

小児用玩具に使用されるフタル酸エステル代替可塑剤の毒性影響

平田睦子[#], 高橋美加, 松本真理子, 川村智子, 小野 敦, 広瀬明彦

Toxicity effects of phthalate substitute plasticizers used in toys

Mutsuko Hirata-Koizumi[#], Mika Takahashi, Mariko Matsumoto, Tomoko Kawamura, Atsushi Ono and Akihiko Hirose

Phthalate esters are widely used as plasticizers in polyvinyl chloride products. Because of human health concerns, regulatory authorities in Japan, US, Europe and other countries control the use of di(2-ethylhexyl) phthalate, diisononyl phthalate, di-*n*-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate, diisodecyl phthalate and di-*n*-octyl phthalate for the toys that can be put directly in infants' mouths. While these regulatory actions will likely reduce the usage of phthalate esters, there is concern that other plasticizers that have not been sufficiently evaluated for safety will be used more frequently. We therefore collected and evaluated the toxicological information on di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT), 1,2-cyclohexanedicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH), diisononyl adipate (DINA), 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB), tri-*n*-butyl citrate (TBC) and acetyl tri-*n*-butyl citrate (ATBC) which were detected at a relatively high frequency in toys. The collected data have shown that chronic exposure to DEHT affects the eye and nasal turbinate, and DINCH exerts effects on the thyroid and kidney in rats. DINA and TXIB have been reported to have hepatic and renal effects in dogs or rats, and ATBC slightly affected the liver in rats. The NOAELs for repeated dose toxicity are relatively low for DINCH (40 mg/kg bw/day) and TXIB (30 mg/kg bw/day) compared with DEHT, DINA and ATBC. DEHT, TXIB and ATBC have been reported to have reproductive/developmental effects at relatively high doses in rats. For DINA and TBC, available data are insufficient for assessing the hazards, and therefore, adequate toxicity studies should be conducted. In the present review, the toxicity information on 6 alternatives to phthalate plasticizers is summarized, focusing on the effects after oral exposure, which is the route of most concern.

Keywords: Phthalate substitute, Plasticizer, Toxicological information

はじめに

フタル酸エステル類は、ポリ塩化ビニル製品の可塑剤として広く使用されている。しかし、フタル酸エステル類のうち、di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) や diisononyl phthalate (DINP) などは、実験動物を用いた毒性試験において、肝毒性や生殖・発生毒性を示すことが明らかになっている¹⁻³⁾。これらの影響は実際の暴露レベルでも

引き起こされる可能性が指摘されており、特にポリ塩化ビニル製のおしゃぶりやガラガラなどの玩具を直接口に入れる乳幼児の健康への影響が懸念されてきた^{4,5)}。そのため、欧州や米国をはじめとする各国で、フタル酸エステル類の小児用玩具への使用が規制されている⁶⁻⁸⁾。わが国では、平成14年以降、食品衛生法により、厚生労働大臣が指定する玩具（指定玩具）について、DEHP及びDINPの使用が制限されてきたが⁹⁾、さらに、平成22年9月の告示改正により、規制対象のフタル酸エステルがこれまでの2物質に、di-*n*-butyl phthalate (DBP), butylbenzyl phthalate (BBP), diisodecyl phthalate (DIDP) 及び di-*n*-octyl phthalate (DNOP) を加えた6物質とされた¹⁰⁾。

これらの規制に伴い、小児用玩具へのフタル酸エステ

[#] To whom correspondence should be addressed:

Mutsuko Hirata-Koizumi; Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext.570; Fax: +81-3-3700-1408; E-mail: mkoizumi@nihs.go.jp

ル類の使用量が世界的に減少していると予測されるが、一方で、安全性が十分に評価されていない他の代替可塑剤の使用が促進される可能性も懸念される。実際に、最近わが国で市販されているポリ塩化ビニル製の指定玩具に使用されている可塑剤は、主に2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB), acetyl tri-*n*-butyl citrate (ATBC), diisononyl adipate (DINA), di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT), 1,2-cyclohexanedicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH), tri-*n*-butyl citrate (TBC) 等であり、フタル酸エステル類は使用されていないことが報告されている¹¹⁾。そこで、我々は、市販のポリ塩化ビニル製指定玩具から検出された可塑剤のうち、検出頻度が比較的高かった6物質 (DEHT, DINCH, DINA, TXIB, TBC, ATBC) について、最も懸念される暴露経路である経口暴露による毒性影響に関する情報を収集・整理し、各々の物質ごとに毒性評価を行った。

1. Di(2-ethylhexyl) terephthalate

Di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT, CAS No. 6422-86-2) は、ベンゼン環のpara位に2個のカルボキシル基が結合したterephthalic acidと2-ethylhexanolとのジエステル体であり (Fig.1), 二つの2-ethylhexanolがオルト位のカルボキシル基にエステル結合したDEHPの構造異性体である。DEHTの毒性については、体内動態, 急性毒性, 反復投与毒性, 遺伝毒性, 発がん性及び生殖・発生毒性に関する情報が以下の通り報告されている。

100 mg/kg bwのDEHTをSDラットに強制経口投与した結果、糞中及び尿中への速やかな排泄が認められ、糞中からは主としてDEHTの未変化体 (投与量の約40%) が、尿中からはterephthalic acid (投与量の約50%) の他、DEHT, 2-ethylhexanol及びmono(2-ethylhexyl) terephthalateの酸化代謝物、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体などが検出された^{12,13)}。DEHTをSDラットから調製した腸ホモジネートとインキュベートさせた結果、DEHTは2-ethylhexanol及びterephthalic acidへ加水分解し、半減期は53.3分と算出された¹²⁾。

ラット及びマウスに単回経口投与した急性毒性試験では、それぞれ5000 mg/kg bw及び3200 mg/kg bwの用量まで死亡は観察されなかった¹⁴⁾。ラットを用いた90日間混餌投与試験においても1.0% (561 mg/kg bw/day) の用量まで明確な毒性影響は認められなかった¹⁵⁾。一方、F344ラットに0.15, 0.6もしくは1.2%のDEHTを104週間混餌投与した試験では、0.6%以上の投与群で網膜外顆粒層の消失の発現頻度もしくは重篤度が増加し、1.2%投与群では強膜血管壁の鈣質沈着の発現頻度も増加した¹⁶⁾。さらに、1.2%投与群では肝臓門脈域のリンパ球集簇 (portal lymphoid foci) 及び鼻甲介の好酸性封入体の発現頻度が増加した。

*Salmonella typhimurium*を用いた復帰突然変異試験, チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞を用いた遺伝子突然変異試験 (HPRT試験) 及び染色体異常試験の結果は、代謝活性化の有無にかかわらずいずれも陰性であった¹⁷⁾。

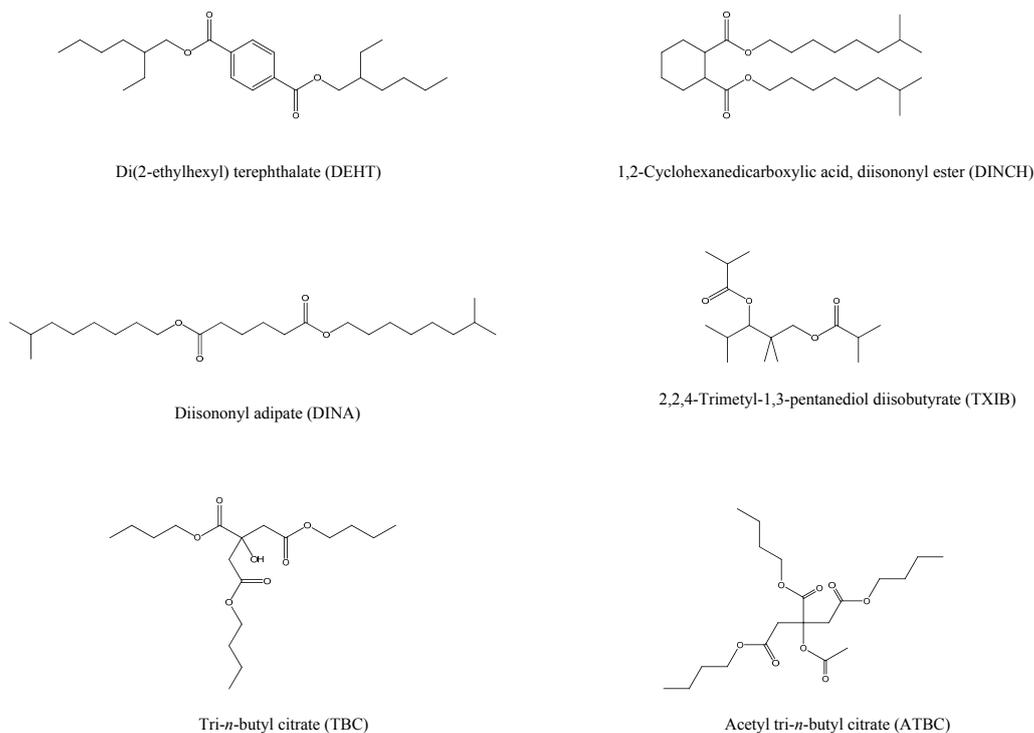


Fig.1 Chemical structures of phthalate substitute plasticizers

2000 mg/kg bw/dayのDEHTを15日間強制経口投与したラットから採取した尿について*Salmonella typhimurium*を用いた復帰突然変異試験を実施した結果、S9 mixや β -glucuronidase及びaryl sulfatase添加の有無に関わらず、突然変異頻度の増加はみられなかった¹⁸⁾。上述のラットを用いた104週間混餌投与試験では、いずれの臓器にも腫瘍性病変は観察されなかった¹⁶⁾。

CD(SD)IGS BRラットに0.3, 0.6もしくは1.0%のDEHTを含む餌を与えた2世代繁殖毒性試験では、1.0%投与群のF0雌動物3/30匹及びF1雌動物7/30匹が児の離乳後2~8日に死亡もしくは瀕死状態となった¹⁹⁾。さらに、0.6%以上の投与群においてF0もしくはF1親動物の体重への影響が認められたが、性周期、精子検査結果、交配率、受胎率、生殖器の重量及び病理所見への影響はみられなかった。出生児数や児の生存率にも変化はみられなかったが、0.6%以上の投与群では児の体重が低値を示し、生後21日の剖検時には脾臓及び胸腺の相対重量の低下が認められた。CD(SD)IGS BRラットの妊娠0日から20日に0.3, 0.6もしくは1.0%のDEHTを混餌投与した試験では、最高用量群において母動物の体重増加抑制が認められ、痕跡状過剰肋骨（第14肋骨）を有する胎児の割合が軽度増加した²⁰⁾。黄体数、着床数、生存胎児数、胎児重量、着床前胚損失率、早期吸収及び後期吸収の発生率、児の性比及び奇形発現率に影響はみられなかった。CD1(ICR) マウスを用いた発生毒性試験（妊娠0から18日に0.1~0.7%の濃度で混餌投与）では、発生パラメータへの影響は認められなかった²⁰⁾。また、SDラットの妊娠14日から哺育3日まで750 mg/kg bw/dayのDEHTを強制経口投与した試験では、雄児の生殖器発達への影響はみられなかった²¹⁾。

以上の報告から、DEHTの急性経口毒性は弱い【経口LD₅₀: > 5000 mg/kg bw (ラット), >3200 mg/kg bw (マウス)】と考えられた。DEHTの反復投与毒性に関しては、ラットを用いた慢性毒性試験において、肝臓、眼及び鼻甲介への影響が観察されており、これらの影響を基に無毒性量は0.15% (102 mg/kg bw/day) と判断された。DEHTは各種の*in vitro*遺伝毒性試験において陰性結果を示したことが報告されているが、*in vivo*遺伝毒性試験の報告はなかった。上述の慢性毒性試験の結果から、DEHTは少なくともラットでは発がん性を示さないと結論された。生殖毒性に関しては、ラットを用いた2世代繁殖毒性試験において、生殖系への影響が認められなかったことから、最高用量である1.0% (447 mg/kg bw/day) が無毒性量として適切と考えられた。発生毒性に関しては、ラットの妊娠期に投与した試験において、痕跡状過剰肋骨の発現率が増加したが、軽度の変化であり、一過

性の変化と考えられることから、有害影響ではないと判断した。DEHTの発生毒性に関する無毒性量は、上述の2世代繁殖毒性試験で観察された児の体重や器官重量への影響を基に、0.3% (182 mg/kg bw/day) が適切と判断された。DEHTの生殖・発生毒性試験では、フタル酸エステル類について報告されているような精巣毒性、催奇形性や雄児の生殖器発達への影響²⁾は認められなかった。上述の通り、DEHTはDEHPの構造異性体であるが、DEHPが消化管内で活性代謝物と考えられているモノエステル体に加水分解される²²⁾のに対し、DEHTはモノ体をほとんど生成せずに2-ethylhexanolとterephthalic acidに加水分解されるため、DEHPとは異なる毒性プロファイルを示したものと考えられた。

2. 1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, diisononyl ester

1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH, CAS No. 166412-78-8, 474914-59-0) は、DINPの水素付加体である (Fig.1)。DEHPやDINPに代わるポリ塩化ビニル用可塑剤として、BASFにより開発された⁴⁾。DINCHの毒性に関しては、BASFが多くの試験を行っており、体内動態、急性毒性、反復投与毒性、遺伝毒性、発がん性及び生殖・発生毒性について、以下の情報が報告されている。

Wistarラットに¹⁴Cで標識したDINCH (¹⁴C-DINCH) 20 mg/kg bwを強制経口投与した結果、48時間後までに57~58%が糞中に排泄され、28~30%が尿中に排泄された²³⁾。一方、1000 mg/kg bwを投与した群では、84~93%が糞中に排泄され、尿中排泄率はおよそ5%であった。¹⁴C-DINCH (20もしくは1000 mg/kg bw) を強制経口投与したWistarラットの糞中からは主にDINCHの未変化体が検出され、尿中からは主に1,2-cyclohexanedicarboxylic acidが検出された²³⁾。

Wistarラットに5000 mg/kg bwのDINCHを単回強制経口投与した結果、死亡や一般状態の変化は観察されなかった²⁴⁾。反復投与毒性に関しては、WistarラットにDINCHを混餌投与した、28日間、90日間及び2年間反復投与毒性試験と2世代繁殖毒性試験が行われている^{23, 24)}。28日間試験（投与量: 0.06, 0.3, 1.5%）では、1.5%投与群の雄に尿中変性上皮細胞数の増加がみられ、同投与群の雌では血清中の γ -グルタミルトランスフェラーゼ (glutamyl transferase: GTP) 活性の増加と総ビリルビン濃度の低下が認められた。90日間試験（投与量: 0.15, 0.45, 1.5%）では、0.45及び1.5%投与群の雄に尿中血液及び変性移行上皮細胞数の増加がみられ、1.5%投与群の雌では血中 γ -GTP及び甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone: TSH) レベルの増加が認め

られた。1.5%投与群では甲状腺の相対重量が増加し、0.15%以上の投与群の雄及び1.5%投与群の雌では濾胞上皮肥大/過形成の発現頻度が増加した。0.15%以上の投与群の雄及び1.5%投与群の雌では相対腎重量の増加が認められ、0.45及び1.5%投与群の雄では $\alpha_2\mu$ グロブリン蓄積（腎皮質の近位尿細管上皮及び尿細管内腔）の重篤度が増加した。その他に、0.45及び1.5%投与群において相対肝重量の増加が認められたが、肝臓の病理組織学所見に変化はみられなかった。2年間混餌投与試験（投与量：40, 200, 1000 mg/kg bw/day）では、1000 mg/kg bw投与群において、血中総ビリルビンの低下とアルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase: ALP）及び γ -GTP活性の増加がみられ、200 mg/kg bw以上の投与群の雄に尿沈渣中の変性移行上皮細胞、顆粒円柱及び上皮細胞性円柱の増加が認められた。200及び1000 mg/kg bw投与群では肝臓及び甲状腺の相対重量が増加し、甲状腺濾胞上皮腺種の発現率が増加した。1000 mg/kg bw投与群ではさらに甲状腺濾胞細胞の過形成の発現率も増加した。2世代繁殖毒性試験（投与量：100, 300, 1000 mg/kg bw/day）では、300及び1000 mg/kg bw投与群において血中 γ -GTPの増加、総ビリルビンの低下及び相対肝重量の増加が認められた。100 mg/kg bw以上の投与群の雌雄に相対腎重量の増加がみられ、300及び1000 mg/kg bw投与群の雄に尿細管上皮空胞化が観察された。さらに、1000 mg/kg bw投与群の雌では甲状腺の相対重量が増加し、用量依存的な濾胞上皮の肥大/過形成の増加が認められた。

*Salmonella typhimurium*及び*Escherichia coli*を用いた復帰突然変異試験、チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた遺伝子突然変異試験（HPRT試験）及びチャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞（V79）を用いた染色体異常試験の結果は、代謝活性化の有無にかかわらずいずれも陰性であった²⁴⁾。NMRIマウスに500~2000 mg/kg bwのDINCHを腹腔内投与した*in vivo*骨髄小核試験では、小核の誘発はみられなかった²⁴⁾。

上述の2世代繁殖毒性試験では、性周期、精子パラメータ、交配及び受胎率、出産児数、児の生存率、体重及び性成熟への影響はみられなかった²⁴⁾。Wistarラットの妊娠6日から19日に200~1200 mg/kg bw/dayのDINCHを強制経口投与した発生毒性試験及びHimalayanウサギの妊娠6日から29日に102~1029 mg/kg bw/dayのDINCHを混餌投与した試験では、黄体数、着床数、着床前/着床後損失、吸収数及び生存胎児数、胎児重量や外表、内臓及び骨格奇形/変異の発症率に影響はみられなかった²⁴⁾。さらに、Wistarラットの妊娠3日から出産後20日まで750もしくは1000 mg/kg bw/dayを強制経口投与した試験でも、出産児数、児の生存率、体重及び性成熟の他、成熟後の精巢の病理所見や精子の運動性にも影響はみら

れなかった²⁴⁾。

以上の報告から、DINCHの急性経口毒性は弱い【経口LD₅₀: > 5000 mg/kg bw (ラット)】と考えられた。反復投与毒性に関しては、ラットを用いた混餌投与試験において、肝臓、甲状腺及び腎臓への影響が観察された。肝臓では、病理組織学的変化を伴わない器官重量の増加が認められ、関連する変化として血中 γ -GTP活性の増加と血中総ビリルビン濃度の低下が認められた。DINCHはグルクロン酸転移酵素をはじめとする各種の肝薬物代謝酵素活性の誘導を引き起こすことが報告されている²⁴⁾ことから、これらの変化は薬物代謝酵素活性の誘導に伴って引き起こされたものと考えられた。甲状腺では濾胞上皮肥大/過形成が引き起こされ、90日試験では血中TSHレベルの増加も認められた。DINCHを投与したWistarラットでは、過塩素酸カリウム投与による甲状腺から血中へのヨウ素の放出は認められなかったことが報告されている²⁴⁾。従って、DINCHはフェノバルビタールと同様に甲状腺ホルモンの分解を亢進させることにより血中TSHレベルを増加させ、甲状腺肥大/過形成を引き起こした可能性が考えられた。腎臓への影響としては、雄ラットにおいて、尿中の変性上皮細胞、上皮細胞性円柱、顆粒円柱の増加や尿細管上皮の空胞化が観察された。90日間試験では、尿細管に雄ラットに特異的な $\alpha_2\mu$ グロブリンの蓄積が用量依存的に認められたことから、DINCHによる腎臓への影響は、ヒトに外挿できないメカニズムで引き起こされた可能性がある。しかし、90日間試験や2世代繁殖毒性試験では、雌動物でも腎重量の増加が認められたことから、DINCHがヒトの腎臓に影響を与える可能性を否定することはできないと考えられた。DINCHの反復投与毒性に関する無毒性量は、2年間混餌投与試験の結果から40 mg/kg bw/dayと判断された。DINCHは、各種の*in vitro*及び*in vivo*遺伝毒性試験において陰性結果を示した。発がん性に関しては、ラットにおいて甲状腺濾胞上皮腺腫が引き起こされたことが報告されているが、上述の通り、DINCHは、肝薬物代謝酵素活性を誘導して甲状腺ホルモンの分解を亢進させることにより、甲状腺に影響を及ぼす可能性が考えられた。ヒトは甲状腺ホルモンレベルの変動に対して比較的強い抵抗性を示し、甲状腺ホルモンレベルの減少に起因するTSHの誘導はヒトでは起きにくいことが知られている²⁵⁾。そのため、この発がん性試験で認められた甲状腺腺腫のヒトへの外挿性には疑問がある。ラットを用いた2世代繁殖毒性試験、ラット及びウサギを用いた発生毒性試験では、生殖・発生毒性はみられなかったことから、生殖・発生毒性に関する無毒性量は1000 mg/kg bw/dayが適切と考えられた。

3. Diisononyl adipate

Diisononyl adipate (DINA, CAS No. 33703-08-1) は、isononyl alcohol と adipic acid のジエステル体である (Fig.1)。DINAの毒性については、急性毒性、反復投与毒性及び遺伝毒性に関する情報が下記の通り報告されている。

ラットに強制経口投与した急性毒性試験では、1450 mg/kg bw以上の投与群で不活発や呼吸困難が観察され、5000 mg/kg bw以上の投与群の体重が低下したが、10000 mg/kg bw投与群でも死亡は認められなかった²⁶⁾。ラットを用いた13週間混餌投与試験では、最高用量である500 mg/kg bw投与群において、相対腎重量の増加が認められたが、腎臓の病理所見に変化はみられなかった²⁶⁾。一方、ビーグル犬を用いた13週間混餌投与試験では、3.0~6.0%投与群において、体重の低下、肝臓重量の増加、酵素レベルの増加に加え、肝臓及び腎臓の病理組織学的変化が観察された²⁶⁾。

*Salmonella typhimurium*を用いた復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマTK試験では、代謝活性化の有無にかかわらず変異頻度の増加は認められなかった²⁷⁾。シリアンハムスター胚細胞及びマウス線維芽細胞 (BALB/3T3) を用いた細胞形質転換試験の結果も、陰性であった²⁷⁾。

以上の報告から、DINAの急性経口毒性は弱い【経口LD₅₀: > 10000 mg/kg bw (ラット)】と考えられた。反復投与毒性に関しては、イヌにおいて肝臓及び腎臓の病理組織学的変化が引き起こされたことから、無毒性量は1.0% (およそ274 mg/kg bw/day) と判断された。遺伝毒性に関しては、細菌を用いた復帰突然変異試験、マウスリンフォーマTK試験や形質転換試験において陰性結果が得られているが、染色体異常試験や小核試験は行われていない。また、発がん性や生殖・発生毒性に関する情報もなかったことから、今後さらなる試験の実施が望まれる。

4. 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate

2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB, CAS No. 6846-50-0) は、分岐アルコールである2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediolと二つのisobutanoic acidとのエステル体である (Fig.1)。TXIBは、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) における既存化学物質安全性点検プログラムの対象物質であり、厚生労働省により反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験、細菌を用いた復帰突然変異試験及び哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験が実施されている²⁸⁾。これらの情報を含め、TXIBの

体内動態、急性毒性、反復投与毒性、遺伝毒性及び生殖・発生毒性に関する情報を以下に示す。

3位の炭素を¹⁴Cで標識した3-¹⁴C-TXIB (236~283 mg/kg bw) をHoltzmanアルビノラットに強制経口投与したところ、2日以内におよそ30~40%が尿中に排泄され、15~35%が糞中に排泄された²⁹⁾。糞中からは主にTXIBの未変化体やモノエステル体が検出され、尿中からは2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol, 2,2,4-trimethyl-3-hydroxyvaleric acidやそれらのグルクロン酸もしくは硫酸抱合体が検出された。

ラットに2000 mg/kg bwのTXIBを投与した急性経口毒性試験では、肛門性器部位の湿潤が観察されたが、その他に一般状態の変化はみられず、体重推移にも異常はみられなかった³⁰⁾。ラットに800~3200 mg/kg bw, マウスに400~6400 mg/kg bwのTXIBを投与した急性経口毒性試験においても死亡は認められなかった³⁰⁾。

SDラットを用いた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験では、30, 150もしくは750 mg/kg bw/dayの用量で40~53日間強制経口投与した結果、750 mg/kg bw投与群において体重増加抑制がみられ、150 mg/kg bw以上の投与群では種々の血液生化学検査値の変化 (総タンパク, アルブミン, クレアチニン, 総ビリルビンの増加など) が認められた²⁹⁾。750 mg/kg bw投与群の雄では、相対腎重量が増加し、病理組織学的検査の結果、尿細管上皮の好塩基性化及び硝子滴変性の重篤度の増加、近位尿細管上皮の壊死、遠位尿細管の腔拡張及び線維化が観察された。さらに、150 mg/kg bw以上の投与群の雄及び750 mg/kg bw投与群の雌の相対肝重量が増加し、750 mg/kg bw投与群の雄では肝細胞の腫脹が観察された。CD(SD)ラットに30, 150または750 mg/kg bw/dayのTXIBを含む餌を90日間与えた試験では、750 mg/kg bw投与群の雌雄で血中コレステロール及び肝重量の増加、同投与群の雄で血中総ビリルビン、血中クレアチニン及び腎重量の増加が認められた³⁰⁾。病理組織学検査の結果、すべての投与群の雄全例の腎臓に $\alpha_2\mu$ グロブリンの蓄積にともなう硝子滴が観察された。さらに、750 mg/kg bw投与群の雄では、慢性進行性腎症の発現頻度が増加した。ビーグル犬に0.1, 0.35または1.0%のTXIBを含む餌を90日間 (6日/週) 与えた結果、一般状態、体重、尿検査結果、血液学及び血液生化学検査値、器官重量及び病理組織学所見に異常は認められなかった²⁹⁾。

*Salmonella typhimurium*及び*Escherichia coli*を用いた復帰突然変異試験及びチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いたHPRT前進突然変異試験の結果、代謝活性化の有無にかかわらず変異頻度の増加は認められなかった^{28, 30)}。チャイニーズハムスター肺細胞 (CHL/IU) 及

び卵巣細胞を用いた染色体異常試験の結果も、代謝活性化の有無にかかわらず陰性であった^{28, 30)}。

上述のSDラットを用いた反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験では、交配率、受胎率、黄体数、着床数、出産児数、出生生児数、児の性比及び生後4日の生存児数に変化はみられず、児の外表面検査及び生後4日の剖検でも、TXIB投与によると考えられる異常は観察されなかった²⁸⁾。親動物の生殖器官重量及び病理組織学所見にも影響はみられなかった。CD(SD)IGS BRラットを用いた生殖発生毒性スクリーニング試験(0.15, 0.45または1.5%のTXIBを混餌投与)では、主に1.5%投与群の親動物に便量の減少や軟便が認められ、1.5%投与群の雌動物では妊娠20日の体重が低値を示した^{30, 31)}。妊娠率、交配期間及び妊娠期間に変化はみられなかったが、1.5%投与群では黄体数及び生後0日の生存児数が低下傾向を示し、着床数及び生後4日の生存児数は有意な低値を示した。児の性比及び体重には変化はみられなかった。親動物の精巣及び精巣上体重量、卵巣、精巣及び精巣上体の病理所見に影響はみられず、精子検査結果にも、TXIB投与によると考えられる有害影響は認められなかった。

以上の情報等から、TXIBの急性経口毒性は弱い【経口LD₅₀: > 3200 mg/kg bw (ラット), > 6400 mg/kg bw (マウス)】と判断された。反復投与毒性に関しては、ラットにおいて、腎臓及び肝臓の病理組織学的変化が観察された。90日間混餌投与試験で観察された $\alpha 2\mu$ グロブリンの蓄積に伴う硝子滴は、雄ラットに特異的な変化でありヒトに外挿できないと考えられた。従って、TXIBの反復投与毒性に関する無毒性量は、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験で観察された肝重量の増加と血液生化学パラメータの変化に基づき30 mg/kg bw/dayと判断された。TXIBは各種の*in vitro*遺伝毒性試験において陰性結果を示したが、*in vivo*遺伝毒性や発がん性試験の報告はなかった。生殖・発生毒性に関しては、ラットにおいて、黄体数、着床数や生存児数への影響が認められたことから、無毒性量は0.45% (276 mg/kg bw/day) と判断された。

5. Tri-*n*-butyl citrate

Tri-*n*-butyl citrate (TBC, CAS No. 77-94-1) は、citric acid と butanol のトリエステル体である (Fig.1)。TBCの毒性に関しては、体内動態、急性毒性及び反復投与毒性について、下記のような情報が報告されている。

TBC (100 μ g/mL) をヒトの血清中に添加し、インキュベートした結果、TBC濃度は指数関数的に減少し、半

減期は4時間と算出された³²⁾。同濃度のTBCをラットの肝臓ホモジネートとインキュベートした試験では、TBCは15分以内に消失し、半減期を算出することはできなかった³²⁾。

急性毒性に関しては、多量のTBC【10~50 mL/kg bw (10~52 g/kg bw)】をラット及びネコに強制経口投与した試験が行われており、投与後に不活発、下痢、軽度の吐気の兆候がみられたが、全身毒性を示唆する症状は観察されなかったことが報告されている³³⁾。Swiss albinoマウスに腹腔内投与した試験では、LD₅₀は2900 \pm 210 mg/kg bwと算出された³⁴⁾。

反復投与毒性に関しては、テストガイドラインに従って行われた試験は報告されていない。下記の通りラット及びネコを用いた反復経口投与毒性試験が実施されているが、使用動物数が少なく、試験結果について雌雄別の解析が行われていない。21日齢の幼若ラットに5%もしくは10%のTBCを含む餌を6~8週間与えた結果、10%投与群において、下痢が観察され、体重増加量が低下したが、血球数及び病理組織学所見に影響はみられなかった³³⁾。ネコに5 mL/kg bw/day (5210 mg/kg bw/day) のTBCを2か月間強制経口投与した結果、下痢及び体重低下が認められたが、尿及び血液生化学検査値や血球数に影響はみられなかった³³⁾。その他に、マウスに580 mg/kg bw/dayのTBCを14日間腹腔内投与した試験が行われている³⁴⁾。その結果、体重増加抑制が認められたが、赤血球及び白血球数、凝固時間やヘモグロビンレベルに変化はみられず、また、肝臓、腎臓及び肺に病理組織学変化は観察されなかった。

以上の通り、TBCの毒性に関しては、信頼性の高い情報がほとんど入手できなかった。急性経口毒性は弱い【経口LD₅₀: >10000 mg/kg bw (ラット)】と考えられたが、信頼性の高い反復投与毒性試験の結果は報告されていない。さらに、TBCの体内動態に関する*in vivo*試験は行われておらず、遺伝毒性、発がん性及び生殖・発生毒性に関する情報も報告されていない。そのため、さらなる試験の実施が望まれる。

6. Acetyl tri-*n*-butyl citrate

Acetyl tri-*n*-butyl citrate (ATBC, CAS No. 77-90-7) は、TBCとacetic acidとのエステル体である (Fig.1)。ATBCの毒性に関しては、体内動態、急性毒性、反復投与毒性、遺伝毒性及び生殖・発生毒性について下記のような報告があった。

SDラットに70 mg/kg bwのATBC (¹⁴Cで標識したATBCを含む) を単回強制経口投与した結果、ATBCは速やか

に吸収され、血中排出半減期は3.4時間と短かった^{32, 35)}。投与した放射能の60~70%が尿中に排泄され、糞中(25~35%)や呼気中(2%)への排泄も認められた。主要な尿中代謝物は、monobutyl citrateであったが、尿中からはその他にacetyl citrate, acetyl monobutyl citrate, dibutyl citrateやacetyl dibutyl citrateなども検出された。糞中からはATBCの未変化体の他、少なくとも3種の代謝物が認められた。

急性毒性に関しては、ラット及びネコに多量のATBC【10~50 mL/kg bw (10~52 g/kg bw)】を強制経口投与した試験の報告がある³³⁾。この試験では、投与後に不活発、下痢、軽度の吐気の兆候がみられたが、全身毒性を示唆する症状は観察されなかった。また、ラット及びマウスに25000 mg/kg bwのATBCを強制経口投与した試験でも、死亡は認められなかった⁴⁾。

CD BRラットを用いた90日間混餌投与試験(投与量: 100, 300, 1000 mg/kg bw/day)では、1000 mg/kg bw投与群の雄に尿pHの低下及び血中ALP活性の増加がみられ、300 mg/kg bw投与群の雄及び1000 mg/kg bw投与群の雌雄では相対肝重量の増加がみられた³²⁾。さらに、1000 mg/kg bw投与群の雄では相対腎重量の増加が認められたが、病理組織学所見に投与に関連した変化はみられなかった。交配前4週間から妊娠及び哺育期間を通してATBC(100, 300もしくは1000 mg/kg bw/day)を混餌投与したHan Wistarラットの児動物に同用量のATBCを13週間混餌投与した試験では、1000 mg/kg bw投与群において、軽度な体重増加抑制、肝重量の増加、肝肥大が観察され、300 mg/kg bw以上の投与群で軽度のペルオキシソーム増殖が認められた³²⁾。

*Salmonella typhimurium*を用いた復帰突然変異試験及びチャイニーズハムスター卵巣細胞を用いたHPRT試験では、代謝活性化の有無にかかわらず陰性結果が得られた^{32, 36)}。マウスリンフォーマTK試験に関しては、二つの試験結果が報告されている。このうち一つの試験では、代謝活性化の存在下において弱い陽性結果が得られたが、ATBCの添加濃度や変異頻度の変化の程度などの詳細が不明である³⁷⁾。別の試験では、代謝活性化の存在下及び非存在下において変異頻度の増加はみられなかった³²⁾。ラットのリンパ球を用いた染色体異常試験では、代謝活性化の有無にかかわらず陰性結果が得られた³²⁾。ATBCを単回強制経口投与したラットから調製した初代培養肝細胞を用いた不定期DNA合成試験においても、陰性結果が報告されている³²⁾。

上述のHan Wistarラットを用いた混餌投与試験では、親動物の性周期、交配、受胎、妊娠期間及び分娩への影響は認められず、同腹児数、児動物の生存率、体重及び剖検所見にも変化はみられなかった³²⁾。さらに、児の肛

門生殖突起間距離、性成熟、雄児の乳輪保持率、精子検査結果にも影響はみられなかった。100, 300もしくは1000 mg/kg bw/dayのATBCをSDラットに混餌投与した2世代繁殖毒性試験では、1000 mg/kg bw投与群においてF0雌動物の妊娠21~22日の体重が低値を示し、300及び1000 mg/kg bw投与群のF1雄動物(成獣)の体重も持続的に低値を示した³²⁾。交配、受胎及び妊娠への影響は認められなかったが、300 mg/kg bw以上の投与群において児の死亡率が軽度に増加し、児の体重も軽度に低下した。

以上の報告から、ATBCの急性経口毒性は弱い【経口LD₅₀: >25000 mg/kg bw(ラット及びマウス)】と考えられた。ラットを用いた90日間混餌投与試験では、1000 mg/kg bw投与群において体重及び肝臓への影響が認められたことから、ATBCの反復投与毒性に関する無毒性量は300 mg/kg bw/dayと判断された。最近、より低い50 mg/kg bw/dayのATBCをWistarラットに2日間経口投与した試験において、回腸のCYP3A1発現レベルが増加したことが報告されている³⁸⁾。ATBCはステロイドX受容体(Steroid and xenobiotic receptor: SXR)を介してCYP3A4やCYP3A1を誘導することが示されている³⁸⁾。SXRアゴニストを長期投与したヒトで血中ビタミンDレベルの低下や代謝性骨疾患の発症が報告されているが³⁹⁻⁴¹⁾、ATBCを経口投与したWistarラットでは小腸や肝臓のCYP3A1発現レベルへの影響は認められていない³⁸⁾ため、少なくともATBCの経口暴露に関しては、小腸から吸収されるビタミンDの代謝への影響は少ない可能性が考えられた。ATBCの遺伝毒性に関しては、各種の*in vitro*試験が行われているが、明確な遺伝毒性は認められていない。不定期DNA合成試験以外には*in vivo*遺伝毒性試験の報告はなく、発がん性についても信頼性の高い試験の報告はなかった。ラットを用いた2世代繁殖毒性試験では、児の死亡率や体重への軽度な影響が認められたことから、生殖・発生毒性に関する無毒性量は100 mg/kg bw/dayと判断された。

まとめ

フタル酸エステル類の代替可塑剤として使用量の増加が予測される6種の可塑剤について、経口暴露による影響に焦点を当てて、毒性情報を収集した結果、いずれの物質も急性毒性は弱いことが明らかとなった。反復投与毒性に関して、無毒性量もしくは最小毒性量を設定することができた信頼性の高い試験の結果をTable 1にまとめた。DEHTの慢性毒性試験では、眼、鼻甲介や肝臓の病理組織学変化が観察された。DINCHの反復投与毒性試験では甲状腺や腎臓への影響、DINA及びTXIBに関して

は肝臓や腎臓への影響、ATBCに関しては肝臓への軽度な影響が報告されており、DINCH及びTXIBの無毒性量（それぞれ40 mg/kg bw/day及び30 mg/kg bw/day）は、DEHT、DINAやATBCと比較して低い値であった。TBCに関しては、信頼性の高い反復投与毒性試験が行われていないため、適切な試験の実施が望まれる。

DEHT、DINCH、ATBC及びTXIBに関しては、明確な遺伝毒性を示す報告はなかった（Table 2）。DINAについては染色体異常試験や小核試験が行われておらず、TBCの遺伝毒性に関しては全く情報を得ることができなかった。発がん性に関しては、DEHT及びDINCHをラットに2年間混餌投与した信頼性の高い試験の結果が報告されている。DINCHの投与により甲状腺腫が引き起こされたことが報告されているが、この変化は甲状腺ホルモンの代謝亢進に伴う二次的な変化である可能性が高く、ヒトへの外挿性には疑問がある。

生殖・発生毒性に関しては、比較的高用量のDEHT、TXIB及びATBCをラットに投与した試験において、黄体数、着床数、生存児数、児の生存率や体重への影響がみられたが（Table 3）、フタル酸エステル類について報告されているような精巢毒性、催奇形性や雄児の生殖器発達への影響²⁾は報告されていなかった。DINA及びTBCについては、関連する報告が認められなかったため、生殖・発生影響を指標とした試験を実施する必要があるだろう。

最後に、本稿に掲載した毒性情報の多くは専門誌で公表されていない企業データである。これらのうち一部については有害物質取締法（Toxic Substances Control Act: TSCA）に基づき米国環境保護庁（Environmental Protection Agency: EPA）に提出された試験報告書を米国技術情報サービス（National Technical Information Service: NTIS）を通して入手することができたが、それ以外の情報は経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD）や米国消費者製品安全委員会（Consumer Product Safety Commission: CPSC）が作成した評価書等からの二次引用である。特にDINCHについては、すべての毒性情報が未公表データであり、今後、行政判断に利用するための精密なリスク評価を行う際には、これらの企業データを直接入手し詳細な有害性評価を行っていく必要があるだろう。

謝辞

本稿の基となった調査研究は、厚生労働省食品等安全確保対策費（食品等試験検査費『フタル酸エステル代替物質毒性調査』）で実施したものである。

引用文献

- 1) 小泉睦子, 江馬 眞, 広瀬明彦, 長谷川隆一: 日本食品化学学会誌, **7**, 65-73 (2000)
- 2) 小泉睦子, 江馬 眞, 広瀬明彦, 黒川雄二, 長谷川隆一: 日本食品化学学会誌, **8**, 1-10 (2001)
- 3) 小泉睦子, 大野泰雄, 広瀬雅雄, 江馬 眞, 井上達, 長谷川隆一: 日本食品化学学会誌, **9**, 39-45 (2002)
- 4) US CPSC: "Review of Exposure and Toxicity Data for Phthalate Substitutes", U.S. Consumer Product Safety Commission, prepared by Versar, Inc. and Syracuse Research Corporation (SRC), January 15, 2010. Available at: <http://www.cpsc.gov/about/cpsia/docs/DMEP.pdf>
- 5) Kamrin, M.A.: *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.*, **12**, 157-174 (2009)
- 6) European Commission: *Official Journal of the European Journal*, **344**, 40-43 (2005)
- 7) US Congress: "Consumer product safety improvement act of 2008", Public law 110-314-Aug. 14, 2008
- 8) Canadian Department of Health: "Phthalates Regulations", *Canada Gazette*, **143** (25) (2009) Available at: <http://gazette.gc.ca/rp-pr/p1/2009/2009-06-20/html/reg3-eng.html>
- 9) 厚生労働省: "食品、添加物等の規格基準の一部改正について", 厚生労働省医薬品食品保健部基準課長通知(食基発0802001号, 平成14年8月2日)
- 10) 厚生労働省: "食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について", 医薬食品局食品安全部長通知(食安発0906第1号, 平成22年9月6日)
- 11) 阿部 裕, 山口未来, 六鹿元雄, 平原嘉親, 河村葉子: 食品衛生学雑誌, **53**, 19-27 (2012)
- 12) Barber, E.D., Fox, J.A. and Giordano, C.J.: *Xenobiotica*, **24**, 441-450 (1994)
- 13) Eastman Kodak Company: "Absorption and metabolism of [hexyl 2-¹⁴C]di(2-ethylhexyl)terephthalate in the rat", submitted to the U.S. EPA under the Toxic Substances Control Act (TSCA) (Doc I.D. 40-8474034, Microfiche No. OTS 0507299) (1984)
- 14) OECD: "Di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHT)", SIDS Dossier and Initial Assessment Report for SIAM 17 (2003). Available at: http://webnet.oecd.org/Hpv/UI/SIDS_Details.aspx?id=C1534369-697F-46E5-83A6-626F8BC31554
- 15) Barber, E.D. and Topping, D.C.: *Food Chem. Toxicol.*, **33**, 971-978 (1995)
- 16) Deyo, J.A.: *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 990-1005 (2008)

- 17) Barber, E.D.: *Environ. Mol. Mutagen.*, **23**, 228-233 (1994)
- 18) DiVincenzo, G.D., Hamilton, M.L., Mueller, K.R., Donish, W.H. and Barber, E.D.: *Toxicology*, **34**, 247-259 (1985)
- 19) Faber, W.D., Deyo, J.A., Stump, D.G. and Ruble, K.: *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, **80**, 69-81 (2007)
- 20) Faber, W.D., Deyo, J.A., Stump, D.G., Navarro, L., Ruble, K. and Knapp, J.: *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, **80**, 396-405 (2007)
- 21) Gray, L.E., Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N. and Parks, L.: *Toxicol. Sci.*, **58**, 350-365 (2000)
- 22) IARC: "Some industrial chemicals", IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 77, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, pp. 41-148 (2000)
- 23) NICNAS: "Full Public Report: 1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, 1,2-diisononyl ester ('Hexamoll DINCH')", File No: STD/1259, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS) (2008). Available at: <http://www.nicnas.gov.au/publications/CAR/new/EX/exFULLR/ex0000FR/ex165FR.pdf>
- 24) US CPSC: "Robust Summary for DINCH", US Consumer Product Safety Improvement Act (CPSC) (2010). Available at: <http://www.cpsc.gov/about/cpsia/chapmain.html>
- 25) Capen, C.C.: "Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons", 7th ed., ed. by Klaassen, C.D., McGraw-Hill Companies, Inc., New York, pp. 807-879 (2008)
- 26) The American Chemical Council Aliphatic Esters Panel: "Robust Summaries and Test Plans for the diesters category of the aliphatic esters chemicals", submitted to the United States Environmental Protection Agency (EPA) under the High Production Volume (HPV) Chemical Challenge Program, November 14, 2003
- 27) McKee, R.H., Lington, A.W. and Traul, K.A.: *Environ. Mutagen.*, **8**, 817-827 (1986)
- 28) 厚生省, 化学物質毒性試験報告 Vol.2, 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, 化学物質点検推進委員会発行, pp.229-252 (1995)
- 29) Astill, B.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **22**, 387-399 (1972)
- 30) Eastman Chemical Company: "Toxicity summary for EASTMAN® TXIB formulation additive (2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate, CAS No. 6846-50-0)", submitted to the U.S. Consumer Product Safety Commission (CPSC) on March 16, 2010. Available at: <http://www.cpsc.gov/about/cpsia/chapmain.html>
- 31) Eastman Chemical Company: "Support: Reproduction/developmental toxicity screening test in the rat with 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate -Final report w/cover letter dated 082401", submitted to the U.S. EPA under the Toxic Substances Control Act (TSCA) (Doc I.D. 8EHQ-0801-14946, Microfiche No. 89010000299) (2001)
- 32) Morflex Inc.: "Assessment of data availability and test plan for acetyl tributyl citrate (ATBC) (CAS RN 77-90-7)", prepared by Toxicology/Regulatory Services, Inc. and submitted to the US EPA in the High Production Volume Challenge Program (2003)
- 33) Finkelstein, M. and Gold, H.: *Toxicology*, **1**, 283-298 (1959)
- 34) Meyers, D.B., Autian, J. and Guess, W.L.: *J. Pharm. Sci.*, **53**, 774-777 (1964)
- 35) Hiser, M.F., Markley, B.J., Reitz, R.H. and Nieusma, J.L.: *Toxicologist*, **12**, 161 (1992)
- 36) Heath, J.L. and Reilly, M.: *Poult. Sci.*, **61**, 2517-2519 (1982)
- 37) DoH: "1997 Annual Report of the Committees on Toxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment", Department of Health (DoH), UK (1998)
- 38) Takeshita, A., Igarashi-Migitaka, J., Nishiyama, K., Takahashi, H., Takeuchi, Y. and Koibuchi, N.: *Toxicol. Sci.*, **123**, 460-470 (2011)
- 39) Brodie, M.J., Boobis, A.R., Dollery, C.T., Hillyard, C.J., Brown, D.J., MacIntyre, I. and Park, B.K.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **27**, 810-814 (1980)
- 40) Kulak, C.A., Borba, V.Z., Bilezikian, J.P., Silvado, C.E., Paola, L. and Boguszewski, C.L.: *Arq. Neuropsiquiatr.*, **62**, 940-948 (2004)
- 41) Konno, Y., Kodama, S., Moore, R., Kamiya, N. and Negishi, M.: *Mol. Pharmacol.*, **75**, 265-271 (2009)
- 42) US EPA: "Recommendations for and documentation of biological values for use in risk assessment", EPA/600/6-87/008 (1988)

Table 1 Repeated oral dose toxicity of 6 alternatives to phthalate plasticizers

Animal	Exposure ^a	NOAEL ^b	Major toxic effect
Di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT)			
SD rat ¹⁵⁾	90 days, diet	561 mg/kg bw/day	-
F344 rat ¹⁶⁾	2 years, diet	102 mg/kg bw/day	Eyes – loss of outer nuclear layer of retina vascular mural mineralization (sclera) Nasal turbinates – prominent eosinophilic inclusions Liver – portal lymphoid foci
1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH)			
Wistar rat ²⁴⁾	28 days, diet	318 mg/kg bw/day	Urine – increased numbers of degenerated epithelial cells
Wistar rat ²³⁾	90 days, diet	107 mg/kg bw/day ^c	Urine – increased number of abnormal transitional epithelial cells and blood Thyroids – hypertrophy/hyperplasia of the follicular epithelia
Wistar rat ²³⁾	2 years, diet	40 mg/kg bw/day	Thyroids – adenoma and hyperplasia of the follicular cells
Wistar rat ²⁴⁾	2 generations, diet	100 mg/kg bw/day	Thyroids – hypertrophy/hyperplasia of the follicular epithelia Kidneys – vacuolization of the tubular epithelia
Diisononyl adipate (DINA)			
Rat ^{d, 26)}	90 days, diet	500 mg/kg bw/day	-
Beagle dog ²⁶⁾	90 days, diet	274 mg/kg bw/day	Decreased body weight Liver and kidneys – histopathological changes
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB)			
SD rat ²⁸⁾	40~53 days ^e , gavage	30 mg/kg bw/day	Liver – swelling of liver cells Kidneys – necrosis, tubular dilation and fibrosis Blood – increased levels of albumin, creatinine and total bilirubin
CD(SD) rat ³⁰⁾	90 days, diet	150 mg/kg bw/day	Kidneys – chronic progressive nephropathy Blood – increased levels of cholesterol, total bilirubin and creatinine
Beagle dog ^{29,42)}	90 days, diet	296 mg/kg bw/day	-
Tri-<i>n</i>-butyl citrate (TBC)			
No reliable data			
Acetyl tri-<i>n</i>-butyl citrate (ATBC)			
CD BR rat ³²⁾	90 days, diet	300 mg/kg bw/day	Liver – increased weight Blood – increased level of ALP
Han Wistar rat ³²⁾	90 days ^f , diet	300 mg/kg bw/day	Reduction in body weight gain Liver – hypertrophy

-: no toxic effects

a: duration, route

b: no observed adverse effect level

c: lowest observed adverse effect level (LOAEL)

d: the strain is unknown

e: combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

f: Animals were given ATBC in the diet for 90 days from approximately four weeks of age, but they could be exposed to ATBC *in utero* and from birth until the start of this study because their parent animals were given ATBC in the diet, beginning 4 weeks before mating and throughout the mating, gestation and lactation period.

Table 2 Genotoxicity of 6 alternatives to phthalate plasticizers

Test system	End point	Result ^a
Di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT)		
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98 and TA100 ¹⁷⁾	Reverse mutation (histidine biosynthesis)	- / -
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA1538, TA98 and TA100 ¹⁸⁾	Reverse mutation ^b (histidine biosynthesis)	- / -
Chinese hamster ovary cells (CHO-K ₁ -BH ₄) ¹⁷⁾	Forward mutation (6-thioguanine resistance)	- / -
Chinese hamster ovary cells (CHO-WBI) ¹⁷⁾	Chromosome aberration	- / -
1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH)		
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100, and <i>Escherichia coli</i> WP2 uvr A ²⁴⁾	Reverse mutation (histidine or tryptophan biosynthesis)	- / -
Chinese hamster ovary cells ²⁴⁾	Forward mutation (6-thioguanine resistance)	- / -
Chinese hamster lung fibroblasts (V79) ²⁴⁾	Chromosome aberration	- / -
NMRI mouse (intraperitoneal administration) ²⁴⁾	Micronuclei (bone marrow)	-
Diisononyl adipate (DINA)		
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA1538 ²⁷⁾	Reverse mutation (histidine biosynthesis)	- / -
Mouse lymphoma cells (L5178Y) ²⁷⁾	Forward mutation (trifluorothymidine resistance)	- / -
Syrian hamster embryo cells ²⁷⁾	Morphologic transformation	- / n.d.
Mouse embryonic fibroblasts (BALB/3T3) ²⁷⁾	Morphologic transformation	- / n.d.
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB)		
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535, TA1537, TA98, TA100, and <i>Escherichia coli</i> WP2 uvrA ²⁸⁾	Reverse mutation (histidine or tryptophan biosynthesis)	- / -
<i>Salmonella typhimurium</i> and <i>Escherichia coli</i> ^{c, 30)}	Reverse mutation (histidine or tryptophan biosynthesis)	- / -
Chinese hamster ovary cells ³⁰⁾	Forward mutation (6-thioguanine resistance)	- / -
Chinese hamster lung cells (CHL/IU) ²⁸⁾	Chromosome aberration	- / -
Chinese hamster ovary cells ³⁰⁾	Chromosome aberration	- / -
Tri-<i>n</i>-butyl citrate (TBC)		
No data		
Acetyl tri-<i>n</i>-butyl citrate (ATBC)		
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535 and TA1537 ³²⁾	Reverse mutation (histidine biosynthesis)	- / -
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA1538 ³²⁾	Reverse mutation (histidine biosynthesis)	- / -
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA1538 ³⁶⁾	Reverse mutation (histidine biosynthesis)	- / n.d.
Chinese hamster ovary cells ³²⁾	Forward mutation (6-thioguanine resistance)	- / -
Mouse lymphoma cells (L5178Y) ³⁷⁾	Forward mutation (trifluorothymidine resistance)	- / w+
Mouse lymphoma cell (L5178Y) ³²⁾	Forward mutation (trifluorothymidine resistance)	- / -
Rat lymphocytes ³²⁾	Chromosome aberration	- / -
Han Wistar rat (oral administration) ³²⁾	Unscheduled DNA synthesis (Hepatocyte primary cell culture)	-

-: negative, w+: weekly positive, n.d.: no data

a: result without metabolic activation / with metabolic activation

b: bacterial mutagenicity testing of urine from rats dosed with DEHT

c: the strain is unknown

Table 3 Reproductive and developmental toxicity of 6 alternatives to phthalate plasticizers

Animal	Exposure ^a	NOAEL ^b	Major toxic effect
Di(2-ethylhexyl) terephthalate (DEHT)			
CD(SD)IGS BR rat ¹⁹⁾	2 generations, diet	182 mg/kg bw/day	Reduction in pup body weight
CD(SD)IGS BR rat ²⁰⁾	GD 0-20, diet	747 mg/kg bw/day	-
CD1(ICR) mouse ²⁰⁾	GD 0-18, diet	1382 mg/kg bw/day	-
SD rat ²¹⁾	GD 14 - LD 3, gavage	750 mg/kg bw/day	-
1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, diisononyl ester (DINCH)			
Wistar rat ²⁴⁾	2 generations, diet	1000 mg/kg bw/day	-
Wistar rat ²⁴⁾	GD 6-19, gavage	1200 mg/kg bw/day	-
Himalayan rabbit ²⁴⁾	GD 6-29, diet	1029 mg/kg bw/day	-
Wistar rat ²⁴⁾	GD 3 - LD 20, gavage	1000 mg/kg bw/day	-
Diisononyl adipate (DINA)			
No data			
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate (TXIB)			
SD rat ²⁸⁾	PD 14 - LD 3, gavage	750 mg/kg bw/day	-
CD(SD)IGS BR rat ^{30, 31)}	PD 14 - LD 4-5, diet	276 mg/kg bw/day	Reductions in the number of corpora lutea, implantation sites and live pups
Tri-<i>n</i>-butyl citrate (TBC)			
No data			
Acetyl tri-<i>n</i>-butyl citrate (ATBC)			
Han Wistar rat ³²⁾	PD 28 - LD 21 ^c , diet	1000 mg/kg bw/day	-
SD rat ³²⁾	2 generations, diet	100 mg/kg bw/day	Increased mortality and reduced body weight of pups

GD: gestation day, LD: lactation day, PD: pre-mating day

-: no toxic effects on reproduction and development

a: duration, route

b: no observed adverse effect level

c: The F1 male and female offspring were then provided the respective treated diets for 13 weeks (from approximately 4 weeks of age).