 675 mg/kg KG und Tag erhalten hatten, am 30. bis 33. Postnataltag Verbesserungen der räumlichen Akquisition (Erfassung der räumlichen Position) und eine zunehmende Retention des räumlichen Gedächtnisses. Bei dieser Dosierung war das Körpergewicht der männlichen Tiere am 1. Postnataltag um 21% und am 21. Postnataltag um 14% erniedrigt (Li et al. 2010). Aufgrund des erniedrigten Körpergewichts der männlichen Nachkommen am ersten Postnataltag bei 675 mg/kg KG und Tag lässt sich ein NOAEL für Fetotoxizität von 225 mg/kg KG und Tag ableiten. Es erscheint fraglich, ob verbesserte Gedächtnisleistungen erzielt wurden. Die gleiche Arbeitsgruppe hat mit dem Morris-Water-Maze-Test am gleichen Rattenstamm wie in der Studie von 2009 bei der niedrigsten Dosierung mit Futtergabe ebenfalls keine verminderten räumlichen Gedächtnisleistungen gefunden (Li et al. 2009). Aufgrund der Widersprüchlichkeit werden die Ergebnisse des Morris-Water-Maze-Tests nicht zur Bewertung herangezogen.

Eine Studie an Sprague-Dawley-Ratten (Hoshi und Ohtsuka 2009) wird nicht zur Bewertung herangezogen, weil nur jeweils zwei Tiere pro Dosisgruppe eingesetzt und nicht standardisierte Untersuchungen der Fellpflege durchgeführt wurden.

Eine Studie an trächtigen Wistar-Ratten mit einem komplexen Expositionsszenario, einem N-Methyl-N-nitrosoharnstoff (MNU)-Testosteron-Kanzerogen-Protokoll (Peixoto et al. 2015), ist für die Bewertung der entwicklungstoxischen Wirkung von Di-n-butylphthalat nicht relevant.

Xenograft-Experimente mit fetalen Hoden von Mäusen, Ratten und Menschen an immunodefizienten Ratten und Mäusen

Fetale Hodenproben von zwölf humanen Donoren (Spontanaborte in der 14. bis 20. Schwangerschaftswoche) wurden kastrierten männlichen Nacktmäusen xenotransplantiert. Die Empfänger wurden vier oder 21 Tage lang mit dem Vehikel, 500 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag oder Monobutylphthalat per Schlundsonde behandelt. Alle Empfänger wurden mit humanem Choriongonadotropin (hCG) behandelt, um eine humane Schwangerschaft zu imitieren. Als Positivkontrolle dienten Mäuse, die nach der Xenotransplantation von Rattenhoden vier Tage lang gegen Di-n-butylphthalat exponiert wurden. Bei den Mäusen mit den xenotransplantierten Rattenhoden führte die Di-n-butylphthalat-Exposition zu einem reduzierten Gewicht der Samenbläschen, der testikulären Genexpression von *Cyp11a1* und *Star* sowie zu erniedrigten Testosteronkonzentrationen im Serum. Dagegen waren bei den Tieren mit den xenotransplantierten menschlichen Hoden die Testosteronkonzentrationen im Serum und die Gewichte der Samenbläschen nach der Di-n-butylphthalat- und der Monobutylphthalat-Exposition unverändert. Die Genexpression in den menschlichen xenotransplantierten Hoden wurde nicht untersucht (Mitchell et al. 2012).

Fetale Hoden von Fischer-Ratten (16. Gestationstag), C57BL/6NCrl- und CD-1-Mäusen (15. Gestationstag) sowie Hodenstücke (Volumen ca. 1 mm³) von 26 humanen Donoren (Spontanaborte in der 10. bis zur 24. Schwangerschaftswoche) wurden in den renalen subkapsulären Raum von Ratten und Mäusen xenotransplantiert. Als Empfänger dienten adulte männliche immunodefiziente CrI:NIH-Foxn1^{nu}-Nacktratten und BALB/c-Nacktmäuse. Etwa 24 Stunden nach der Operation erhielten die Tiere 0, 100, 250 oder 500 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag in Maiskeimöl einen, zwei oder drei Tage lang per Schlundsonde. Sechs Stunden nach der letzten Behandlung wurden in den xenotransplantierten Hoden histologische und steroidogene Untersuchungen durchgeführt. Di-n-butylphthalat induzierte in den xenotransplantierten Hoden von Ratten, Mäusen und Menschen die Bildung von multinukleären Keimzellen. Eine Erniedrigung der Genexpression von Genen, die für die Regulation der fetalen Testosteronbiosynthese zuständig sind, wie *Cyp11a1* (mitochondriale Cholesterinmonooxygenase), *Cyp17a1* (17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase/17,20 Desmolase), *Scarb1* (Scavenger Receptor Class B Member 1), *Star* (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) und *Ins13* (Insulin-Like-3), wurde nur in den xenotransplantierten Hoden der Ratten festgestellt, nicht jedoch bei denen von Mäusen und Menschen. Die Ex-vivo-Testosteronproduktion in den xenotransplantierten Rattenhoden war nach der Exposition mit Di-n-butylphthalat erniedrigt, während sie in den xenotransplantierten Mäusehoden unverändert blieb. Die Ergebnisse der Ex-vivo-Testosteronproduktion von xenotransplantierten menschlichen Hoden waren sehr variabel. Die Autoren begründen dies damit, dass die menschlichen Xenografts verschiedene Größen aufwiesen und von verschiedenen Teilen des fetalen Hodens stammten sowie einen großen Bereich der Gestationszeit abdeckten (Heger et al. 2012).

Die gleiche Arbeitsgruppe führte einen weiteren Versuch an adulten athymischen männlichen CrI:NU(NCr)-Foxn1^{nu}-Nacktmäusen durch, die kastriert wurden und denen humane fetale Hodenstücke von sieben Donoren (Spontanaborte in der 16. bis 22. Schwangerschaftswoche) in den renalen subkapsulären Raum xenotransplantiert wurden. Die Empfänger wurden anschließend vier Wochen lang mit hCG behandelt, um die Testosteronproduktion zu stimulieren. Danach wurden die Tiere zwei Wochen lang gegen 500 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag oder 75 mg Abirateronacetat, einem CYP17A1-Inhibitor, per Schlundsonde exponiert. Während Abirateronacetat eine starke Erniedrigung der Testosteronkonzentration im Serum und der Gewichte Androgen-sensitiver Organe der Empfänger zur Folge hatte, zeigten sich mit Di-n-butylphthalat keine Effekte auf diese androgenen Endpunkte. Di-n-butylphthalat führte zu einem erhöhten Prozentsatz von multinukleären Keimzellen in den xenotransplantierten Hoden, der an der Grenze zur statistischen Signifikanz war. Abirateronacetat hingegen verblieb auf diesem Endpunkt ohne Effekt. Die Substanz führte weiterhin zu einer erniedrigten Expression von Genen, die für die Transkription und Zelldifferenzierung verantwortlich sind, sowie zu einer verstärkten Expression von Genen, die an der epigenetischen Kontrolle der Genexpression beteiligt sind. Di-n-butylphthalat induzierte die Expression von Genen, die für die oxidative Stressantwort codieren, und verursachte eine veränderte Expression von Genen, die für das Actin-Zytoskelett verantwortlich sind (Spade et al. 2014). Mittels der Positivkontrolle Abirateronacetat, einem CYP17A1-Inhibitor, konnte erstmals ein antiandrogener Effekt in einem Xenograftmodell mit humanen fetalen Hoden

nachgewiesen werden. Di-n-butylphthalat, das wie Abirateronacetat ohne antagonisierende Wirkung auf den Androgenrezeptor Testosteronkonzentrationen erniedrigt, führte jedoch in diesem Testsystem an humanen fetalen Hoden nicht zu einer antiandrogenen Wirkung.

Alle drei beschriebenen Experimente zeigen, dass Di-n-butylphthalat in den menschlichen xenotransplantierten Hoden keine antiandrogenen Effekte zur Folge hat, und dass die Bildung von multinukleären Keimzellen durch Di-n-butylphthalat in den menschlichen xenotransplantierten Hoden unabhängig von einem antiandrogenen Effekt stattfindet.

Di-n-butylphthalat-induzierte multinukleäre Keimzellen werden typischerweise bei Mäusen bis zum 10. Postnataltag (Saffarini et al. 2012) und bei Ratten bis zum 16. Postnataltag eliminiert (Barlow und Foster 2003).

Generationenstudien

In der 2-Generationenstudie mit kontinuierlicher Verpaarung von Sprague-Dawley-Ratten, die bereits in der Begründung 2010 aufgeführt wurde, erhielten die Tiere 0; 0,1; 0,5 oder 1,0% Di-n-butylphthalat im Futter (männliche Tiere: 0, 52, 256, 509 mg/kg KG und Tag, weibliche Tiere: 0, 80, 385, 794 mg/kg KG und Tag). Ab der niedrigsten Dosis von 52 (männliche Tiere) bzw. 80 (weibliche Tiere) mg/kg KG und Tag trat eine dosisabhängig verminderte Anzahl lebender F1-Nachkommen pro Wurf auf (Kontrolle und die drei Dosisgruppen in aufsteigender Dosis: $12,9 \pm 0,2$; $11,9 \pm 0,3$; $11,0 \pm 0,5$; $10,7 \pm 0,4$; prozentuale Abnahme pro Dosisgruppe im Vergleich zur Kontrolle: 7,8%; 14,7%; 17%; statistisch signifikant ab niedrigster Dosis mit Dunnett's Test oder Shirley's Test). Weder die Anzahl lebender F2-Nachkommen noch die Anzahl lebender Nachkommen aus Kreuzpaarungsexperimenten, in denen männliche bzw. weibliche Tiere der hohen Dosisgruppe (509 bzw. 794 mg/kg KG und Tag) jeweils mit Kontrolltieren verpaart wurden, waren erniedrigt. Bei der F2-Generation waren jedoch die Geburtsgewichte verringert (Kontrolle und die drei Dosisgruppen in aufsteigender Dosis: $5,97 \pm 0,11$; $5,60 \pm 0,09$; $5,60 \pm 0,09$; 5,00; d.h. um 6,2%; 6,2% bzw. 16% im Vergleich zur Kontrolle; statistisch signifikant ab niedrigster Dosis mit Chi-Quadrat-Test oder Shirley's Test) (NTP 1995; Wine et al. 1997). Damit beträgt der LOAEL für Fetotoxizität 52 mg/kg KG und Tag für die männlichen und 80 mg/kg KG und Tag für die weiblichen Tiere. Die Dosis entspricht auch dem NOAEL für Parentaltoxizität aufgrund der verminderten relativen Nierengewichte der männlichen F0-Tiere. Der NOAEL für Effekte auf die Fertilität liegt bei 256 mg/kg KG und Tag für die männlichen und 385 mg/kg KG und Tag für die weiblichen Tiere (Begründung 2010).

Aus einer 1-Generationenstudie an der Maus, die bereits in der Begründung 2010 beschrieben wurde, ergab sich ein NOAEL für Parental- und Fetotoxizität und Effekte auf die Fertilität von 420 mg/kg KG und Tag. In dieser Studie sowie in Fertilitätsstudien mit weiblichen Mäusen waren bei 1410 mg/kg KG und Tag die Fertilität und die Zahl lebender Nachkommen verringert (NTP 1995).

Zusammenfassung

In der Begründung 2010 wurde zur Bewertung der fruchtschädigenden Wirkung von Di-n-butylphthalat am Arbeitsplatz aus Studien mit ausschließlich pränataler

Exposition und postnataler Untersuchung ein NOAEL für die Retention der Areola oder Brustwarzen von 50 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag (LOAEL von 100 mg/kg KG und Tag) bei Sprague-Dawley-Ratten herangezogen (Mylchreest et al. 2000). In einer seither veröffentlichten Publikation trat bei Sprague-Dawley-Ratten nach In-utero-Exposition vom 12. bis zum 20. Gestationstag ab 50 mg/kg KG und Tag eine veränderte Morphometrie (Größe und Organisation) der Hodenstränge, der Vorläufer der Hodenkanälchen, auf (Boekelheide et al. 2009). Damit ist der empfindlichste Endpunkt nach pränataler Exposition nicht mehr die Retention der Areola oder Brustwarzen, sondern eine veränderte Morphometrie der Hodenstränge von männlichen Feten. Der NOAEL für Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane liegt bei 30 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag.

In zwei Studien an Mäusen, die bereits in der Begründung 2010 beschrieben wurden, führte Di-n-butylphthalat ab 250 mg/kg KG und Tag zu morphologischen Veränderungen des Keimepithels und ab 400 mg/kg KG und Tag zu erhöhten Inzidenzen externer Missbildungen bei den männlichen Nachkommen (ECB 2003; Gaido et al. 2007). Als NOAEL für Entwicklungstoxizität und Maternaltoxizität lässt sich eine Dosis von 100 mg/kg KG und Tag ableiten (ECB 2003). Laut ECB (2003) liegt die Studienbeschreibung nur als Zusammenfassung vor. Aufgrund der fehlenden Informationen zu Methodik und einer detaillierten Ergebnisdarstellung wird die Studie nicht zur Bewertung herangezogen.

Bei der Interpretation der Unterschiede der Phthalat-induzierten Effekte zwischen den Spezies sind auch folgende Punkte zu berücksichtigen: (i) die großen Unterschiede zwischen den Säugetierspezies in der Organisation, Struktur und Biologie des interstitiellen Hodenkompartiments, (ii) mögliche altersabhängige Empfindlichkeitsbereiche während der Fetalzeit und nach der Geburt, die zwischen den Spezies variieren (iii) der intrinsische Unterschied zwischen den Spezies beim zeitlichen Timing der Hodenentwicklung (Albert und Jégou 2014).

Die Ratte hat sich als die empfindlichste Tierspezies für die Di-n-butylphthalat-induzierten Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane erwiesen (Johnson et al. 2012; Kay et al. 2014). Aufgrund der genannten Speziesunterschiede werden Bedenken über die Extrapolation der Daten aus Versuchen an Nagern auf den Menschen geäußert (Habert et al. 2014; Kay et al. 2014).

Bewertung

Fruchtschädigende Wirkung. Der empfindlichste entwicklungstoxikologische Endpunkt wurde bei Ratten nach pränataler Exposition, eine veränderte Morphometrie der Hodenstränge (Größe und Organisation), der Vorläufer der Hodenkanälchen, ab 50 mg/kg KG und Tag beobachtet (Boekelheide et al. 2009). Der NOAEL für Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane lag bei 30 mg Di-n-butylphthalat/kg KG und Tag. Teratogene Effekte wie Hypospadie und unterentwickelte oder fehlende Nebenhoden traten bei Ratten ab 250 mg/kg KG und Tag auf (Mylchreest et al. 1998, 1999). Der NOAEL betrug 100 mg/kg KG und Tag (Mylchreest et al. 1999).

In einer 2-Generationenstudie mit Sprague-Dawley-Ratten waren ab der niedrigsten Dosis von 52 bzw. 80 mg/kg KG und Tag die Geburtsgewichte um 5 bis 8% verringert (NTP 1995; Wine et al. 1997). Damit betrug der LOAEL für Fetotoxizität 52 mg/kg KG und Tag für die männlichen und 80 mg/kg KG und Tag für die weiblichen Tiere. Der NOAEL für verhaltensbiologische Effekte auf die männlichen Nachkommen von prä- und postnatal behandelten Wistar-Ratten lag bei 291 mg/kg KG und Tag (Li et al. 2009).

Aus einer 1-Generationenstudie an der Maus ergab sich ein NOAEL für Fetotoxizität von 420 mg/kg KG und Tag. Bei 1410 mg/kg KG und Tag war die Zahl lebender Nachkommen verringert (NTP 1995).

Nach oraler Gabe an Nager werden schnell ab 60 bis zu mehr als 90% Di-n-butylphthalat aufgenommen (Begründung 2010). Daher wird für Ratten und Mäuse eine orale Aufnahme von 60% als Worst-Case angenommen. Zur toxikokinetischen Übertragung der NOAEL bzw. des LOAEL für pränatale Effekte auf die männlichen Reproduktionsorgane, Teratogenität oder Fetotoxizität in eine Konzentration in der Luft am Arbeitsplatz werden berücksichtigt: die den toxikokinetischen Unterschieden zwischen Ratte bzw. Maus und dem Menschen entsprechenden speziesspezifischen Korrekturwerte (1:4 bzw. 1:7), die angenommene orale Resorption von 60%, das Körpergewicht (70 kg) und das Atemvolumen (10 m³) des Menschen sowie die angenommene 100%ige inhalative Resorption. Die damit errechneten Konzentrationen und Abstände zum MAK-Wert von 0,58 mg/m³ sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Damit sind die Abstände der berechneten NOAEC für Entwicklungstoxizität und Fetotoxizität bzw. LOAEC für Fetotoxizität ausreichend groß, und die Zuordnung von Di-n-butylphthalat zur Schwangerschaftsgruppe C wird bestätigt.

Tab. 2. Bewertungsrelevante NOAEL von Ratte und Maus, toxikokinetische Umrechnung der NOAEL in eine Luftkonzentration und die sich daraus ergebenden Abstände zum MAK-Wert von 0,58 mg/m³

Literatur	Spezies, Exposition	NOAEL: Endpunkt	Toxikokinetische Umrechnung ^{a)} (mg/kg KG)	Abstand zum MAK-Wert von 0,58 mg/m ³
Ratte				
Boekelheide et al. 2009	pränatal, oral	30 mg/kg KG u. d: ♂ Reproduktionsorgane	32 107	55 183
Mylchreest et al. 1999		100 mg/kg KG u. d: Teratogenität		
NTP 1995; Wine et al. 1997	prä- u. postnatal, oral	LOAEL: 80 mg/kg KG u. d: Fetotoxizität, kein NOAEL	84	145
Maus				
NTP 1995	prä- u. postnatal, oral	420 mg/kg KG u. d: Fetotoxizität	252	435

^{a)} (1:4 oder 1:7)×0,6 (orale Resorption Tier)/1,0 (inhalative Resorption Mensch)

Literatur

- Ahmad R, Gautam AK, Verma Y, Sedha S, Kumar S (2014) Effects of in utero di-butyl phthalate and butyl benzyl phthalate exposure on offspring development and male reproduction of rat. *Environ Sci Pollut Res Int* 21: 3156–3165
- Albert O, Jégou B (2014) A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood. *Hum Reprod Update* 20: 231–249
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2001) Toxicological profile for di-n-butylphthalate. Update, US Department of Health & Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, USA, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp135.pdf>
- Barlow NJ, Foster PMD (2003) Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Pathol* 31: 397–410
- Bromley-Brits K, Deng Y, Song W (2011) Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp* 53: e2920, 1–5
- Boekelheide K, Kleymenova E, Liu K, Swanson C, Gaido KW (2009) Dose-dependent effects on cell proliferation, seminiferous tubules, and male germ cells in the fetal rat testis following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Microsc Res Tech* 72: 629–638
- Carran M, Shaw IC (2012) New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphthalate is associated with an increased incidence of cryptorchidism, hypospadias and breast cancer in their children. *N Z Med J* 125: 52–63
- ECB (European Chemicals Bureau) (2003) European Union Risk Assessment Report: Dibutyl phthalate. With Addendum 2004. 1s* Priority List, Vol. 29, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, EUR 19840 EN, 2003, <http://echa.europa.eu/documents/10162/fcd6797a-395c-4f40-83b5-38653200f6cb>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2016) Information on Registered Substances. Dataset on dibutyl phthalate (CAS Number 84-74-2), joint submission, first publication 17.02.2011, last modification 06.01.2016, <http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals>
- Elwood M, Borman B (2012) Increases in disease in Malayan war veterans' children may be misleading. *N Z Med J* 125: 145–146
- EU (2011) EU-VERORDNUNG Nr. 143/2011 DER KOMMISSION vom 17. Februar 2011 zur Änderung von Anhang XIV der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), http://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de/de/Downloads/VO-Gesetze/VO_EU_143_2011-Anhang-XIV.pdf?__blob=publicationFile&v=2
- Gaido KW, Hensley JB, Liu D, Wallace DG, Borghoff S, Johnson KJ, Hall SJ, Boekelheide K (2007) Fetal mouse phthalate exposure shows that gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 97: 491–503
- Habert R, Muczynski V, Grisin T, Moison D, Messiaen S, Frydman R, Benachi A, Delbes G, Lam-brot R, Lehraiki A, N'tumba-Byn T, Guerquin MJ, Levacher C, Rouiller-Fabre V, Livera G (2014) Concerns about the widespread use of rodent models for human risk assessments of endocrine disruptors. *Reproduction* 147: R119–129
- Heger NE, Hall SJ, Sandrof MA, McDonnell EV, Hensley JB, McDowell EN, Martin KA, Gaido KW, Johnson KJ, Boekelheide K (2012) Human fetal testis xenografts are resistant to phthalate-induced endocrine disruption. *Environ Health Perspect* 120: 1137–1143
- Hoshi H, Ohtsuka T (2009) Adult rats exposed to low-doses of di-n-butyl phthalate during gestation exhibit decreased grooming behavior. *Bull Environ Contam Toxicol* 83: 62–66
- Johnson KJ, McDowell EN, Viereck MP, Xia JQ (2011) Species-specific dibutyl phthalate fetal testis endocrine disruption correlates with inhibition of SREBP2-dependent gene expression pathways. *Toxicol Sci* 120: 460–474

- Johnson KJ, Heger NE, Boekelheide K (2012) Of mice and men (and rats): phthalate-induced fetal testis endocrine disruption is species-dependent. *Toxicol Sci* 129: 235–248
- Kay VR, Bloom MS, Foster WG (2014) Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in males. *Crit Rev Toxicol* 44: 467–498
- Kim TS, Jung KK, Kim SS, Kang IH, Baek JH, Nam HS, Hong SK, Lee BM, Hong JT, Oh KW, Kim HS, Han SY, Kang TS (2010) Effects of in utero exposure to Di(n-Butyl) phthalate on development of male reproductive tracts in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A* 73: 1544–1559
- Li Y, Zhuang M, Li T, Shi N (2009) Neurobehavioral toxicity study of dibutyl phthalate on rats following in utero and lactational exposure. *J Appl Toxicol* 29: 603–611
- Li Y, Li T, Zhuang M, Wang K, Zhang J, Shi N (2010) High-dose dibutyl phthalate improves performance of F1 generation male rats in spatial learning and increases hippocampal BDNF expression independent on p-CREB immunoccontent. *Environ Toxicol Pharmacol* 29: 32–38
- Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M, Fiskin M, Scott HM, Hutchison GR, Drake AJ, van den Driesche S (2010) Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl* 33: 279–287
- Martino-Andrade AJ, Morais RN, Botelho GG, Muller G, Grande SW, Carpentieri GB, Leo GM, Dalsenter PR (2009) Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. *Int J Androl* 32: 704–712
- McBride D, Schep L (2012) Comment on Carran and Shaw's "New Zealand Malayan war veterans' exposure to dibutylphthalate" article. *N Z Med J* 125: 105–106
- Mitchell RT, Childs AJ, Anderson RA, van den Driesche S, Saunders PT, McKinnell C, Wallace WH, Kelnar CJ, Sharpe RM (2012) Do phthalates affect steroidogenesis by the human fetal testis? Exposure of human fetal testis xenografts to di-n-butyl phthalate. *J Clin Endocrinol Metab* 97: E341–348
- Mylchreest E, Cattley RC, Foster PMD (1998) Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: An antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci* 43: 47–60
- Mylchreest E, Sar M, Cattley RC, Foster PMD (1999) Disruption of androgen-regulated male reproduction development by di(n-butyl) phthalate during gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 156: 81–95
- Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster PMD (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
- NICNAS (National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme) (2013) Diethylhexyl Phthalate, Existing Chemical Hazard Assessment Report, November 2013, Australian Government, Department of Health and Ageing, NICNAS, Sydney, Australia, https://www.nicnas.gov.au/_data/assets/word_doc/0017/8324/PEC36-Dibutyl-Phthalate-DBP.docx
- NTP (National Toxicology Program) (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. NIH Publication 95-3353. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
- Peixoto AR, Santos TM, Brandt JZ, Delella FK, Gonçalves BF, Campos SG, Taboga SR, Favaro WJ, Domeniconi RF, Scarano WR (2015) Gestational and lactational exposition to Di-n-butylphthalate (DBP) increases inflammation and preneoplastic lesions in prostate of wistar rats after carcinogenic N-methyl-N-nitrosourea (MNU) plus testosterone protocol. *Environ Toxicol*, doi: 10.1002/tox.22126
- Saffarini CM, Heger NE, Yamasaki H, Liu T, Hall SJ, Boekelheide K (2012) Induction and persistence of abnormal testicular germ cells following gestational exposure to di-(n-butyl) phthalate in p53-null mice. *J Androl* 33: 505–513
- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, de Campos SG, Júnior LA, Felisbino SL, Anselmo-Franci JA, Taboga SR, Kempinas WG (2009) Long-term effects of developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicology* 262: 215–223

- Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, Pinheiro PF, Domeniconi RF, Felisbino SL, Campos SG, Taboga SR, Kempinas WG (2010) Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation. *J Toxicol Environ Health A* 73: 972–984
- Shirai M, Wakui S, Wempe MF, Mutou T, Oyama N, Motohashi M, Takahashi H, Kansaku N, Asari M, Hano H, Endou H (2013) Male Sprague-Dawley rats exposed to in utero di(n-butyl) phthalate: dose dependent and age-related morphological changes in Leydig cell smooth endoplasmic reticulum. *Toxicol Pathol* 41: 984–991
- Spade DJ, Hall SJ, Saffarini CM, Huse SM, McDonnell EV, Boekelheide K (2014) Differential response to abiraterone acetate and di-n-butyl phthalate in an androgen-sensitive human fetal testis xenograft bioassay. *Toxicol Sci* 138: 148–160
- Struve MF, Gaido KW, Hensley JB, Lehmann KP, Ross SM, Sochaski MA, Willson GA, Dorman DC (2009) Reproductive toxicity and pharmacokinetics of di-n-butyl phthalate (DBP) following dietary exposure of pregnant rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86: 345–354
- US EPA (US Environmental Protection Agency) (2005) Final detailed review paper on in utero/lactational protocol. EPA Contract Number 68-W-01-023 Work Assignments 1-8 and 2-8, US EPA, Washington, DC, USA, <http://archive.epa.gov/scipoly/sap/meetings/web/pdf/iuldrp.pdf>
- Wakui S, Takahashi H, Mutou T, Shirai M, Jutabha P, Anzai N, Wempe MF, Kansaku N, Hano H, Inomata T, Endou H (2013) Atypical Leydig cell hyperplasia in adult rats with low T and high LH induced by prenatal Di(n-butyl) phthalate exposure. *Toxicol Pathol* 41: 480–486
- Wine RN, Li LH, Hommel Barnes L, Gulati DK, Chapin RE (1997) Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect* 105: 102–107

abgeschlossen am 08.10.2015