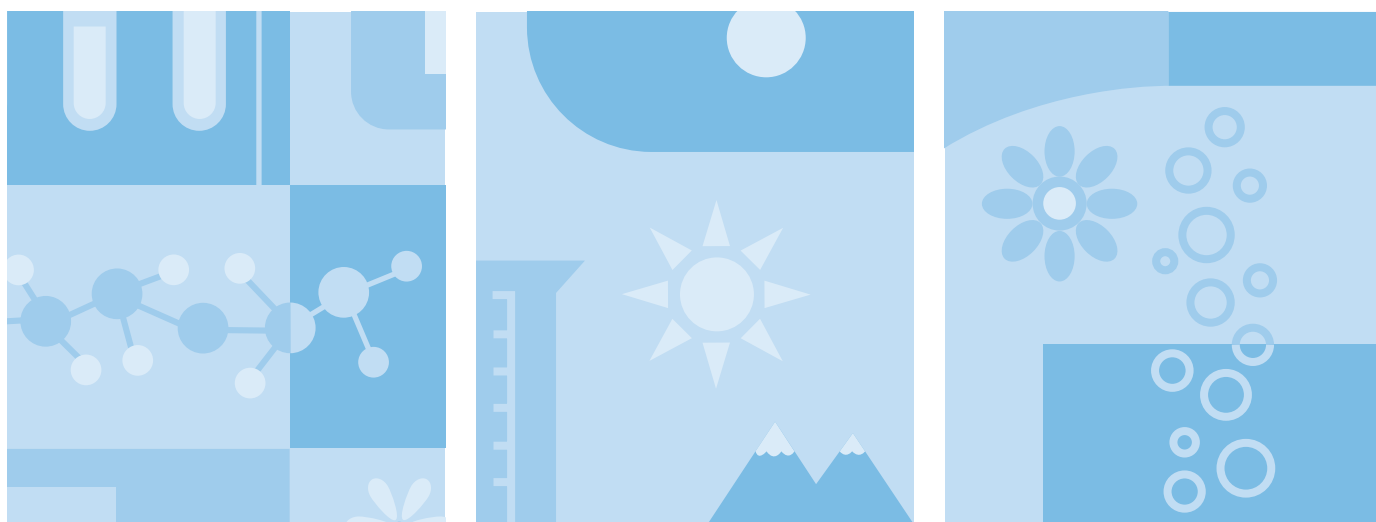


# Karaktärisering av kända hormonstörande substanser som underlag för utvärdering av hur väl dagens informationskrav och föreslagna kriterier identifierar hormonstörande ämnen





**Karaktärisering av kända hormonstörande substanser som underlag för utvärdering av hur väl dagens informationskrav och föreslagna kriterier identifierar hormonstörande ämnen**

Best.nr. 511 077

Sundbyberg, december 2012

Utgivare: Kemikalieinspektionen©

Beställningsadress: CM Gruppen, Box 11063, 161 11 Bromma

Tel: 08-5059 33 35, fax 08-5059 33 99, e-post: kemi@cm.se

Rapporten finns som nedladdningsbar pdf på [www.kemikalieinspektionen.se](http://www.kemikalieinspektionen.se)

## Förord

Kemikalieinspektionen har på uppdrag av regeringen tagit fram en handlingsplan för en giftfri vardag Handlingsplan för en giftfri vardag 2011– 2014 – Skydda barnen bättre. Insatser sker nu på flera områden både nationellt, inom EU och internationellt och ofta i samarbete med andra myndigheter.

Att minska kemiska risker i vardagen är ett steg på vägen att nå riksdagens miljö kvalitetsmål Giftfri miljö – det mål Kemikalieinspektionen ansvarar för.

Inom ramen för handlingsplanen tar KemI fram kunskapssammanställningar, som publiceras i KemI:s rapport respektive PM-serie. Bakom publikationerna står egna medarbetare, forskare eller konsulter. KemI vill på detta sätt dela med sig av ny och angelägen kunskap. Publikationerna, som är kostnadsfria, finns på webbplatsen [www.kemikalieinspektionen.se](http://www.kemikalieinspektionen.se)

Hormonstörande ämnen är ett av de områden som prioriterats i handlingsplanen. Sverige har höga ambitioner att aktivt bidra till de processer som pågår både inom EU och internationellt på området. Syftet med projektet var att via tillgänglig kunskap om ett antal kända hormonstörande ämnen utvärdera hur nationella och internationella standardmetoder och föreslagna kriterier fungerar för att identifiera hormonstörande ämnen. Kunskap om detta behövs för att ta ställning till hur testmetoder, kriterier och informationskrav ska utformas.

Kemikalieinspektionen har uppdragit åt SWECO att utvärdera i vilken mån standardiserade och icke standardiserade testmetoder och föreslagna kriterier fångar upp och identifierar hormonstörande ämnen. Med utgångspunkt från dataunderlaget för ett antal ”kända hormonstörande ämnen” utvärderas styrkor och svagheter i testmetoder samt i föreslagna kriterier. Detta har gjorts för tre utvalda modellsubstanser. Data från standardiserade och icke standardiserade tester har insamlats, strukturerats och utvärderats.

Rapporten bidrar med underlag som ger Kemikalieinspektionen möjlighet att på ett konstruktivt sätt bidra till pågående processer med testmetodutveckling (OECD), framtagande av kriterier för identifiering av hormonstörande ämnen och regelutveckling (EU), samt belyser var ytterligare forskningsinsatser kan behövas.

Utvärderingen har gjorts av Pär Hallgren, SWECO. Rapporten har extern granskats av Jane Ebsen Morthorst, Syddansk Universitet, Odense och Monica Lind, Lind Miljöinfo, Uppsala. De åsikter som uttrycks i denna rapport är författarnas egna och speglar inte nödvändigtvis Kemikalieinspektionens uppfattning.



# Innehållsförteckning

<b>Förkortningar</b>	<b>7</b>
<b>Sammanfattning</b>	<b>9</b>
<b>Summary</b>	<b>11</b>
<b>1 Inledning</b>	<b>13</b>
1.1 Bakgrund	13
1.2 Problembeskrivning	13
1.3 Syfte och Uppdragsbeskrivning	14
1.4 Avgränsning	14
<b>2 Metodik och genomförande</b>	<b>14</b>
2.1 Val av modellsubstanser	14
2.2 Datainsamling	15
2.3 Databas	16
2.4 Standardmetoder enligt OECD och US EPA	16
2.5 Icke standardiserade metoder	16
2.6 Utvärdering	17
<b>3 Resultat</b>	<b>18</b>
3.1 Modellsubstans DCHP	18
3.2 Modellsubstans Genistein	20
3.3 Modellsubstans TBT	23
<b>4 Diskussion</b>	<b>25</b>
4.1 De granskade testmetodernas förmåga att identifiera hormonstörande effekter av DCHP	25
4.2 De granskade testmetodernas förmåga att identifiera hormonstörande effekter av genistein	26
4.3 De granskade testmetodernas förmåga att identifiera hormonstörande effekter av TBT	26
4.4 Övergripande diskussion kring testmetoder	27
4.5 Definitioner av EDCs i relation till de granskade modellsubstanserna	27
4.5.1 Bundesinstitut für Risikobewertung, Joint DE-UK position paper (2011)	27

4.5.2 Danish Ministry of the Environment (2011)	28
4.5.3 PAN Pesticide Action Network (2011)	28
4.5.4 ECETOC (2009)	29
<b>5 Slutsatser</b>	<b>29</b>
<b>6 Referenser</b>	<b>32</b>

**Bilaga 1 - 2011 OECD Revised Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters**

**Bilaga 2 – Utvärdering av DCHP enligt sektion C, ”Specific Guidance for the Test Guidelines Addressed”, i OECDs vägledande dokument (maj 2011).**

**Bilaga 3 – Sammanställning data och referenser från studier med DCHP.**

**Bilaga 4 – Sammanställning data och referenser från studier med Genistein.**

**Bilaga 5 – Sammanställning data och referenser från studier med TBT.**



## Förkortningar

AR	androgenreceptor
CF	OECDs Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters
CMR	ämnen som är cancerogena, mutagena eller reproduktionstoxiska
ER	östrogenreceptor
EATS	hormonstörande effekter via östrogenpåverkan, androgenpåverkan, thyroidpåverkan eller påverkan på steroidogenes
GR	glucocorticoidreceptor
GSI	gonado-somatiskt index
HSI	hepato-somatiskt index
KEMI	Kemikalieinspektionen
MAD	Mutual acceptance of data
NR	Nukleära receptorer
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
VTG	vitellogenin



# Sammanfattning

För att kunna tillämpa rådande regelverk inom Reach och andra relevanta regelverk måste kemiska ämnen med hormonstörande egenskaper kunna identifieras. Detta kan ske med hjälp av standardiserade testmetoder eller genom att andra riskkriterier uppfylls.

Kemikalieinspektionen har uttryckt ett behov av att utveckla dessa kriterier. Vidare vill man utifrån tillgänglig kunskap om kända hormonstörande ämnen utvärdera hur nationella och internationella standardmetoder och föreslagna kriterier fungerar.

Sweco Environment har tillsammans med Kemikalieinspektionen valt ut tre ämnen vilka misstänks vara hormonstörande och granskat dataunderlaget för dessa. Data från standardiserade och icke standardiserade tester har insamlats, strukturerats och utvärderats för ämnena Dicyclohexylftalat (DCHP), Genistein, och Tributyltenn (TBT). Föreliggande studie har syftat till att utvärdera testmetoder och någon bedömning av risker med dessa kemikalier har inte gjorts.

Vetenskapliga publikationer har inhämtats och nyckelinformation från varje studie/publikation registrerades i en databas varigenom testresultat kunde sorteras efter olika premisser för att t.ex. jämföra resultat från standardiserade tester med andra typer av studier. Andra viktiga aspekter som har granskats är t.ex. vilka effektmått ("endpoints") som har beaktats, vilka doser/halter som har använts i studierna samt om det rör sig om studier med cellkulturer eller hela organismer.

Hur olika uppställda kriterier inverkar på bedömningen av dessa modellsubstanser har även bedömts utifrån förslag på kriterier från tre europeiska medlemsstater och två europeiska organisationer.

De viktigaste slutsatserna av studien kan sammanfattas i följande punkter:

- Det är viktigt att misstänkt hormonstörande kemikalier utvärderas inom ett mycket brett koncentrationsspektrum då många ämnen inte har ett linjärt dosresponsförhållande. Görs inte detta finns en uppenbar risk att kemikalier klassas som ofarliga trots att de har hormonstörande effekter. Föreliggande litteraturstudie visar att de lägsta effektkoncentrationerna i många fall har erhållits med icke standardiserade metoder.
- Valet av effektmått har avgörande betydelse för om hormonstörande egenskaper upptäcks i en studie.
- Det är viktigt att exponeringsförsök innefattar en testorganisms kritiska utvecklingsstadier. Görs inte detta finns en uppenbar risk att kemikalier klassas som ofarliga trots att de har hormonstörande effekter.
- Standardiserade tester täcker in de mest kartlagda verkansmekanismerna för hormonstörande ämnen. En inriktning mot endast standardiserade OECD-metoder innebär lättare jämförelser ämnen emellan men innebär samtidigt risker. För hormonella effekter via andra verkansmekanismer är det nödvändigt att beakta icke-standardiserade metoder och/eller inkludera nya effektmått (endpoints). Detta visar på vikten av att fortsätta att utveckla och validera testmetoder som innefattar nya effektmått. Då delar av hormonsystemet i dagsläget inte omfattas av befintliga

standardiserade metoder bör utvärdering ske ”case-by-case” och innefatta både standardiserade tester och icke-standardiserade tester.

- Förslag på kriterier från Joint DE-UK (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2011) innebär att stor tonvikt läggs på standardiserade tester. Avsaknad/tillgång till resultat från specifika testnivåer enligt OECD blir då mer avgörande än det allmänna kunskapsläget kring kemikalien.
- Föreslagna kriterier skiljer sig åt i fråga om definitionen av ”adverse effects” samt huruvida ett ämnes potens skall beaktas i bedömningen. T.ex. vill Danska Miljöministeriet (2011) att man skall undvika att använda tröskelvärden för hormonstörande ämnen. Detta för att ta hänsyn till att tidpunkten för exponering av hormonstörande ämnen är väl så avgörande som den aktuella koncentrationen. Dessutom innebär en sådan hållning att bättre hänsyn tas för additiva och synergistiska effekter vid samtidig exponering för flera hormonstörande ämnen.

## Summary

Chemicals with endocrine disrupting effects (EDCs) need to be identified in order to apply Reach and other relevant legislations. Identification can be through standardized test methods or by considering other criteria.

Swedish Chemicals Agency (Kemikalieinspektionen) are looking to elaborate these criteria, and by reviewing present scientific knowledge on EDCs, evaluate how effective present national and internationally standardized test methods are.

Together with the Swedish Chemicals Agency, Sweco Environment selected three suspected endocrine disruptors for which data were reviewed. Data from standardized and non-standardized tests were collected, structured and evaluated for Dicyclohexylphthalate (DCHP), genistein, and Tributyltin (TBT). The aim of the present study was to evaluate test methods and not to perform a risk assessment for these chemicals.

Scientific publications were collected and key information from each study / publication was recorded in a database for easy comparison of for example standardized tests versus non-standardized. Other important aspects that were evaluated included e.g. measured endpoints, dose/concentration tested and whether cell cultures (*in-vitro*) or whole organisms (*in-vivo*) methods were used.

How different criteria influence the assessment of these compounds was also investigated. This was done by considering propositions on criteria, made by three member states of the EU and two European organizations.

A summary of the main conclusions from the present study are given below:

- It is important that the suspected endocrine disrupting chemicals are evaluated in a wide concentration range since many chemicals do not have a linear dose-response relationship. Failure to do so can result in chemicals erroneously being classified as harmless, although they have hormone disrupting effects. The present literature review shows that the lowest effect concentrations in many cases have been obtained by using non-standardized test methods.
- Whether hormone disrupting properties are detected are much depending on the endpoint studied.
- It is important that exposure experiments include the critical developmental stages of the test organism. Failure to do so can result in chemicals erroneously being classified as harmless, although they have hormone disrupting effects.
- Standardized test methods encompass the most studied mechanisms of action for endocrine disruptors. Use of standardized OECD methods facilitates the comparison of different chemicals, but is also risky. Other non-standard methods and alternative endpoints are necessary to encompass alternative mechanisms of action. This shows the importance of continuing to develop and validate test methods that include new endpoints. As some aspects of the endocrine system are not covered by the existing standardized test methods, the evaluation process should be performed on a "case-by-case" basis and include both standardized and non-standardized test methods.

- Applying the proposed criteria from Joint DE-UK (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2011) would mean a greater emphasis on the existence of results from standardized tests and less focus on the general state of knowledge about the chemical.
- Proposed criteria differ in terms of the definition of "adverse effects" and whether a substance's potency should be considered in the assessment. E.g. the Danish Ministry of Environment (2011) suggests the avoidance of threshold levels for endocrine disruptors. This in order to take into account that the time period of exposure to endocrine disruptors is as crucial as the actual concentration. Moreover, such an approach would better account for possible additive and synergistic effects of simultaneous exposure to multiple endocrine disruptors.

# 1 Inledning

## 1.1 Bakgrund

Kemikalieinspektionen har i förfrågningsunderlag från 2011-07-13, med diarienummer 240-H11-00842, efterfrågat en kunskapssammanställning som utvärderar hur nationella och internationella standardmetoder och föreslagna kriterier fungerar för att identifiera hormonstörande ämnen. Kunskapssammanställningen skall ligga till grund för Kemikalieinspektionens fortsatta arbete med att ta fram kriterier för hormonstörande ämnen samt visa på eventuella forskningsbehov och behov av åtgärder från myndigheter.

SWECO Environment har efter att ha föreslagit en projektplan sammanställt föreliggande rapport på uppdrag av Kemikalieinspektionen.

## 1.2 Problembeskrivning

För att kunna tillämpa rådande regelverk inom Reach och andra relevanta regelverk måste kemiska ämnen med hormonstörande egenskaper kunna identifieras. Detta kan ske med hjälp av ett antal nationella eller internationella testmetoder eller genom att andra riskkriterier uppfylls.

Vad krävs för att ett hormonstörande ämne skall identifieras? Det finns särskilda utmaningar vad gäller identifiering av toxiska effekter medierade via hormonella mekanismer jämfört med andra toxiska effekter. På molekylär nivå kan ett kemiskt ämne vara hormonstörande via många olika verkningsmekanismer. Detta minskar sannolikheten att enstaka *in vitro* metoder är tillräckliga för att upptäcka hormonstörande kemikalier på molekylär nivå. Likaledes kan påverkan i slutänden manifesteras via många olika negativa effekter på organism- eller populationsnivå. Detta innebär att uppställda kriterier bör innefatta vitt skilda effekter. För att täcka in humana effekter kanske det inte är tillräckligt med kriterier som innefattar reproduktionsstörande effekter och utvecklingspåverkan genom t.ex. fosterskador. Hormonsystemets påverkan på sjukdomstillstånd som diabetes, cancer, fetma, och benpåverkan genom t.ex. benskörhet för med sig att kriterierna eventuellt även behöver omfatta dessa effekter.

Då hormonstörande effekter kan manifesteras på så många olika sätt är det viktigt att det finns en bredd i forskningen när det gäller hormonstörande kemikalier.

Samtidigt är det viktigt att kemikalier kan utvärderas internationellt på ett enhetligt sätt. För internationella regelverk är det viktigt att man använder sig av standardiserade testmetoder. Inom OECD utvecklas bland annat standardiserade testmetoder som skall kunna upptäcka hormonstörande ämnen.

Även när standardiserade metoder har använts är det inte säkert att alla drar samma slutsats från testresultaten. Vilka kriterier som skall uppfyllas för att ett ämne skall klassas som hormonstörande är delvis en teknisk fråga men även en politisk sådan. EU-lagstiftning med relevans för hormonstörande ämnen är Reach (EG förordning nr 1907/2006), PPP (EG förordning nr 1107/2009) samt BP (Direktiv 98/8/EG).

## 1.3 Syfte och Uppdragsbeskrivning

Detta projekt har syftat till att utvärdera hur pass effektiva standardiserade testmetoder och föreslagna kriterier är för att fånga upp och identifiera hormonstörande ämnen.

Kunskapsläget och dataunderlaget för ett antal ”välkända hormonstörande ämnen” är tillräckligt gott för att man med utgångspunkt från dessa kan utvärdera styrkor och svagheter i testmetoder samt i föreslagna kriterier. Detta har här skett för tre utvalda modellsubstanser. Data från standardiserade och icke standardiserade tester har insamlats, strukturerats och utvärderats.

Hur olika uppställda kriterier inverkar på bedömningen av dessa modellsubstanser har även bedömts. För detta ändamål har förslag på kriterier från tre europeiska medlemsstater (ett gemensamt från DE/UK och ett från DK), samt från två organisationer (PAN- Pesticide Action Network Europe och ECETOC - European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) beaktats.

## 1.4 Avgränsning

Föreliggande studie syftar till att utvärdera testmetoder och kommer inte att göra någon bedömning av risker med olika kemikalier.

Kvaliteten på de utförda studierna har inte granskats eller poängsatts. I och med valet av i första hand peer-review papers förutsätts att dataunderlaget har undergått en kritisk granskning. Då syftet med föreliggande utvärdering är att se hur enskilda kemikalier utvärderas har endast studier med rena testkemikalier beaktats. Studier där testmetoden är relevant, men där blandningar av kemikalier undersökts, har följaktligen uteslutits. Det samma gäller för studier som syftar till att bestämma halfförekomster i miljöprover och i människa.

# 2 Metodik och genomförande

## 2.1 Val av modellsubstanser

SWECO lämnade till Kemikalieinspektionen ett första förslag på 5 olika modellsubstanser som tillsammans representerade följande tre kategorier av hormonstörande eller misstänkt hormonstörande ämnen.

- Ett ämne med välkänt hormonstörande egenskaper. Receptormedierad verkan genom NR som t.ex. estrogenreceptorn eller androgenreceptorn. Förslag: Bisfenol-A, Genistein eller 4-nonylfenol.
- Ett ämne med välkänt hormonstörande egenskaper. Indirekt verkan genom t.ex. enzympåverkan eller påverkan på hormonhomeostas. Förslag: Dicyclohexylftalat (DCHP) eller Mono-n-butylftalat (MBP).
- Ett ämne med starka misstankar om hormonstörande egenskaper men med otillräckliga kunskaper om bakomliggande mekanismer. Förslag: Ivermectin.



Efter diskussion med Kemikalieinspektionen beslutades att Genistein och DCHP skulle väljas från de första kategorierna. Som ett tredje ämne önskade KEMI att metoder för TBT skulle granskas.

## 2.2 Datainsamling

För alla tre modellsubstanserna har publikationer inhämtats genom sökning i följande databaser:

- MathSciNet
- Medline
- Nature
- PubMed
- Science Citation Index (ISI)
- ScienceDirect
- SCIRUS
- SCOPUS
- SpringerLink
- Toxline
- Web of Science
- Wiley Online Library

För jämförelse kan nämnas att fallstudien med prokloraz (OECD 2011) inhämtade publikationer från OECD, USEPA, PubMed och Web of Science.

De sökord som användes var t.ex. "dicyclohexylphthalate + endocrine", "dicyclohexyl + phthalate + endocrine" samt "DCHP + endocrine".

Artiklarnas titlar kontrollerades, relevanta titlar och review-artiklar prioriterades. Litteratur sorterades bort enligt projektets avgränsningar som redogjorts för ovan i avsnitt 2.4. Granskning av litteratur och succesiv dataregistrering i databasen fortgick till dess att samtliga inhämtade publikationer hade granskats eller då tillräcklig bredd med avseende på standardiserade, icke standardiserade och testnivåer hade erhållits.

För DCHP valdes 37 artiklar ut från ca 400 titlar. För Genistein valdes 17 artiklar ut från ca 370 kontrollerade titlar. För TBT valdes 18 artiklar ut från ca 350 kontrollerade titlar.

För TBT som finns med i EU:s databas över misstänkt hormonstörande ämnen (EU 1) har det även kontrollerats om databasen innehåller ytterligare publikationer.

En riktad sökning gjordes för att finna eventuella data från epidemiologiska studier.

I databasen Science Direct söktes t.ex. med sökorden "epidemiolog\* + phthalate\* + DCHP". Den huvudsakliga metaboliten till DCHP är MCHP varför det även gjordes en sökning med sökorden "epidemiolog\* + phthalate\* + MCHP".

## 2.3 Databas

En Access-databas skapades för att sammanställa data från den granskade litteraturen. Databasen möjliggjorde en god överblick samt möjlighet att utvärdera testresultat ur ett metaperspektiv. På ett enkelt sätt kunde testresultat sorteras efter olika premisser för att t.ex. endast jämföra resultat från standardiserade tester.

I databasen registrerades först referensinformation och abstracts för varje publikation. Därefter registrerades nyckelinformation för varje rapporterat resultat/effektmått. Flera olika tester kan således vara registrerade från en och samma referens. Följande nyckelinformation registrerades för varje test:

- Metodinfo: metodnamn, eventuell standardmetod, testorganism, effektmått ("endpoint"), testnivå (Level 1-5 enligt OECD Conceptual Framework Level), exponeringsväg.
- Testkoncentrationer/testdos: lägsta testade, högsta testade.
- Testresultat: LOEC/LOAEC/EC50/ED50/PC50/NOEC/NOAEC.

En kvalitativ bedömning gjordes även för att avgöra huruvida studien hade påvisat hormonella effekter. Studien registreras som: (+) positiv, (-) negativ eller (inc.) "inconclusive".

## 2.4 Standardmetoder enligt OECD och US EPA

Testdata registreras som härstammande från en standardiserad metod i de fall studien hänvisade till ett TG-nummer som finns med i Annex 1.4. till senaste upplagan av OECDs Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (utkast Version 11 May 2011). Tabellen finns även med som Bilaga 1. I några enstaka fall föreföll den använda metoden vara mycket snarlik den standardiserade utan att man för den skull refererade till det aktuella TG-numret. I detta fall klassades studien ändå som genomförd enligt standard. Utöver standardmetoderna som anges i Bilaga 1 betraktades även följande metoder från US - Environmental Protection Agency som standardmetoder:

- US EPA OPPTS 850.1500 Fish life cycle toxicity
- US EPA OPPTS 890.1150 Androgen receptor binding
- US EPA OPPTS 890.1200 Aromatase assay
- US EPA OPPTS 890.1250 Estrogen receptor binding
- US EPA OPPTS 890.1450 Juvenile/peripubertal female rats
- US EPA OPPTS 890.1500 Juvenile/peripubertal male rats
- US EPA OPPTS 890.1550 Steroidogenesis assay

## 2.5 Icke standardiserade metoder

För att kunna jämföra standardiserade metoder med icke-standardiserade, har även de sistnämnda sorterats in på en testnivå enligt OECD CF (Level 2-5) som beskriver på vilken organisatorisk nivå testet utförts. De standardiserade metodernas testnivå finns redan

klassificerad av OECD medan icke-standardiserade metodernas testnivå har skattats av SWECO. Beskrivningen av de olika typer av tester som av OECD (OECD 2011, maj) sorteras in under respektive organisationsnivå har använts som utgångspunkt för att skatta vilken nivå som de icke-standardiserade testerna kan anses tillhöra.

## 2.6 Utvärdering

De granskade testmetodernas förmåga att identifiera hormonstörande effekter för aktuella modellsubstanser har utvärderats bl. a. utifrån följande frågeställningar:

- Från vilka organisatoriska nivåer ("Level 2" till "Level 5" i Conceptual Framework) finns data tillgänglig?
- Vid vilka doser/halter har modellsubstanserna testats, vilka organismer har använts och vilka effektkoncentrationer har erhållits?
- Hur pass samstämmiga är testresultaten från de olika nivåerna och vilka slutsatser kan dras rörande modellsubstansens hormonella effekt om samtliga data beaktas?
- Vilka slutsatser kan dras rörande modellsubstansens hormonella effekt om enbart data som härstammar från tester enligt standardmetoder beaktas?
- Utifrån vad som är känt om modellsubstansens verkningsmekanism, mäter tillgängliga standardmetoder relevanta effektmått ("endpoints")?
- Förekommer positiva resultat från studier med icke standardiserade testmetoder samtidigt med negativa resultat från studier med standardiserade testmetoder?
- Finns det rapporterade effektkoncentration från icke standardiserade tester som underskrider rapporterad NOEC/NOAEL från standardiserade tester?

För modellsubstansen TBT innefattade det insamlade datamaterialet många studier från tester med evertebrater. Detta medförde att TBT utvärderades med ett något annorlunda fokus. För detta redogörs i resultatavsnittet för TBT här nedan.

I Bilaga 2 redovisas en extra utvärdering av DCHP som gjordes för att illustrera hur OECD CF kan användas som ett beslutsstöd för att tolka resultat utifrån befintlig data från standardiserade tester. Denna utvärdering har inte legat till grund för slutsatserna i den här rapporten. I OECD dokumentets sektion C, "Specific Guidance for the Test Guidelines Addressed", finns ett beslutsschema baserat på de "building blocks" under vilka de olika standardiserade testerna har sorterats in. Beslutsschemat följer olika "scenarier" där man utgår från resultatet från ett standardiserat test varefter man beaktar kunskapsläget från andra speciellt viktiga testnivåer. Resultatet av denna utvärdering visar främst vilka tester som behövs för att fylla i rådande kunskapsluckor men en slutsats kring ämnets egenskaper ges också.

## 3 Resultat

### 3.1 Modells substans DCHP

För DCHP var dataunderlaget som erhöles vid sökningen i de aktuella databaserna inte mera omfattande än att samtliga 37 relevanta publikationer kunde registreras. Från dessa publikationer extraherades data från 41 stycken genomförda tester från 23 publikationer. Sammanställd data och referenser redovisas i Bilaga 3. Andelen standardiserade testförfaranden av dessa var 14 st. Övergripande resultat visas, för de standardiserade testmetoderna i Tabell 3.1 och

Tabell 3.2 och, för de icke-standardiserade metoderna i Tabell 3.3 och Tabell 3.4.

Tabell 3.1 Standardiserade tester för hormonell effekt av DCHP, antal

Testnivå (organisatorisk)	Hormonell effekt påvisad	Hormonell effekt ej påvisad	Totalt antal studier
Level 2	3	1	4
Level 3	3	5	8
Level 4	-	-	-
Level 5	2	-	2
summa	8	6	14

Tabell 3.2 Standardiserade tester för hormonell effekt av DCHP, koncentrationer

Testnivå (organisatorisk)	Hormonell effekt påvisad (lägsta observerade effektkoncentration)	Hormonell effekt ej påvisad (lägsta och högsta testade koncentration)
Level 2	1 µM, (0,3 mg/l) EC50	5-500 µM (1,7 – 170 mg/l)
Level 3	4,4 µg/l, LOEC	0,4-35,8 µg/l; 2-200 mg/kg
Level 4		
Level 5	1200 mg/kg i foder, LOEC	

Med standardiserat celltest (OPPTS 890.1250 och OPPTS 890.1150) kunde det visas att DCHP har förmågan att binda in till ER(Satoh 2001, Nakai 1999) och även till AR (Satoh

2001). Den sistnämnda studien rapporterade att DCHP hade en delvis inhiberande effekt i konkurrens med testosteron men inget värde på affinitet till AR rapporterades. De standardiserade fisktester som genomförts (21-dagars, TG 230) ger olika bedömning beroende på vilket effektmått som beaktas (Dang 2011). För TG 230 är biomarkören vitellogenin ett känsligare effektmått (LOEC = 4,4µg/L) i jämförelse med gonado-somatiskt index (LOEC = 35,8µg/L). I samma standardtest är kläckning, tid till kläckning och lever-somatiskt index exempel på mindre känsliga effektmått. Reproduktionstoxicitet påvisades för DCHP i standardmetod (TG 416) över flera generationer med råttor (Hoshino 2005). I den studien var LOEC = 1200mg/kg i foder.

Inga standardiserade tester från Level 4 ingick i datamaterialet för DCHP.

Tabell 3.3 Icke-standardiserade tester för hormonell effekt av DCHP, antal

Testnivå (organisatorisk)	Hormonell effekt påvisad	Hormonell effekt ej påvisad	Totalt antal studier
Level 2	13	4	17
Level 3	5	3	8
Level 4	1	-	1
Level 5	1	-	1
summa	20	7	27

Tabell 3.4 Icke-standardiserade tester för hormonell effekt av DCHP, koncentrationer

Testnivå (organisatorisk)	Hormonell effekt påvisad (lägsta observerade effektkoncentration)	Hormonell effekt ej påvisad (lägsta och högsta testade koncentration)
Level 2	0,1 nM, LOEC	0,1-300 µM
Level 3	29 µg/kg LOEC	600-2500 mg/kg/d
Level 4	500 mg/kg/d LOEC	
Level 5	100 mg/kg/d LOEC	

Bland de icke standardiserade testerna noterades den extremt låga effektkoncentrationen av 0,1 nM i ett *in vitro* test där DCHP hade en indirekt påverkan på differentiering av fettceller (Sargis 2010). Hyperaktivitet påvisades för råttor som injicerats ("intracisternal injection") med 29 µg/kg DCHP (Ishido 2004). Den sistnämnda studien har dock liten relevans för human exponering då injektion skedde direkt i hjärnan.

Icke-standardiserade tester med råttor visade på reproduktionstoxiska effekter efter exponering för 500 mg/kg/d (Yamasaki 2009). Exponering skedde under fosterstadiet och 20 dagar efter födsel. Effekter uppstod hos avkomman i form av påverkan på ett flertal fysiologiska parametrar.

En litteratursökning efter epidemiologiska publikationer kring DCHP och dess metabolit MCHP har genomförts. DCHP påträffas hos människa om än kanske i mindre omfattning än andra ftalater. I bröstmjölk har DCHP detekterats i 17 procent av 78 prov vilket kan jämföras med att DEHP detekterades i 70 procent av samma prov (Fromme 2011). Metaboliten MCHP har detekterats i urin i en svensk studie (Sweco 2010) och även med viss låg detektionsfrekvens i andra studier (Fergusen 2011). Metaboliten detekterades dock inte i blodet hos någon av de 1016 stycken undersökta 70-åringar i en annan svensk studie (Olsen 2012). I en tysk studie detekterades inte heller MCHP i urin hos mödrar eller deras barn (Kasper-Sonnenberg 2001).

Enstaka specifika epidemiologiska studier kring humana effekter och DCHP/MCHP hittades i litteraturstudien. Förekomst av MCHP i urinen hos män kunde inte korreleras med spermiekvalitet, spermiekoncentration (Duty 2003a) eller med DNA skador på spermier (Duty 2003b). I en sammanställning över humana hälsoeffekter relaterad till generell exponering av ftalater, hävdas att vissa påvisade toxiska effekter överensstämmer med vad som påvisats vid djurförsök (Matsumoto 2008). Det finns ett fåtal publikationer som visar på samband mellan förekomst av andra ftalater och effektmått som inte är relaterade till reproduktion. Ett par tvärsnittstudier pekar på samband med fetma (Hatch *et al.* 2008, Hatch *et al.* 2010 och Stahlhut *et al.* 2007) och en publikation påvisar samband med åderförkalkning hos äldre (Lind 2011). Matsumoto *et al.* (2008) sammanfattar vidare att det inte är möjligt att avgöra om den humana påverkan även har effekt på human reproduktion. Detta påstående kan väl sägas sammanfatta det bristande kunskapsläget för många av de ämnen som visats ha hormonstörande effekter på försöksdjur.

### **3.2 Modells substans Genistein**

För genistein var dataunderlaget som erhöles vid sökningen i de aktuella databaserna omfattande. Projektets omfattning tillät inte att samtliga inhämtade artiklar kunde granskas. Från 17 publikationer registrerades resultat från 115 stycken genomförda tester i databasen. Sammanställd data och referenser redovisas i Bilaga 4. Andelen standardiserade testförfaranden av dessa var 16 st. Övergripande resultaten för utvärdering av genistein med standardiserade testmetoder visas i Tabell 3.5 och Tabell 3.6. Resultaten för de icke-standardiserade metoderna redovisas i Tabell 3.7 och Tabell 3.8.

Tabell 3.5 Standardiserade tester för hormonell effekt av genistein, antal

Testnivå (organisatorisk)	Hormonell effekt påvisad	Hormonell effekt ej påvisad	Totalt antal studier
Level 2	2	0	2
Level 3	1	0	1
Level 4	5	8	13
Level 5	-	-	0
Summa	8	8	16

Tabell 3.6 Standardiserade tester för hormonell effekt av genistein, koncentrationer

Testnivå (organisatorisk)	Hormonell effekt påvisad (lägsta observerade effekt-koncentration)	Hormonell effekt ej påvisad (lägsta och högsta testade koncentration)
Level 2	10000 µg/l, LOEC	
Level 3	20 mg/kg, LOAED	2-20 mg/kg
Level 4	400 mg/kg b.w	120-1000 mg/kg b.w
Level 5	-	-

*In vitro* assay H295R för studie av steroidogenes är likvärdig med TG 456 (draft) och denna visade att genistein har påverkan på steroidogenes vid en koncentration av 10 000 µg/l (Hecker 2011). Effekt på livmoder upptäcktes efter 3 dagars upprepade subkutan injektion av 20 mg/kg genistein, i standardiserat försök enligt TG 440 (Yamasaki 2002). Enligt TG 440 kan både oral dosering och subkutan injektion användas men man bör välja den metod som bäst efterliknar trolig human exponering. Standardmetod TG 407, där råttor exponeras oralt under 28 dagar, har granskats i en sammanställning av Gelbke (2007). En mängd olika effektmått användes och den känsligaste observationen var histologisk undersökning av vagina och livmoder (400 mg/kg b.w.). Inga standardiserade studier från Level 5 har hittats för genistein.

Tabell 3.7 Icke-standardiserade tester för hormonell effekt av genistein, antal

Testnivå (organisatorisk)	Hormonell effekt påvisad	Hormonell effekt ej påvisad	Totalt antal studier
Level 2	3	3	6
Level 3	2	2	4
Level 4	52	25	77
Level 5	4	8	12
summa			99

Tabell 3.8 Icke-standardiserade tester för hormonell effekt av genistein, koncentrationer

Testnivå (organisatorisk)	Hormonell effekt påvisad (lägsta observerade effekt-koncentration)	Hormonell effekt ej påvisad (lägsta och högsta testade koncentration)
Level 2	27 µg/l LOEC	0,027 µg/l - 27 mg/l
Level 3	10 mg/kg b.w, s.c	10 - 70 mg/kg b.w
Level 4	3 mg/kg b.w LOED	0,6 – 500 mg/kg b.w
Level 5	0,4 mg/kg b.w LOED	0,4 – 40 mg/kg b.w

Av de icke standardiserade celltesterna för påverkan på hormonproduktion hade det känsligaste testet en lägsta effekt-koncentration på 27 µg/l (Myllymäki 2005). Celltester med jästceller (YES och YAS) uppvisade ingen androgen effekt, ingen anti-androgen effekt och ingen anti-östrogen effekt vid testade koncentrationer från 0,27 µg/l upp till 27 mg/l (Kolle 2010). I samma studie påvisades dock en svag östrogen effekt. (Endast en studie innehållande två resultat har registrerats för icke-standardiserat test på level 3. Den studien var ganska lik Uterotropic assay TG 440 och resultaten visade att hormonkoncentrationer var ett känsligare effektmått än fysiologiska effekter på livmoder (Bliedtner 2010).

Ett större antal resultat kunde registrerats för icke standardiserade *in-vivo* försök. Det rör sig om resultat hämtade från 14 olika publikationer. Många olika effektmått har beaktats och både många positiva och många negativa resultat observerades. Bland de standardiserade testerna var lägsta LOEC 400 mg/kg b.w. Bland de rapporterade värden på LOEC som fanns att tillgå för de icke standardiserade testerna var de i 24 av 35 fall lägre än 400 mg/kg b.w. Lägsta effektdosen (3 mg/kg b.w.) på Level 4 påvisades när råttor exponerades som embryos och postnalt varefter histologisk undersökning genomfördes av bröstkörtel (Declos 2001). Resultaten på level 5 är hämtade från en studie på råttor flera generationer som genomförs av Declos *et al.* (2003). De flesta effektmått visade inte på någon effekt men efter en dos av 0,4



mg/kg b.w. upptäcktes påverkan på vissa känsliga effektmått såsom tidpunkt för vaginal öppning hos avkomman.

Eventuella epidemiologiska effekter av genistein på människa är väldigt omdebatterade. Ofta framhävs att i länder med hög konsumtion av fitoöstrogener har man samtidigt den lägsta förekomsten av bröstcancer (Barnes 1998). Förekomsten av prostatacancer och bröstcancer är högre i Norra Europa i jämförelse med Asien samtidigt som koncentrationen av genistein och andra isoflavoner är högre i blod och urin hos den asiatiska befolkningen (Adlercreutz 1998). Det hävdas att ett ökat intag av genistein via t.ex. soyaprodukter har en preventiv effekt mot bröstcancer (Adlercreutz 1998). Hämmande effekt av genistein på proliferation av humana prostatacancer celler har visats i cellförsök.

### 3.3 Modells substans TBT

För TBT har 18 artiklar granskats. Projektets omfattning tillät inte att samtliga inhämtade artiklar kunde granskas. Resultat från 81 stycken genomförda tester registrerades i databasen. Sammanställd data och referenser redovisas i Bilaga 5.

Datamaterialet från tester på hormonstörande effekter av TBT har sammanställts på ett annorlunda sätt jämfört med de två föregående modells substanserna. Detta var nödvändigt då förutsättningarna var annorlunda.

Det finns väldigt mycket data för TBT men relativt få studier på däggdjur och inga epidemiologiska studier. Inte oväntat är många studier utförda på mollusker. Detta var väntat då TBT är mest uppmärksammat för de toxiska egenskaper som uppvisats på ryggradslösa djur. Arbetet inom OECD att standardisera tester för att utvärdera hormonstörande egenskaper med t.ex. blötdjur är alltså pågående och inga färdiga riktlinjer finns ännu klara för dessa tester. Bland de granskade artiklarna fanns dock ett antal studier där standardiserade metoder använts in vitro (TG 455, TG 440 och US EPA OPPTS 890.1150) samt i försök med fisk (TG 230 och TG 234). Ett flertal av studierna som genomförts med mollusker som testorganism har möjligen genomförts enligt de riktlinjer som OECD förväntas presentera framöver. Det var dock inte möjligt att i dagsläget klassificera testresultaten som härrörande från standardiserade eller icke standardiserade tester.

Testresultat från studier med TBT har i Tabell 3.9 och Tabell 3.10 sammanställts utifrån testernas relevans för human toxikologi (däggdjur) respektive för ekotoxikologisk relevans (fiskar, kräldjur, evertebrater). Sammanställningen blir då mycket lik indelningen av tester i ”building blocks” enligt OECD GD 150 (se Bilaga 1). Observera att testresultat från standardiserade och icke standardiserade tester därmed har blandats.

Bland granskade studier med mollusker har det varit svårt att klassificera mellan Level 4 och 5 varför dessa testresultat har sammanfogats. Även detta beror på att OECDs standardmetoder fortfarande är under utveckling.

Bland de granskade studierna har testkemikalien tillsatts i olika form. I nedanstående jämförelse har ingen åtskillnad gjorts för om kemikalien som testats har varit tributyltenn, tributyltennklorid eller tributyltennoxid. Angivna koncentrationer är därför ungefärligt men inte exakt jämförbara.

Tabell 3.9 Tester för hormonell effekt av TBT, antal tester

<b><i>In vitro</i></b>					
<b>Testnivå (organisatorisk)</b>	Hormonell effekt påvisad		Hormonell effekt ej påvisad		Totalt antal studier
Level 2	10		3		13
<b><i>In vivo</i></b>					
	Däggdjur		Fiskar, kräddjur, ryggradslösa djur		
	Hormonell effekt påvisad	Hormonell effekt ej påvisad	Hormonell effekt påvisad	Hormonell effekt ej påvisad	Totalt antal studier
Level 3		1	12	5	18
Level 4	18	2	25	5	50
Level 5	-	-			

Tabell 3.10 Tester för hormonell effekt av TBT, koncentrationer

<b><i>In vitro</i></b>					
<b>Testnivå (organisatorisk)</b>	Hormonell effekt påvisad (lägsta observerade effektkoncentration)		Hormonell effekt ej påvisad (lägsta och högsta testade koncentration)		
Level 2	2,5 µg/l LOEC		1 ng/l – 330 mg/l		
<b><i>In vivo</i></b>					
	Däggdjur		Fiskar, kräddjur, ryggradslösa djur		
	Hormonell effekt påvisad (lägsta observerade effektkoncentration)	Hormonell effekt ej påvisad (lägsta och högsta testade koncentration)	Hormonell effekt påvisad (lägsta observerade effektkoncentration)	Hormonell effekt ej påvisad (lägsta och högsta testade koncentration)	
Level 3	-	2 – 200 mg/kg/d	0,02 µg/l LOEC	0,02 – 4 µg/l	
Level 4	1 mg/kg LOED	0,5 – 50 mg/kg	0,1 ng/l LOEC	2,4 – 1650 ng/l	
Level 5					

Den känsligaste *in vitro* metoden använde celler från fisknjure och visade påverkan vid tillsats av 2,5 µg/l tributyltenn (Harford 2007). De effekter som påvisades var av immunologisk karaktär där TBT bl.a. påverkade fagocytos. Ingen effekt på livmodervikt hos råttor observerades i standardförsök enligt TG 440 med råttor som exponerades för en dos av 2 – 200 mg/kg/d med tributyltennklorid (Yamasaki 2002). I standardiserade fisktest enligt TG 230 var resultatet beroende av vilket effektmått som studerades (Dang 2011 och SPEED 1998). En koncentration av 0,02-4 mg/l tributyltennklorid hade ingen effekt på gonadvikt eller kläckningsgrad. Däremot fanns mätbara effekter på lever.

Lägst effektkoncentration (1 mg/kg) för studier med relevans för mänsklig hälsa påvisades i en studie där råttor som exponerades under fosterstadier visade en högre grad av beteendestörning (Gardlund 1991).

Inga standardiserade försök med däggdjur enligt TG 443 eller TG 416 påträffades trots en riktad sökning. Zebrafisk som utsattes för 0,1 ng/l av tributyltenn uppvisade en förskjuten könkvot med en överrepresentation av hanfisk (McAllister 2003)

Epidemiologiska studier rörande TBT är relevanta då ämnet bevisligen är en obesogen i experimentella försök men epidemiologiska studier av samband mellan tennorganiska föreningar och fetma finns inte rapporterade och är antagligen ej ännu gjorda (Janesick et Blumberg 2011, Grün et Blumberg 2006). I cellmodeller och med studier på både mollusker och på däggdjur har det visats att TBT påverkar energibalansen genom sin inverkan på fettceller och fettinlagring (Decherf 2011). Försök med råttor har visat att exponering under fosterstadiet leder till permanent fysiologisk påverkan och ökad risk för övervikt (Newbold 2009). I denna artikel hävdas det dock att det epidemiologiska dataunderlaget rörande TBT är mycket begränsat.

## 4 Diskussion

### 4.1 De granskade testmetodernas förmåga att identifiera hormonstörande effekter av DCHP

Om endast kvalitativa resultat (påvisade hormonella effekter eller ej) beaktas är det osäkert att dra några slutsatser kring betydelsen av *in-vivo* studier kontra *in-vitro* studier då datamaterialet är för litet för den sista gruppen av studier.

Litteraturstudien visar att för *in vitro* studier på CF Level 2 är det uppenbart att det finns en risk att missa lågdoseffekter om inte tillräckligt låga halter testas. Bland de granskade studierna som inte fann några hormonella effekter *in vitro* så är den lägst testade koncentrationen fortfarande högre än observerad LOEC i studier som påvisat hormonell effekt. Detta gäller både för de standardiserade metoderna och för de icke-standardiserade. Särskilt stor risk finns att missa lågdos-effekter för de ämnen som uppvisar en icke-linjär dos-effekt kurva. En studie har visat att DCHP har en icke-linjär dos-effekt kurva när det gäller inbindningen till ER (Nakai 1999). I vissa fall beror detta fenomen på att man i studien observerar resultatet av olika molekylära interaktioner samtidigt, som t.ex. ett östrogen ämnes inbindning till både ERalfa och ERbeta. I metoden som användes av Nakai så uttrycktes dock endast ERalfa och förklaringen till den icke-linjära dos-effekt kurvan måste därför sökas på annat håll. Vid användandet av standardiserade *in vitro* tester som EPA OPPTS 890.1250 (ER) och EPA OPPTS 890.1150 (AR) är det således mycket viktigt att man testat ett mycket brett spann av koncentrationer av det aktuella ämnet.

Den extremt låga effektkoncentrationen på 0,1 nM (Tabell 4.4) som observerades vid ett av de icke-standardiserade *in vitro* testerna är ett exempel på en mycket specifik mekanistisk verkan genom GR (Sargis 2010). Hormonstörande ämnens eventuella bidrag till övervikt är ett mycket hett forskningsområde. Om det funnits ett utvecklat *in vitro* standardtest för screening av ämnen som misstänks påverka GR, och detta hade använts för att testa DCHP, så hade interaktion som påvisades av Sargis troligen förbisetts. Detta beror på den mycket specifika verkningsmekanismen och visar därmed att kompletterande *in vitro* tester är viktiga för mekanistisk förståelse.

En jämförelse mellan standardiserade och icke standardiserade tester på level 5 är inte möjlig då de aktuella exponeringsdosererna inte är angivna på ett jämförbart sätt.

## **4.2 De granskade testmetodernas förmåga att identifiera hormonstörande effekter av genistein**

Både de standardiserade och de icke-standardiserade *in vitro* testerna visade att genistein kan påverka steroidogenes. Det är möjligt att genistein i dessa tester har en icke-linjär dosrespons (Myllymäki 2005). Myllymäki *et al.* använde ett celltest med hormonproducerande follikelceller från äggstockarna av en råtta för att studera ämnens effekt på hormonproduktion. Lägsta effektkoncentration för genistein var 27 µg/l då tillsatsen av ämnet hade en negativ effekt på estradiolproduktion. Samtidigt hade en koncentration av 270 µg/ml en positiv effekt på estradiolproduktion. Mest slående är dock att det icke standardiserade testet för påverkan på steroidogenes med celler från råtta är 1000 gånger känsligare än TG 456 (H295R). En möjlig förklaring kan vara att i det känsligare icke-standardiserade testet tillsätter man follikelstimulerande hormon (FSH). Det framkommer här att det finns en risk att missa lågdoseffekter av genistein i celltester om man förlitar sig till standardiserade metoder. I det aktuella datamaterialet har den standardiserade metoden ett NOEC som ligger över LOEC för icke-standardiserat test.

Många icke standardiserade *in-vivo* studier fanns tillgängliga för genistein och bland dessa fanns en stor variation med både positiva och negativa kvalitativa resultat. De kvantitativa resultaten för testerna i Level 3 och 4 visar att lägst effektkoncentrationer har registrerats bland de icke-standardiserade testerna. Skillnaderna i utförande, mellan de granskade standardiserade testerna med råtta på Level 4 (TG 407), och det icke standardiserade tester med råtta som bedömts vara på Level 4 är att de sistnämnda har använt sig av längre exponeringstider. Gelbke *et al.* (2007) jämförde dessa typer av tester och drog två slutsatser: 1) att förlänga testerna utöver de standardiserade 28 dagarna ökar troligen inte chanserna att upptäcka hormonstörande effekter i försöksdjuren, 2) försöksdjur som utsätts för prenatal exponering av mindre potenta hormonstörande kemikalier är känsligare än de djur som exponeras som unga enligt rekommendationerna i TG 407. Dessa resultat sammanfattas bäst genom att poängtera att tiden för exponeringsförsök bör innefatta känsliga ”fönster”. Den slutsatsen dras även i EU:s rapport om hormonstörande ämnen (Kortenkamp *et al.*, 2011).

## **4.3 De granskade testmetodernas förmåga att identifiera hormonstörande effekter av TBT**

Granskningen av TBT fokuserade inte på skillnader mellan standardiserade metoder och icke standardiserade metoder på grund av att det fortfarande saknas riktlinjer hur dessa skall utföras för ryggradslösa djur. Skillnaderna mellan tester på däggdjur och övriga testorganismer var mycket tydlig för TBT. Trots att påverkan på beteende kunde påvisas på

råtta som utsattes för låga halter av TBT under fosterstadiet så är det först med tester som använder fisk eller evertebrater som de extremt låga effektkoncentrationerna blir synliga. Detta är väl kartlagda effekter inte minst när det gäller påverkan på gastropoder. Redan vid så låga halter som 3,4 ng/l så påvisades effekter på en gastropod (*Potamopyrgus antipodarum*) som av Matthiessen (2008) framhålls som en art väl lämpad för fortsatt användning inom toxicitetstester och screening av hormonstörande ämnen. Något mer förvånande var att den allra lägsta effektkoncentrationen var rapporterad från försök med fisk. Exponering för 0,1 ng/l av TBT, i ett försök som väl överensstämmer med standardtest TG 234 (draft), resulterade i en förskjutet könsfördelning hos zebrafisk (McAllister 2003).

#### **4.4 Övergripande diskussion kring testmetoder**

Det bör poängteras att flertalet av de standardiserade metoder som omnämns här inte har tagits fram specifikt för att studera hormonstörande effekter. Många av metoderna har från början tagits fram för att studera både akuta och kroniska effekter och sedan har effektmått med hormonell relevans lagts till efterhand.

Det pågående arbetet med att ta fram standardiserade tester för mollusker är mycket betydelsefullt. Detta framgår med extra tydlighet för modellsubstansen TBT i den föreliggande sammanställningen. Mathiessen (2008) hävdar att de metoder som hittills har tagits fram av OECD med största sannolikhet inte hade kunnat förutspå den massiva påverkan som TBT har på evertebrater i miljön.

Generellt är arbetet med att färdigställa standardiserade testmetoder för evertebrater viktigt. De korta generationscyklerna gör dessa testsystem överlägsna när det gäller att på ett snabbt sätt testa kroniska effekter över en eller flera generationer. En annan fördel med evertebrater är de etiska vinsterna i att minimera användandet av vertebrater, något som är önskvärt enligt den Europeiska Kemikalielagstiftningen, Reach. Med tanke på det mycket omfattande arbetet, inom ramen för Reach, att utvärdera kemikalier, så är utvecklingen av alternativa testmetoder som t.ex. *in vitro* metoder och test på evertebrater viktig.

Det finns dock möjligen en konflikt i utvecklingen av nya testmetoder med evertebrater. Å ena sidan pekar utvecklingen mot att det behövs flera standardiserade tester med evertebrater men å andra sidan är det osäkert om ett positivt resultat från kroniska tester med dessa djurgrupper alltid är en hormonstörande effekt. Kanske rör det sig om andra kroniska effekter. Hormonsystemen hos dessa djurarter är än så länge alltför dåligt kartlagda.

#### **4.5 Definitioner av EDCs i relation till de granskade modellsubstanserna**

Underlaget som tagits fram för de tre granskade modellsubstanserna har jämförts med fyra olika tolkningarna på definitioner av EDCs.

##### **4.5.1 Bundesinstitut für Risikobewertung, Joint DE-UK position paper (2011)**

De föreslagna kriterierna från Tyskland och Storbritannien har ett smalare fokus i jämförelse med andra föreslagna kriterier nedan. För det första ligger fokus på human hälsa. För det andra har förslaget tagits fram för att användas för kemikalier för vilka det finns ett stort dataunderlag. För det tredje påpekas i förslaget att regleringen av kemikalier enligt de föreslagna kriterierna kan ha potentiellt stor ekonomisk påverkan. Därför anser man att

klassande av kemikalie som hormonstörande bör förbehållas de kemikalier där egenskapen är väl fastslagen samt en uttalad del av ämnets totala riskprofil.

Föreslagna kriterier är till för att identifiera ”...an ED of very high regulatory concern”. Bland kriterierna läggs tonvikt på att de påvisade effekterna skall vara av oåterkallelig/allvarlig natur (”adverse”) samt att man skall förlita sig på standardiserade tester ”...studies must be conducted to an acceptable protocol and to good standards and be well reported”

DCHP uppfyller tre av fyra kriterier listade på sidan 8 i förslaget. Det sista kriteriet hänvisar till effektkoncentrationer listade på sidan 7. DCHP är enligt dessa kriterier inte ett tillräckligt potent hormonstörande ämne för att betraktas som ett angeläget hormonstörande ämne. Om påverkan på beteende som visats vid låga effektkoncentrationer, bedöms som en allvarlig effekt, blir bedömningen dock en annan.

Genistein uppfyller på samma sätt de tre första kriterierna. Inte heller genistein är ett tillräckligt potent hormonstörande ämne för att uppfylla det fjärde kriteriet när effektkoncentrationerna beaktas i relation till andra välkända hormonstörande ämnen.

TBT uppfyller samtliga kriterier och är därmed ett angeläget hormonstörande ämne.

#### **4.5.2 Danish Ministry of the Environment (2011)**

Föreslagna kriterier på sidan 7 indelar ämnen i tre kategorier: 1) påvisat hormonstörande ämne, 2a) misstänkt hormonstörande ämne och 2b) ämne med indikativa resultat på hormonstörande egenskaper. Fokus läggs i den beskrivande texten på de av OECD standardiserade testmetoderna samt även vilken testnivå (Level) som resultaten härstammar ifrån.

DCHP uppfyller kriterierna enligt kategori 1 då effekter visats med TG 416 på Level 5. Liksom i fallet då DCHP utvärderas enligt kriterierna i Joint DE-UK position paper (2011) så är det avgörande om det aktuella effektmåttet är att betrakta som en allvarlig effekt. I den aktuella studien påvisades t.ex. effekt på reproduktiva organ men inte på reproduktion (Hoshino 2005).

För genistein saknas i det aktuella dataunderlag tillräckligt med data från standardiserade tester på Level 3, 4 och 5 för att ämnet skall kunna uppfylla de aktuella kriterierna. Här är det aktuellt att betrakta epidemiologisk data som ett komplement. Att utvärdera det aktuella epidemiologiska dataunderlaget för att avgöra om genistein därmed kvalificerar sig som ett påvisat eller misstänkt hormonstörande ämne enligt de Danska kriterierna är ett mycket omfattande arbete som inte kunde genomföras i föreliggande studie.

TBT tas i den danska skriften upp som ett exempel på ett ämne som enligt de föreslagna kriterierna kvalificerar sig som ett påvisat hormonstörande ämne i kategori 1. Här anses att fältdata i vissa fall är tillräckligt då det visar en väldefinierad koppling mellan biologisk effekt och exponering.

#### **4.5.3 PAN Pesticide Action Network (2011)**

I detta förslag menar man att det i REACH uttryckligen står att kriterierna skall gälla för att identifiera *hormonstörande egenskaper* hos kemiska ämnen. Därför menar man att en strävan att definiera en *hormonstörande kemikalie*, enligt t.ex. WHO/IPCS, inte bara är meningslös

utan också rent odemokratisk. Detta förslag skiljer sig därför väsentligt från förslaget från Tyskland och Storbritannien. De föreslagna kriterierna tar fasta på försiktighetsprincipen och betonar att: *“..chemicals with endocrine disrupting properties cannot access the market if they may cause adverse effects.”* Vidare uttrycks åsikten att allvarlig effekt skall definieras som *“any significant biochemical alterations, following dosing with the chemical during key development stages that is above background or averages in testing”*. Den försiktiga hållningen är också tydlig i det att man inte anser att mekanismen för den hormonstörande effekten behöver vara fastslagen för att ett ämne skall uppfylla kriterierna.

Enligt dessa kriterier kan samtliga tre modellsubstanser klassificeras som hormonstörande.

#### **4.5.4 ECETOC (2009)**

Detta underlag är mycket omfattande och innefattar vägledande strategier i form av beslutsscheman. Både standardiserade tester och insamlande av data från peer review papers beaktas.

För DCHP följdes beslutsschema i kapitel 4 och slutsatsen är att ämnet uppfyller kriterierna för ett hormonstörande ämne enligt Weybridge-definitionen (Weybridge 1996). Enligt det föreslagna beslutsschemat skall man i detta läge fortsätta med att utvärdera hur potent ämnet är. Testresultat från däggdjur pekar i det här fallet på att ämnet är relativt potent men detta är återigen beroende av vilka effekter som skall betraktas som bestående och allvarliga. Om man betraktar effektkoncentrationer vid tester med relevans för ekologiska risker kan DCHP betraktas som ungefär likvärdigt potent som 4-nonylfenol.

Genistein används i ECETOCs dokument som ett exempel för att illustrera den föreslagna arbetsgången. Ämnet uppfyller kriterierna för ett hormonstörande ämne enligt Weybridge-definitionen (Weybridge 1996). Genisteins potens sätts i det illustrerade exemplet i relation till den normala halten av 17-beta-estradiol i människa. Vidare hänvisas till att man bör riskbedöma genistein utifrån människans konsumtionsmönster. Epidemiologiska data är därmed relevanta i detta fall, liksom i fallet ovan då kriterierna föreslagna av danska miljöstyrelsen tillämpas.

TBT uppfyller kriterierna för ett hormonstörande ämne enligt Weybridge-definitionen (Weybridge 1996). Vidare är det väl fastslaget att TBT är ett väldigt potent ämne särskilt om man betraktar testresultat med ekotoxikologisk relevans.

## **5 Slutsatser**

Det har mindre betydelse för resultatet om en studie har följt exakta anvisningar enligt en standardiserad testmetod enligt OECDs Test Guidelines eller inte. Det är snarare valet av effektmått som blir avgörande för om hormonstörande egenskaper upptäcks.

Det har större betydelse om resultat härrör från en standardmetod vid utvärdering av en kemikalie enligt föreslagna kriterier. Detta då det enligt kriterierna ofta krävs positiva resultat från specifika testnivåer enligt OECD för att fastställa hormonstörande egenskaper.

Standardiserade testmetoder för utvärdering av misstänkt hormonstörande ämnen är en viktig förutsättning för att ett ämne skall kunna bedömmas likvärdigt i olika länder. Exempel på sådana testmetoder är OECD Test Guidelines som omfattas av en lagligt bindande överenskommelse, den s.k. ”Mutual acceptance of data” (MAD). OECD har också tagit fram

ett vägledningsdokument som stöd för myndigheternas tolkning av resultat från de testmetoder för hormonstörande egenskaper som idag ingår i ”OECD Conceptual Framework”. OECD:s testmetoder införs i sak oförändrade i EU:s regelverk. Utvecklingen av nya testmetoder måste dock ske genom att införa känsligare ”endpoints” och för att kunna identifiera hormonella effekter på de delar av hormonsystemet som inte omfattas av befintliga standardiserade metoder.

Icke-standardiserade tester är viktiga att beakta när en kemikalie utvärderas. Utvärderingen bör därför ske ”case-by-case” och innefatta både standardiserade tester och icke-standardiserade tester.

Det är viktigt att misstänkt hormonstörande kemikalier utvärderas inom ett mycket brett koncentrationsspektrum då många ämnen inte har ett linjärt dos-responsförhållande. Görs inte detta finns det en uppenbar risk att kemikalier klassas som ofarliga trots att de har hormonstörande effekter. Den väletablerade dogmen att ”dosen gör giften” kan visserligen stämma när akuttoxiska effekter utvärderas i testsystem men för hormonstörande kemikalier är det en alltför grov förenkling.

Det är viktigt att exponeringsförsök innefattar en testorganisms kritiska utvecklingsstadier. Görs inte detta finns det en uppenbar risk att kemikalier klassas som ofarliga trots att de har hormonstörande effekter.

Standardiserade tester täcker in de mest kartlagda verkansmekanismerna för hormonstörande ämnen genom s.k. EATS – hormonstörande effekter via östrogenpåverkan, androgenpåverkan, thyroïdpåverkan eller påverkan på steroidogenes. Detta innebär stor osäkerhet kring hormonella effekter som medieras t.ex. via glucocorticoid receptor eller via andra, icke receptormedierade, reaktionsvägar. Kompletterande forskning med en bred ansats är därför mycket viktig för att kunna upptäcka hormonstörande ämnen.

I den vetenskapliga litteraturen saknas det i stort sett epidemiologiska studier som är utformade på ett sätt så att de går att använda i riskbedömning av misstänkt hormonstörande kemikalier. Det statistiska underlaget är för litet för de sjukdomstillstånd man velat studera. Ofta är det tvärsnittsstudier eller fall-kontroll studier där risk föreligger att felaktiga slutsatser dras genom s.k. ”reverse causation”. Vidare saknas uppföljande prospektiva studier.

PAN - Pesticide Action Network Europe tar fasta på försiktighetsprincipen och de föreslagna kriterierna är därmed den ”strängaste” tillämpningen av kriterier för hormonstörande ämnen.

Tillämpning av kriterier enligt Joint DE-UK position paper eller enligt Danska Miljöministeriet innebär att samma definition av ”adverse effects” enligt WHO/IPCS 2004 används. En stor skillnad är dock att enligt det danska förslaget skall inte ett ämnes potens beaktas.

Danska Miljöministeriet vill att man liksom för CMR-ämnen skall undvika att använda tröskelvärden för hormonstörande ämnen och därmed inte beakta potens. Detta för att ta hänsyn till att tidpunkten för exponering av hormonstörande ämnen är väl så avgörande som den aktuella koncentrationen. Dessutom innebär en sådan hållning att bättre hänsyn tas för additiva och synergistiska effekter vid samtidig exponering för flera hormonstörande ämnen.

Både ECETOC och Joint DE-UK föreslår i stället att ett ämnes potens skall beaktas. Tillämpning av kriterier enligt ECETOC innebär en tydlig beslutsgång för att fastställa



hormonstörande egenskaper men processen är svårare att tyda när det gäller att fastställa hur potent ett ämne är. Förslaget enligt Joint DE-UK innebär att stor tonvikt läggs på standardiserade tester. En inriktning mot endast standardiserade OECD-metoder innebär lättare jämförelser ämnen emellan samt underlättar MAD men innebär samtidigt risker. Föreliggande litteraturstudie visar klart att de lägsta effektkoncentrationerna i många fall har erhållits med icke standardiserade metoder. För hormonella effekter utöver EATS är det nödvändigt att beakta icke-standardiserade metoder och/eller inkludera nya effektmått (endpoints). Detta visar på vikten av att fortsätta att utveckla och validera testmetoder som innefattar nya effektmått. Det danska förslaget (Danish Ministry of the Environment. 2011) öppnar upp för att man skall beakta forskningsresultat från alternativa metoder och användandet av flera alternativa vägar för att upptäcka hormonstörande kemikalier.

## 6 Referenser

Adlercreutz, H. 1998. Epidemiology of phytoestrogens. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, December 1998: (Volume 12, Issue 4) p. 605-623

Barnes, S. 1998. Phytoestrogens and breast cancer. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, December 1998: (Volume 12, Issue 4) p. 559-579.

Bliedtner, A., Zierau, O., Albrecht, S., Liebhaber, S., Vollmer, G. (2010), Effects of genistein and estrogen receptor subtype-specific agonists in ArKO mice following different administration routes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 314, 41–52

Bundesinstitut für Risikobewertung. 2011. Joint DE-UK position paper - Regulatory definition of an endocrine disrupter in relation to potential threat to human health.

Dang, Z; Li, K; Yin, H; Hakkert, B; Vermeire, T. 2011. Endpoint sensitivity in fish endocrine disruption assays: Regulatory implications. *Toxicology Letters*, Volume 202, Issue 1, 10 April 2011, Pages 36-46.

Danish Ministry of the Environment. 2011. Establishment of criteria for endocrine disruptors and options for regulation.

Declos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, Newbold RR (2001) Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague–Dawley) rats. *Reprod Toxicol* 15:647–663

Declos KB, Weis CC, Olson G, Bucci TJ, Newbold RR (2003) A five generation reproductive toxicity assessment of the soy isoflavone genistein in CD Sprague–Dawley rats. *Toxicol Sci* 72(Suppl 1):76

Decherf, S; Demeneix B. 2011. The obesogen hypothesis: a shift of focus from the periphery to the hypothalamus. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part B*. Vol 14, 423-448.

Duty, S.M., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Chen, Z., Herrick, R.F., Christiani, D.C., Hauser, R., 2003a. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 14, 269–277.

Duty, S.M., Singh, N.P., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Herrick, R.F., Christiani, D.C., Hauser, R., 2003b. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ. Health Perspect.* 111, 1164–1169.

ECETOC - European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. 2009. Guidance on Identifying Endocrine Disrupting Effects. ECETOC TECHNICAL REPORT No. 106.

Kortenkamp, A., Martin, O., Faust, M., Evans, R., McKinlay, R., Orton, F. and Rosivatz, E. 2011. STATE OF THE ART ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTERS Final Report Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3.

EU 1. 2000. Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption - preparation of a candidate list of substances as a basis for priority setting. Report to EUROPEAN COMMISSION DG ENV by BKH Consulting Engineers, Delft, The Netherlands, authors : Ch. Groshart, P.C. Okkerman

Ferguson, K; Loch-Caruso, L; Meeker, J.2011. Urinary phthalate metabolites in relation to biomarkers of inflammation and oxidative stress:NHANES1999–2006. Environmental Research 111 (2011) 718–726.

Gardlund,A.T.,Archer,T.,Danielsson,K.,Danielsson,B.,Fredriksson,A.,Lidqvist,N.G., Lidstrom,H. and Luthman,J. (1991) Effects of prenatal exposure to tributyltin and trihexyltin on behaviour in rats. Neurotoxicol. Teratol.,13,1,99-105.

Gelbke, H-P; Hofmann, A; Owens, J; Freyberger, A. 2007. The enhancement of the subacute repeat dose toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active chemicals: comparison with toxicity tests of longer duration. Arch Toxicol (2007) 81:227–250.

Grün, F; Blumberg, B. 2006. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. Endocrinology, vol 147, s50.

Hårford, A; O'Halloran, K; Wright, P. 2007. Effect of *in vitro* and *in vivo* organotin exposure on the immune functions of murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 26, No. 8, pp. 1649–1656, 2007.

Hatch, E; Nelson, J; Qureshi, M; Weinberg, J; Moore, L; Singer, M; Webster, T. 2008. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. Environ Health. 2008 Jun 3;7:27.

Hatch, E; Nelson, J; Stahlhut, R; Webster, T; 2010. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. Int, J. Androl. Vol 33, 324-332.

Hecker,M., Hollert,H., Cooper,R., Vinggaard,A.M., Akahori,Y., Murphy,M., Nellemann,C., Higley,E., Newsted,J., Laskey,J., Buckalew,A., Grund,S., Maletz,S., Giesy,J., Timm,G. (2011). The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study. Environ Sci Pollut Res 18:503-515

Hoshino, N; Iwai, M; Okazaki, Y. 2005. A two-generation reproductive toxicity study of dicyclohexyl phthalate in rats. The Journal of Toxicological Sciences, Volume 30, Special Issue, 79-96.

Janesick, A; Blumberg, B. 2011. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. Birth Defects Res. C. Embryo. Today, vol 93, 34-50.

Kolle,S.N., Kamp,H.G., Huener,H.-A., Knickel,J., Verlohner,A., Woitkowiak,R., Landsiedel,R., van Ravenzwaay,B. (2010). Toxicology *in Vitro* 24, 2030-2040.

Lind, M; Lind, L. 2011. Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly. Atherosclerosis 218 (2011) 207– 213.

Matsumoto, M; Hirata-Koizumi, M; Ema, M. 2008. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50 (2008) 37–49.

Marca Pereira, P; Wheeler, J; Thorpe, K; Burkhardt-Holm P. 2011. Development of an ex vivo brown trout (*Salmo trutta fario*) gonad culture for assessing chemical effects on steroidogenesis. *Aquat Toxicol.* 2011 Feb;101(3-4):500-11.

McAllister, B; Kime, D. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 65 (2003) 309–316.

Myllymäki S, Haavisto T, Vainio M, Toppari J, Paranko J. 2005. *In vitro* effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-tert-butylphenol, and 4-tert-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles.

Nakai, M; Tabira, Y; Asai, D; Yakabe, Y; Shimyozu, T; Noguchi, M; Takatsuki, M; Shimohigashi, Y. 1999. Binding Characteristics of Dialkyl Phthalates for the Estrogen Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 254, Issue 2, 19 January 1999, Pages 311-314.

Newbold, R; Padilla-Banks, E; Jefferson, W. 2009. Environmental estrogens and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol 304 84-89.

OECD maj 2011. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption Version 11 (May 2011)

OECD sept 2011, Advisory Group on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) of the Test Guidelines Programme. CASE STUDY ON PROCHLORAZ Guidance Document (GD) on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No. 150) 3rd Meeting of the EDTA Advisory Group, 12-13 December 2011.

Olsén, L; Lampa, E; Birkholz, D; Lind, L; Lind, M; 2012. Circulating levels of bisphenol A (BPA) and phthalates in an elderly population in Sweden, based on the Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol 75, 242-248.

PAN Pesticide Action Network. 2011. PAN Europe position paper on criteria for endocrine disrupting pesticides.

Sargis, R; Johnson, D; Choudhury, R; Brady, M;. 2010. Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity* (Silver Spring). 2010 Jul;18(7):1283-8. Epub 2009 Nov 19.

Satoh, K; Nagai, F; Aoki, N. 2001. Several environmental pollutants have binding affinities for both androgen receptor and estrogen receptor alpha. *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*, 47 (5): 495-501 OCT 2001.

SPEED (Strategic Programs on Environmental Endocrine Disrupters). 1998, Japanese Environment Agency (Ministry of the Environment Report on the Test Results of Endocrine Disrupting Effects of Tributyltin (TBT) on Fish (Draft).

Stahlhut, R; van Wijngaarden, E; Dye, T; Cook, S; Swan, S. 2007. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect.* 2007 Jun;115(6):876-82. Epub 2007 Mar 14. Erratum in: *Environ Health Perspect.* 2007 Sep;115(9):A443.

Sweco Environment 2010. Exposure and effect screening in urine of women 1. Metals and metabolites of phthalates, organophosphates pesticides and PAHs 2. Endocrine disturbing effects. Konsultrapport för Naturvårdsverket.

Weybridge. 1996. European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. 2-4 December 1996, Weybridge, UK. Report of Proceedings EUR 17549

Copenhagen, Denmark: European Commission DG XII, April 16, 1997). Available from:

European Environment Agency, Kongens Nytorv 6, DK-1050 Copenhagen K, Denmark .

Yamasaki, K; Takeyoshi, M; Yakabe, Y; Sawaki, M; Imatanaka, N; Takatsuki, M. 2002. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology Volume 170, Issues 1-2, 15 January 2002, Pages 21-30.*

Yamasaki, K; Okuda, H; Takeuchi, T; Minobe, Y. 2009. Effects of in utero through lactational exposure to dicyclohexyl phthalate and p,p '-DDE in Sprague-Dawley rats. *TOXICOLOGY LETTERS*, 189 (1): 14-20 AUG 25 2009.

## 2011 OECD Revised Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters

The Conceptual Framework lists the OECD TGs and standardized test methods available, under development or proposed that can be used to chemicals for endocrine disruption. The Conceptual Framework is intended to provide a guide to the tests available which can provide inform endocrine disrupter's assessment but is not intended to be a testing strategy. This Conceptual Framework does not include evaluation of exposure accordance with the scope of the GD 150 (*i.e.* this GD). Further information regarding the use and interpretation of these tests is available in Document 150.

Mammalian and non mammalian Toxicology		
<p><b>Level 1</b> Existing Data and Non-Test Information</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Physical &amp; chemical properties, e.g., MW reactivity, volatility, biodegradability</li> <li>All available (eco)toxicological data from standardized or non-standardized tests.</li> <li>Read across, chemical categories, QSARs and other <i>in silico</i> predictions, and ADME model predictions</li> </ul>	
<p><b>Level 2</b> <i>In vitro</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s) (Mammalian and non mammalian methods)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estrogen or androgen receptor binding affinity</li> <li>Estrogen receptor transcriptional activation (TG 455)</li> <li>Androgen or thyroid transcriptional activation (If/when TGs are available)</li> <li>Steroidogenesis <i>in vitro</i> (draft TG 456)</li> <li>MCF-7 cell proliferation assays (ER ant/agonist)</li> <li>Other assays as appropriate</li> </ul>	
	Mammalian Toxicology	Non-Mammalian Toxicology
<p><b>Level 3</b> <i>In vivo</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s)<sup>1</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Uterotrophic assay (TG 440)</li> <li>Hershberger assay (TG 441)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Xenopus embryo thyroid signalling assay (When/if TG is available)</li> <li>Amphibian metamorphosis assay (TG 231)</li> <li>Fish Reproductive Screening Assay (TG 229)</li> <li>Fish Screening Assay (TG 230)</li> <li>Androgenized female stickleback screen (GD 140)</li> </ul>
<p><b>Level 4</b> <i>In vivo</i> assays providing data on adverse effects on endocrine relevant endpoints<sup>2</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Repeated dose 28-day study (TG 407)</li> <li>Repeated dose 90-day study (TG 408)</li> <li>1-generation assay (TG 415)</li> <li>Male pubertal assay (see GD 150 [<i>i.e.</i> this GD] Chapter C4.3)<sup>3</sup></li> <li>Female pubertal assay (see GD 150 [<i>i.e.</i> this GD] Chapter C4.4)<sup>3</sup></li> <li>Intact adult male endocrine screening assay (see GD 150 [<i>i.e.</i> this GD] Chapter Annex 2.5)</li> <li>Prenatal developmental toxicity study (TG 414)</li> <li>Chronic toxicity and carcinogenicity studies (TG 451-3)</li> <li>Reproductive screening test (TG 421 if enhanced)</li> <li>Combined 28 day/reproductive screening assay (TG 422 if enhanced)</li> <li>Developmental neurotoxicity (TG 426)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fish sexual development test (Draft TG 234)</li> <li>Fish Reproduction Partial Lifecycle Test (when/if TG is Available)</li> <li>Larval Amphibian Growth &amp; Development Assay (when TG is available)</li> <li>Avian Reproduction Assay (TG 206)</li> <li>Mollusc Partial Lifecycle Assays (when TG is available)<sup>4</sup></li> <li>Chironomid Toxicity Test (TG 218-219)<sup>4</sup></li> </ul>
<p><b>Level 5</b> <i>In vivo</i> assays providing more comprehensive data on adverse effects on endocrine relevant endpoints over more extensive parts of the life cycle of the organism<sup>2</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Extended one-generation reproductive Toxicity Study (draft TG 443)</li> <li>2-Generation assay (TG 416 most recent update)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>FLCTT (Fish LifeCycle Toxicity Test) (when TG is available)</li> <li>Medaka Multigeneration Test (MMGT) (when TG is available)</li> <li>Avian 2 generation reproductive toxicity assay (when TG is available)</li> <li>Mysid Life Cycle Toxicity Test (when TG is available)<sup>4</sup></li> <li>Copepod Reproduction and Development Test (when TG is available)<sup>4</sup></li> <li>Sediment Water Chironomid Life Cycle Toxicity Test (TG 233)<sup>4</sup></li> <li>Mollusc Full Lifecycle Assays (when TG is available)<sup>4</sup></li> <li>Daphnia Reproduction Test (with male induction) (TG 211)<sup>4</sup></li> <li>Daphnia Multigeneration Assay (if TG is available)<sup>4</sup></li> </ul>

<sup>1</sup> Some assays may also provide some evidence of adverse effects.

<sup>2</sup> Effects can be sensitive to more than one mechanism and may be due to non-ED mechanisms.

<sup>3</sup> Depending on the guideline/protocol used, the fact that a substance may interact with a hormone system in these assays does not necessarily mean that when the substance is used it will cause adverse effects in humans or ecological systems.

<sup>4</sup> At present, the available invertebrate assays solely involve apical endpoints which are able to respond to some endocrine disrupters and some non-EDs. Those in Level 4 are partial lifecycle tests, while those in Level 5 are full- or multiple lifecycle tests.

## BILAGA 2

### Utvärdering av DCHP enligt sektion C, "Specific Guidance for the Test Guidelines Addressed", i OECDs vägledande dokument (maj 2011).

Scenario	Resultat från aktuell studie/studier från vilket scenariot utgår.	Tillgängliga övriga resultat från mekanistiska studier, in vitro <sup>a</sup>	Tillgängliga övriga resultat på effekter, in vivo	slutsats
C.2.1.G Utgångspunkt i ER binding Assay (US EPA OPPTS 890.1250)	+ Inbindning till ER (Nakai 1999, Satoh 2001)	Eq/0 Inga resultat från steroidogenestest tillgängliga.	+ Positiva resultat från in vivo (Hoshino 2005)	Då in vivo data härstammar från Level 5, utgör underlaget eventuellt tillräckligt med bevis för att fastslå hormonstörande effekter.
C.2.2.G Utgångspunkt i AR binding Assay (US EPA OPPTS 890.1150)	+ Inbindning till AR (Satoh 2001)	Eq/0 Inga resultat från steroidogenestest tillgängliga.	+ Positiva resultat från in vivo (Hoshino 2005)	Då in vivo data härstammar från Level 5, utgör underlaget eventuellt tillräckligt med bevis för att fastslå hormonstörande effekter.
C.3.2.G Utgångspunkt i TG 230: 21 Day Fish Assay	+ Påvisade effektmått In vivo = VTG, GSI, HSI 21d. (Dang 2011)	Eq/0 Inga resultat från steroidogenestest tillgängliga.	+ Positiva resultat från in vivo (Hoshino 2005)	Starka belägg för endokrin effekt in vivo i fisk men mekanismen obekräftad
C.3.2.P Utgångspunkt i TG 230: 21 Day Fish Assay	- Inga påvisade effektmått In vivo = kläckning, tid för kläckning, VTG 21d, HSI. (Dang 2011)	Eq/0 Inga resultat från steroidogenestest tillgängliga.	+ Positiva resultat från in vivo (Hoshino 2005)	Troligen ej hormonstörande för fisk men osäker bedömning p.g.a bristande insikt om mekanismer samt påvisade effekter in vivo.
C.4.1.P Utgångspunkt i TG 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents	- Ingen effekt på livmodervikt (Yamasaki 2002)	Eq/0 Inga resultat från steroidogenestest tillgängliga.	+ Positiva resultat från in vivo (Hoshino 2005)	Inga bevis för receptormedierad (anti)östrogen effekt. Potentiellt andra hormoneffekter via andra mekanismer.
C.4.6.G Utgångspunkt i TG 416: Two-Generation Reproduction Toxicity Study	+ Reproduktionstoxiska effekter på både föräldrar och avkomma. (Hoshino 2005)	Eq/0 Inga resultat från steroidogenestest tillgängliga.	+ Påvisade effektmått In vivo = VTG, GSI, HSI 21d. (Dang 2011)	Starka bevis för skadliga effekter på reproduktion/utveckling/endokrina organ.
C.4.6.H Utgångspunkt i TG 416: Two-Generation Reproduction Toxicity Study	+ Reproduktionstoxiska effekter på både föräldrar och avkomma. (Hoshino 2005)	Eq/0 Inga resultat från steroidogenestest tillgängliga	- Inga påvisade effektmått In vivo = kläckning, tid för kläckning, VTG 21d, HSI. (Dang 2011)	Starka bevis för skadliga effekter på reproduktion/utveckling/endokrina organ. Ej medierad via EATS eller också krävs metabolisk aktivering av ämnet.

**Bilaga 3 - Sammanställt datamaterial från studier med DCHP**

Ämnesnamn	Testnivå	Kvalitativt resultat	Metod	Endpoint	StandardNr	LOEC	EC 50	PC 50	NOEL	lägsta testade koncentration/dos	högsta testade koncentration/dos	ReferensID
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	ER Binding Assay	displacement of 17-beta estradiol	US EPA OPPTS 890.1250		1 µM			0,0001 µM	10000 µM	29
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	ER Binding Assay	displacement of 17-beta estradiol	US EPA OPPTS 890.1250		2000 µM			0,0001 µM	10000 µM	29
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	ER Binding Assay	displacement of 17-beta estradiol in ER-alfa assay	US EPA OPPTS 890.1250		58 µM			5 µM	500 µM	32
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	AR Binding Assay	displacement of testosterone in AR assay	US EPA OPPTS 890.1150				5 µM	5 µM	500 µM	32
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Human breast cancer MCF-7 cell proliferation	human breast cancer MCF-7 cell proliferation				6 µM E2		0,01 µM	30 µM	12
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Immunological T-cell assay	differentiation of T helper cells, Th2 polarization		3 µM				0,001 µM	3 µM	15
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Human breast cancer MCF-7 cell proliferation	human breast cancer MCF-7 cell proliferation		10 µM			1 µM	1 µM	100 µM	19
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Rat kidney , microsomal protein assay	enzyme activity			33 µM					20
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Chinese Hamster lung fibroplast v79 cell assay	microtubule network					200 µM	10 mM	200 µM	22
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Human kidney, microsomal assay	enzyme activity			46 µM					23
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Xenopus laevis, thyroid hormone inducible screening assay	binding to TRE			11 µM			50 µM	50 µM	26
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Xenopus laevis, thyroid hormone inducible screening assay	gene transcription		20 µM						26
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Glucocorticoid receptor assay with 3T3-Li adipocyte cells	GR mediated luciferase expression		1 µM						28
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Glucocorticoid receptor assay with 3T3-Li adipocyte cells	indirect potentiation of GR mediated adipocyte differentiation		0,1 nM				1 fM	1 µM	28
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Glucocorticoid receptor assay with 3T3-Li adipocyte cells	adipocyte lipid accumulation		0,1 µM						28
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	+	Bovine adrenal medullary cell assay	cytosolic calcium levels mediated by nicotinic acetylcholine receptors			11 µM			0,1 µM	100 µM	33
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	-	Stable Transfected Human Era Transcriptional Activation Assay, human cervical carcinoma cell line	gene transcription								9
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	-	Glucocorticoid receptor assay with 3T3-Li adipocyte cells	GR mediated adipocyte differentiation					0,1 µM		0,1 µM	28
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	-	Macrophage activation assay	lipopolysaccharide-induced activation of the IFN- $\beta$ promoter					100 µM			35
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	-	Macrophage activation assay	lipopolysaccharide-induced activation					100 µM			38
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 2	-	Yeast, ER- $\alpha$ and coactivator TIF2	receptor affinity					0,3 mM			40
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	+	21-day Fish Screening Assay	gonado-somatic index	TG 230	35,8 µg/l				0,4 µg/l	35,8 µg/l	34
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	+	21-day Fish Screening Assay	hepato-somatic index (21 days)	TG 230	38,2 µg/l				0,4 µg/l	35,8 µg/l	34
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	+	21-day Fish Screening Assay	vitellogenin	TG 230	4,4 µg/l				0,4 µg/l	35,8 µg/l	34
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	+	Hyperactivity	behaviour		2,9 mg/kg						10
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	+	DNA macroarray analyses of the midbrain	gene transcription		2,9 mg/kg						10
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	+	Hyperactivity	behaviour		29 µg				0,029 µg	29 µg	11
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	+	Repeated dose oral toxicity in young male rat	effects on liver		500 mg/kg/d				500 mg/kg/d	2500 mg/kg/d	37
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	+	Repeated dose oral toxicity in young male rat	effects on testes		2500 mg/kg/d			250 mg/kg/d	500 mg/kg/d	2500 mg/kg/d	37
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	-	Uterotrophic assay in rodents	uterine weight	TG 440				200 mg/kg	2 mg/kg	200 mg/kg	9
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	hepato-somatic index	TG 230				35,8 µg/L	0,4 µg/l	35,8 µg/l	34
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	time to hatching	TG 230				35,8 µg/L	0,4 µg/l	35,8 µg/l	34
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	hatchability	TG 230				35,8 µg/L	0,4 µg/l	35,8 µg/l	34
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	vitellogenin (21 days)	TG 230				35,8 µg/L	0,4 µg/l	35,8 µg/l	34
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	-	effects in the uterus oral injection in neonatal rats	gene transcription					600 mg/kg BW/d			19
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	-	Repeated dose oral toxicity in young male rat	effects on kidney					2500 mg/kg/d	500 mg/kg/d	2500 mg/kg/d	37
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 3	-	Repeated dose 42-day oral toxicity in female rat	estrus cycle					0,69 g/kg/d			39
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	sexual differentiation		500 mg/kg/d			250 mg/kg/d	250 mg/kg/d	750 mg/kg/d	36
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 5	+	2-generation reproduction toxicity study (most recent update)	reproductive toxicological effects, parents	TG 416	1200 mg/kg (feed)			240 ppm (feed)	240 ppm (feed)	6000 ppm (feed)	18
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 5	+	2-generation reproduction toxicity study (most recent update)	reproductive toxicological effects, offspring	TG 416	1200 mg/kg (feed)			240 ppm (feed)	240 ppm (feed)	6000 ppm (feed)	18
Dicyclohexyl phthalate (DCHP)	Level 5	+	In utero through lactational exposure	sexual differentiation		100 mg/kg/d				20 mg/kg/d	500 mg/kg/d	16



### Bilaga 3 - DCHP

ReferensID	Referensinformation
9	Yamasaki, K; Takeyoshi, M; Yakabe, Y; Sawaki, M; Imatanaka, N; Takatsuki, M. 2002. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. <i>Toxicology Volume 170, Issues 1-2, 15 January 2002, Pages 21-30.</i>
10	Ishido, M; Morita, M; Oka, S; Masuo, Y. 2005. Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. <i>Regulatory Peptides, Volume 126, Issues 1-2, 15 March 2005, Pages 145-153. Satellite Symposium on G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs) (held during the 6th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides).</i>
11	Ishido, M; Masuo, Y; Sayato-Suzuki, J; Oka, S; Niki, E; Morita, M. 2004. Dicyclohexylphthalate causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. <i>Journal of Neurochemistry. 2004 Oct;91(1):69-76.</i>
12	Vanparys, C; Depiereux, S; Nadzialek, S; Robbens, J; Blust, R; Kestemont, P; De Coen, W. 2010. Performance of the flow cytometric E-screen assay in screening estrogenicity of pure compounds and environmental samples. <i>Science of The Total Environment, Volume 408, Issue 20, 15 September 2010, Pages 4451-4460.</i>
15	Kato, T; Tada-Oikawa, S; Takahashi, K; Saito, K; Wang, L; Nishio, A; Hakamada-Taguchi, R; Kawanishi, S; Kuribayashi, K. 2006. Endocrine disruptors that deplete glutathione levels in APC promote Th2 polarization in mice leading to the exacerbation of airway inflammation. <i>European Journal of Immunology, Volume 36, Issue 5, pages 1199–1209, May 2006.</i>
16	Yamasaki, K; Okuda, H; Takeuchi, T; Minobe, Y. 2009. Effects of in utero through lactational exposure to dicyclohexyl phthalate and p,p'-DDE in Sprague-Dawley rats. <i>TOXICOLOGY LETTERS, 189 (1): 14-20 AUG 25 2009.</i>
18	Hoshino, N; Iwai, M; Okazaki, Y. 2005. A two-generation reproductive toxicity study of dicyclohexyl phthalate in rats. <i>The Journal of Toxicological Sciences, Volume 30, Special Issue, 79-96.</i>
19	Hong, E; Ji, Y; Choi, K; Manabe, N; Jeung, E. 2005. Conflict of estrogenic activity by various phthalates between in vitro and in vivo models related to the expression of Calbindin-D-9k. <i>JOURNAL OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, 51 (2): 253-263 APR 2005.</i>
20	Zhao, B; Chu, Y; Huang, Y; Hardy, D; Lin, S; Ge, R. 2010. Structure-dependent inhibition of human and rat 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 activities by phthalates. <i>CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS, 183 (1): 79-84 JAN 5.</i>
22	Nakagomi, M; Suzuki, E; Usumi, K; Saitoh, Y; Yoshimura, S; Nagao, T; Ono, H. 2001. Effects of endocrine disrupting chemicals on the microtubule network in Chinese hamster V79 cells in culture and in Sertoli cells in rats. <i>TERATOGENESIS CARCINOGENESIS AND MUTAGENESIS, 21 (6): 453-462.</i>
23	Ohshima, M; Ohno, S; Nakajin, S; 2005. Inhibitory effects of some possible endocrine-disrupting chemicals on the isozymes of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and expression of their mRNA in gonads and adrenal glands. <i>Environmental Science. 2005;12(4):219-30.</i>
26	Sugiyama, S; Shimada, N; Miyoshi, H; Yamauchi, K. 2005. Detection of thyroid system-disrupting chemicals using in vitro and in vivo screening assays in <i>Xenopus laevis</i> . <i>TOXICOLOGICAL SCIENCES Volume: 88 Issue: 2 Pages: 367-374.</i>

### Bilaga 3 - DCHP

ReferensID	Referensinformation
28	Sargis, R; Johnson, D; Choudhury, R; Brady, M;. 2010. Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. Obesity (Silver Spring). 2010 Jul;18(7):1283-8. Epub 2009 Nov 19.
29	Nakai, M; Tabira, Y; Asai, D; Yakabe, Y; Shimyozu, T; Noguchi, M; Takatsuki, M; Shimohigashi, Y. 1999. Binding Characteristics of Dialkyl Phthalates for the Estrogen Receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 254, Issue 2, 19 January 1999, Pages 311-314.
32	Satoh, K; Nagai, F; Aoki, N. 2001. Several environmental pollutants have binding affinities for both androgen receptor and estrogen receptor alpha. JOURNAL OF HEALTH SCIENCE, 47 (5): 495-501 OCT 2001.
33	Liu, P; Lin, C. 2002. Phthalates suppress the calcium signaling of nicotinic acetylcholine receptors in bovine adrenal chromaffin cells. TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY, 183 (2): 92-98 SEP 1 2002.
34	Dang, Z; Li, K; Yin, H; Hakkert, B; Vermeire, T. 2011. Endpoint sensitivity in fish endocrine disruption assays: Regulatory implications. Toxicology Letters, Volume 202, Issue 1, 10 April 2011, Pages 36-46.
35	Ohnishi, T; Yoshida, T; Igarashi, A; Muroi, M; Tanamoto, K. 2008. Effects of possible endocrine disruptors on MyD88-independent TLR4 signaling. FEMS Immunology & Medical Microbiology, Volume 52, Issue 2, pages 293–295, March 2008.
36	Saillenfait, A-M; Gallissot, F; Sabaté, J-P. 2009. Differential developmental toxicities of di-n-hexyl phthalate and dicyclohexyl phthalate administered orally to rats. Journal of Applied Toxicology, Volume 29, Issue 6, pages 510–521, August 2009.
37	Lake, B; Foster, J; Collins, M; Stubberfield, C; Gangolli, S; Srivastava, S. 1982. Studies on the Effects of Orally Administered Dicyclohexyl Phthalate in the Rat. Acta Pharmacologica et Toxicologica, Volume 51, Issue 3, pages 217–226, September 1982.
38	Igarashi A; Ohtsu S; Muroi M; Tanamoto K. 2006. Effects of possible endocrine disrupting chemicals on bacterial component-induced activation of NF-kappaB. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006, Oct; 29(10):2120-2.
39	European Chemicals Bureau. 2000. IUCLID Dataset, Dicyclohexyl Phthalate (84-61-7) p.19 (2000 CD-ROM edition). (Toxline)
40	Nishihara, T; Nishikawa, J; Kanayama, T; Dakeyama, F; Saito, K; Imagawa, M; Satoshi, T; Takatori, Kitagawa, Y; Hori, S; Utsumic, H. 2000. Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. Journal of Health Science., 46(4), 282-298, 2000.

Bilaga 4 - Sammanställt datamaterial från studier med Genistein

Ämnesnamn	Testnivå	Kvalitativt resultat	Metod	Endpoint	StandardNr	LOEC	LOAEL	EC 50	PC 50	NOEL	lägsta testade koncentration/dos	högsta testade koncentration/dos	ReferensID
Genistein	Level 2	+	Stable Transfected Human Era Transcriptional Activation Assay, human cervical carcinoma cell line	gene transcription				863400 1 nM E2	388592 1 nM E2 (PC10 = 32864)		2,7 µg/l	2,7 mg/l	9
Genistein	Level 2	+	YES	estrogenic potential					PC 10 = 54 µg/l E2				93
Genistein	Level 2	+	rat ovarian follicles steroidogenes assay	hormonkoncentration		27 µg/l					2,7 µg/l	270 µg/l	95
Genistein	Level 2	+	H295R steroidogenesis assay	17beta-estradiol production	TG 456	10 mg/l							94
Genistein	Level 2	+	H295R steroidogenesis assay	testosterone production	TG 456	10 mg/l					0,027 µg/l	27000 µg/l	94
Genistein	Level 2	-	YES	anti-estrogenic potential							0		93
Genistein	Level 2	-	YAS	anti-androgenic potential							0,027 µg/l	27000 µg/l	93
Genistein	Level 2	-	YAS	androgenic potential							0,027 µg/l	27000 µg/l	93
Genistein	Level 3	+	Aromatas knockout mice, subcutaneous injection	hormonkoncentration			10 mg/kg b.w				10 mg/kg b.w	10 mg/kg b.w	92
Genistein	Level 3	+	Aromatas knockout mice, oral administration	hormonkoncentration			70 mg/kg b.w				70 mg/kg b.w	70 mg/kg b.w	92
Genistein	Level 3	+	Uterotrophic assay in rodents	uterine weight	TG 440		20 mg/kg				2 mg/kg	20 mg/kg	9
Genistein	Level 3	-	Aromatas knockout mice, oral administration	gene expression							70 mg/kg b.w	70 mg/kg b.w	92
Genistein	Level 3	-	Aromatas knockout mice, subcutaneous injection	gene expression							10 mg/kg b.w	10 mg/kg b.w	92
Genistein	Level 4	inc.	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	adrenal weight		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	inc.	Rats, in utero and postnatal oral exposure	anogenital distance decreased		50 mg/kg bw							86
Genistein	Level 4	inc.	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	vaginal histology	TG 407	400 mg/kg bw				120 mg/kg bw	120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	inc.	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	uterus histology	TG 407	400 mg/kg bw				120 mg/kg bw	120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	+	Rainbow trout, oral exposure 1 year during first gametogenesis until spawning	effects on testes			500 mg/kg (feed)						63
Genistein	Level 4	+	Rainbow trout, oral exposure 1 year during first gametogenesis until spawning	sexual differentiation			500 mg/kg (feed)						63
Genistein	Level 4	+	Rainbow trout, oral exposure 1 year during first gametogenesis until spawning	vitellogenin			500 mg/kg (feed)						63
Genistein	Level 4	+	Rainbow trout, oral exposure 1 year during first gametogenesis until spawning	hormonkoncentration			500 mg/kg (feed)						63
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	body weight							5 mg/kg (feed)	1250 mg/kg (feed)	73
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	ventral prostate weight			1250 mg/kg (feed)				5 mg/kg (feed)	1250 mg/kg (feed)	73
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	ductal/alveolar hyperplasia			250 mg/kg (feed)				5 mg/kg (feed)	1250 mg/kg (feed)	73
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	ductal/alveolar hypertrophy			25 mg/kg (feed)				5 mg/kg (feed)	1250 mg/kg (feed)	73
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	sexual differentiation			625 mg/kg (feed)				5 mg/kg (feed)	1250 mg/kg (feed)	73
Genistein	Level 4	+	Rats, lifelong oral exposure, effect on amphetamine-stimulated dopamine release	amphetamine-stimulated striatal dopamine release			500 mg/kg (feed)				100 mg/kg (feed)	500 mg/kg (feed)	76
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	relative thymus mass			300 mg/kg (feed)				5 mg/kg (feed)	300 mg/kg (feed)	80
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	hormonkoncentration							5 mg/kg (feed)	300 mg/kg (feed)	80
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	hormone synthesis							5 mg/kg (feed)	300 mg/kg (feed)	80
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	T cell differentiation							5 mg/kg (feed)	300 mg/kg (feed)	80
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	ovaries weight		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	ovaries histology		50 mg/kg bw				5 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	ovaries histology		50 mg/kg bw				5 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	uterus and cervix weight		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	uterus histology		50 mg/kg bw				5 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82

**Bilaga 4 - Sammanställt datamaterial från studier med Genistein**

Ämnesnamn	Testnivå	Kvalitativt resultat	Metod	Endpoint	StandardNr	LOEC	LOAEL	EC 50	PC 50	NOEL	lägsta testade koncentration/dos	högsta testade koncentration/dos	ReferensID
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	vaginal histology		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	mammary gland histology		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	prostate weight		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	uterus histology		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	prostate histology		50 mg/kg bw				5 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	prostate histology		50 mg/kg bw				5 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	epididymides histology		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	epididymides histology		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	testes weight		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	vaginal histology		500 mg/kg bw				50 mg/kg bw	5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	+	Postnatal oral exposure rat	vaginal histology		40 mg/kg bw				4 mg/kg bw	4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	83
Genistein	Level 4	+	Postnatal oral exposure rat	uterus and cervix weight		40 mg/kg bw				4 mg/kg bw	4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	83
Genistein	Level 4	+	Postnatal oral exposure rat	sexually dimorphic nucleus in preoptic area of hypothalamus		40 mg/kg bw				4 mg/kg bw	4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	83
Genistein	Level 4	+	Postnatal oral exposure rat	vaginal opening accelerated		40 mg/kg bw				4 mg/kg bw	4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	83
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	testes histology		30 mg/kg bw				12 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	pituitary weight		30 mg/kg bw				12 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	prostate weight		30 mg/kg bw				12 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	ovaries histology		30 mg/kg bw				12 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	uterus histology		12 mg/kg bw				3 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	mammary gland histology		3 mg/kg bw				0,6 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	delivary index		30 mg/kg bw				12 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	number of life pups		30 mg/kg bw				12 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	eye opening delayed		30 mg/kg bw				12 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	vaginal histology		66 mg/kg bw				30 mg/kg bw	0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	uterus and cervix weight		50 mg/kg bw							86
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	enzyme activity			250 mg/kg (feed)						87
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	protein levels			1250 mg/kg (feed)						87
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	vaginal opening accelerated		15 mg/kg bw					15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	number of life pups		40 mg/kg bw					15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	pituitary weight		40 mg/kg bw					15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	+	Rats, in utero and postnatal oral exposure	morphological alterations			300 mg/kg (feed)						91
Genistein	Level 4	+	In vivo juvenile fish screening protocol	vitellogenin	adapted from OECD TG 204								90
Genistein	Level 4	+	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	adrenal weight	TG 407	1000 mg/kg bw				400 mg/kg bw	120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	+	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	uterus and cervix weight	TG 407	1000 mg/kg bw					120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	-	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	uterus and cervix weight							5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	-	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	ovaries weight							5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	-	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	mammary gland histology							5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	-	Rats, oral exposure throughout gestation and lactation	testes histology							5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	-	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	testes histology							5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	-	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	testes weight							5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82

**Bilaga 4 - Sammanställt datamaterial från studier med Genistein**

Ämnesnamn	Testnivå	Kvalitativt resultat	Metod	Endpoint	StandardNr	LOEC	LOAEL	EC 50	PC 50	NOEL	lågsta testade koncentration/dos	högsta testade koncentration/dos	ReferensID
Genistein	Level 4	-	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	adrenal weight							5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	-	Prolonged oral toxicity rat, subchronic, chronic study, 26 weeks	prostate weight							5 mg/kg bw	500 mg/kg bw	82
Genistein	Level 4	-	Postnatal oral exposure rat	preputial separation delayed							4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	83
Genistein	Level 4	-	Postnatal oral exposure rat	anogenital distance decreased							4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	83
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	preputial separation delayed							0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	anogenital distance decreased							0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	vaginal opening accelerated							0,6 mg/kg bw	170 mg/kg bw	84
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	adrenal weight							15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	testes histology							15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	ovaries histology							15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	preputial separation delayed							15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	ovaries weight							15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	anogenital distance decreased							15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	prostate weight							15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero and postnatal oral exposure	uterus and cervix weight							15 mg/kg bw	40 mg/kg bw	88
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero exposure	gonocyte count									89
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero exposure	testosterone secretion									89
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero exposure	gametogenesis									89
Genistein	Level 4	-	Rats, in utero exposure	steroidogenesis									89
Genistein	Level 4	-	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	ovaries weight	TG 407					1000 mg/kg bw	120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	-	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	testes histology	TG 407						120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	-	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	epididymides histology	TG 407						120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	-	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	sperm count and morphology	TG 407						120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	-	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	ovaries histology	TG 407						120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	-	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	testes weight	TG 407						120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	-	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	prostate weight	TG 407						120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 4	-	Repeated dose 28-day study oral toxicity study in rodents	prostate histology	TG 407						120 mg/kg bw	1000 mg/kg bw	81
Genistein	Level 5	inc.	5 generation study rat	number of life pups		0,4 mg/kg bw					0,4 mg/kg bw	8 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	inc.	5 generation study rat	anogenital distance decreased		0,4 mg/kg bw					0,4 mg/kg bw	0,4 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	+	5 generation study rat	vaginal opening accelerated		0,4 mg/kg bw							85
Genistein	Level 5	+	5 generation study rat	mammary gland histology		0,4 mg/kg bw					0,4 mg/kg bw	0,4 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	-	5 generation study rat	ovaries histology							0,4 mg/kg bw	0,4 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	-	5 generation study rat	uterus histology							0,4 mg/kg bw	0,4 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	-	5 generation study rat	preputial separation delayed							0,4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	-	5 generation study rat	delivary index							0,4 mg/kg bw	0,4 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	-	5 generation study rat	fertility index							0,4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	-	5 generation study rat	mating index							0,4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	-	5 generation study rat	vaginal histology							0,4 mg/kg bw	40 mg/kg bw	85
Genistein	Level 5	-	5 generation study rat	prostate weight							40 mg/kg bw	40 mg/kg bw	85

#### Bilaga 4 - Genistein

ReferensID	Referensinformation
9	Yamasaki, K; Takeyoshi, M; Yakabe, Y; Sawaki, M; Imatanaka, N; Takatsuki, M. 2002. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. Toxicology Volume 170, Issues 1-2, 15 January 2002, Pages 21-30.
63	Bennetau-Pelissero,C., Breton B,B., Bennetau,B., Corraze,G., Le Menn,F., Davail-Cuisset,B., Helou,C., Kaushik,S.J.(2001) Effect of Genistein-Enriched Diets on the Endocrine Process of Gametogenesis and on Reproduction Efficiency of the Rainbow Trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> , General and Comparative Endocrinology, 121, 173-187
73	Delclos,K.B., Bucci,T.J., Lomax,L.G., Latendresse,J.R., Warbritton,A., Weis,C.C., Newbold,R.R. (2001). Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. Reproductive Toxicology 15, 647-663.
76	Ferguson,S.A., Flynn,K.M., Delclos,K.B., Newbold,R.R. Gough,B.J. (2002) Neurotoxicology and Teratology 24, 37-45.
80	Klein,S.L., Wisniewski,A.B., Marson,A.L., Glass,G.E., Gearhart,J.P. (2002). Early Exposure to Genistein Exerts Long-Lasting Effects on the Endocrine and Immune Systems in Rats. Molecular Medicine 8(11):742-749
81	Gelbke, H-P; Hofmann, A; Owens, J; Freyberger, A. 2007. The enhancement of the subacute repeat dose toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active chemicals: comparison with toxicity tests of longer duration. Arch Toxicol (2007) 81:227–250.
82	McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Edwards JA, Bausch J (2006) Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats Food Chem. Toxicol 44:56–80
83	Lewis RW, Brooks N, Milburn GM, Soames A, Stone S, Hall M, Ashby J (2003) The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. Toxicol Sci 71:74–83
84	Declos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, Newbold RR (2001) Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague–Dawley) rats. Reprod Toxicol 15:647–663
85	Declos KB, Weis CC, Olson G, Bucci TJ, Newbold RR (2003) A five generation reproductive toxicity assessment of the soy isoflavone genistein in CD Sprague–Dawley rats. Toxicol Sci 72(Suppl 1):76
86	Casanova M, You L, Gaido KW, Archibeque-Engle S, Janszen DB, Heck H d'A (1999) Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague–Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alfa and beta in vitro. Toxicol Sci 51:236–244
87	Laurenzana,E.M., Weis,C.C., Bryant,C.W., Newbold,R., Delclos,K.B. (2002). Effect of dietary administration of genistein, nonylphenol or ethinyl

#### Bilaga 4 - Genistein

ReferensID	Referensinformation
	estradiol on hepatic testosterone metabolism, cytochrome P-450 enzymes, and estrogen receptor alpha expression. <i>Food and Chemical Toxicology</i> 40, 52-63.
88	You, L; Casanova, M; Bartolucci, E; Fryczynski, M; Dorman, D; Everitt, J; Gaido, K; Ross, S; Heck, H; (2002) Combined effects of dietary phytoestrogen and synthetic endocrine-active compound on reproductive development in Sprague–Dawley rats: genistein and methoxychlor. <i>Toxicol Sci</i> 66:91–104
89	Lehraiki,A., Messiaen,S., Berges,R., Canivenc-Lavier,M-C., Auger,J., Habert,R., Levacher,C. (2011). <i>Reproductive Toxicology</i> 31, 424-430.
90	Panter,G.H., Hutchinson,T.H., Länge,R., Lye,C.M., Sumpter,J.P., Zerulla,M., Tyler,C.R. (2002). Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances. <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> 21(2); 319-326.
91	Wang,X-J., Bartolucci-Page,E., Fenton,S.E., You,L. (2006). Altered Mammary Gland Development in Male Rats Exposed to Genistein and Methoxychlor. <i>Toxicological Sciences</i> 91(1), 93-103.
92	Bliedtner,A., Zierau,O., Albrecht,S., Liebhaber,S., Vollmer,G. (2010), Effects of genistein and estrogen receptor subtype-specific agonists in ArKO mice following different administration routes. <i>Molecular and Cellular Endocrinology</i> 314, 41–52
93	Kolle,S.N., Kamp,H.G., Huener,H.-A., Knickel,J., Verlohner,A., Woitkowiak,R., Landsiedel,R., van Ravenzwaay,B. (2010). <i>Toxicology in Vitro</i> 24, 2030-2040.
94	Hecker,M., Hollert,H., Cooper,R., Vinggaard,A.M., Akahori,Y., Murphy,M., Nellemann,C., Higley,E., Newsted,J., Laskey,J., Buckalew,A., Grund,S., Maletz,S., Giesy,J., Timm,G. (2011). The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study. <i>Environ Sci Pollut Res</i> 18:503-515
95	Myllymäki S, Haavisto T, Vainio M, Toppari J, Paranko J. 2005. In vitro effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-tert-butylphenol, and 4-tert-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles.

Bilaga 5 - Sammanställt datamaterial från studier med TBT

Ämnesnamn	Testnivå	Kvalitativt resultat	Metod	Endpoint	StandardNr	LOEC	LOAEL	EC 50	NOEL	lägsta testade koncentration/dos	högsta testade koncentration/dos	ReferensID
Tributyltin-chloride		-	ex vivo gonad culture assay, juvenile brown trout	hormonkoncentration						1 ng/l	100 ng/l	41
Tributyltin	Level 2	+	Human kidney, microsomal assay	enzyme activity				16 µM				23
Tributyltin	Level 2	+	Zebrafish, HeLa cells	enzyme activity								25
Tributyltin	Level 2	+	fish kidney cell assay	effects on kidney		2,5 µg/l				2,5 µg/l	500 µg/l	46
Tributyltin	Level 2	+	Human ovarian granulosa-like cell line	gene expression of aromatase		20 µg/l						49
Tributyltin	Level 2	+	Mammalian RXR , PPARgamma cell assay	receptor tansactivation		4 µg/l						50
Tributyltin-chloride	Level 2	+	Human breast cancer MCF-7 cell proliferation	human breast cancer MCF-7 cell proliferation						0,33 ng/l	3,3 mg/l	12
Tributyltin-chloride	Level 2	+	Immunological T-cell assay	cytokine and cytokine-MRNA		33 µg/l						15
Tributyltin-chloride	Level 2	+	Immunological T-cell assay	intracellular concentration of GSH in APC (antigen presenting cells)		9,8 µg/l				3,3 µg/l	33 µg/l	15
Tributyltin-chloride	Level 2	+	Immunological T-cell assay	differentiation of T helper cells, Th2 polarization		3,3 µg/l				0,033 µg/l	33 µg/l	15
Tributyltin	Level 2	+	AR Binding Assay	displacement of testosterone in AR assay	US EPA OPPTS 890.1150			8 µM				32
Tributyltin-chloride	Level 2	-	Stable Transfected Human Era Transcriptional Activation Assay, human cervical carcinoma cell line	gene transcription					10 µM	3,3 µg/l	3,3 mg/l	9
Tributyltin-chloride	Level 2	-	Stable Transfected Human Era Transcriptional Activation Assay (ER STTA)	gene transcription	TG 455				1 pM	0,33 µg/l	0,33 g/l	64
Tributyltin	Level 3	inc.	Salmon, gene expression patterns, real-time PCR method	enzyme activity								27
bis(tri-n-butyltin)oxide	Level 3	+	Chronic Fish test 8 months	effects on liver		5 µg/l			1 µg/l	0,2 µg/l	5 µg/l	44
bis(tri-n-butyltin)oxide	Level 3	+	Chronic Fish test 8 months	effect on thymus		5 µg/l			1 µg/l	0,2 µg/l	5 µg/l	44
Tributyltin	Level 3	+	Salmon liver, second messenger activaton	mRNA levels							10 mg/kg fish	24
Tributyltin	Level 3	+	Zebrafish, liver enzyme activity	mRNA levels								25
Tributyltin	Level 3	+	Zebrafish, liver enzyme activity	enzyme activity								25
Tributyltin	Level 3	+	Salmon, gene expression patterns, real-time PCR method	mRNA levels								27
Tributyltin	Level 3	+	intraperitoneal injection in fish	immune functions			0,1			0,1 mg/kg	12,5 mg/kg	46
Tributyltin-chloride	Level 3	+	21-day Fish Screening Assay	hepato-somatic index (21 days)	TG 230	0,27 µg/l				0,02 µg/l	1,7 µg/l	34
Tributyltin-chloride	Level 3	+	21-day Fish Screening Assay	hepato-somatic index	TG 230	0,6 µg/l				0,02 µg/l	1,7 µg/l	34
Tributyltin-chloride	Level 3	+	21-day Fish Screening Assay	vitellogenin	TG 230	0,02 µg/l				0,02 µg/l	1,7 µg/l	34
Tributyltin-chloride	Level 3	+	21-day Fish Screening Assay	hepato-somatic index (21 days)	TG 230	269 ng/l				117 ng/l	4000 ng/l	64
Tributyltin-chloride	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	vitellogenin (21 days)	TG 230				4 µg/L	0,02 µg/l	4 µg/l	34
Tributyltin-chloride	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	gonado-somatic index	TG 230				1,7 µg/L	0,02 µg/l	1,7 µg/l	34
Tributyltin-chloride	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	time to hatching	TG 230					0,02 µg/l	1,7 µg/l	34
Tributyltin-chloride	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	hatchability	TG 230				1,7 µg/L	0,02 µg/l	1,7 µg/l	34
Tributyltin-chloride	Level 3	-	21-day Fish Screening Assay	vitellogenin (21 days)	TG 230				117 ng/l	117 ng/l	4000 ng/l	64
Tributyltin-chloride	Level 3	-	Uterotrophic assay in rodents	uterine weight	TG 440				200 mg/kg	2 mg/kg/d	200 mg/kg/d	9
Tributyltin	Level 4	+	Rats, in utero exposure, gene expression	gene expression							20 mg/kg	30
Tributyltin	Level 4	+	Rats, in utero exposure, ventral prostate weights	ventral prostate weight							10 mg/kg bw	31
Tributyltin	Level 4	+	Rats, in utero exposure, ventral prostate weights	gene expression								31
Tributyltin	Level 4	+	Freshwater snail reproduction test	reproductive success		170 ng/l						42
Tributyltin	Level 4	+	Freshwater snail reproduction test	reproductive success		94,8 ng/l						42
Tributyltin	Level 4	+	Freshwater snail reproduction test	reproductive success		120 ng/l						43
Tributyltin	Level 4	+	Rodent 20-Day Thyroid/Pubertal Male Assay	sexual differentiation		15 mg/kg				0,15 mg/kg	5 mg/kg	45
Tributyltin	Level 4	+	Gastropod 8-week exposure	endpoint unknown		3,4 ng/l						48
Tributyltin	Level 4	+	Gastropod full life cycle test	embryonic development		1 µg/l						48
Tributyltin	Level 4	+	Gastropod 8-week exposure	growth and development in offspring		38 ng/l EC10			38 ng/l			48
Tributyltin	Level 4	+	Mollusc Partial Lifecycle Assays	sexual differentiation		100 ng/l						78
Tributyltin oxide	Level 4	+	Flounder feed exposure on day 35-100	sex reversal in exposed immature fish		0,1 µg/g BW				0,1 µg/g BW	1 µg/g BW	56
Tributyltin oxide	Level 4	+	Crustacean	molting		0,1 µg/l				0,1 µg/l	5 µg/l	59
Tributyltin oxide	Level 4	+	Crustacean	limb regeneration		0,5 µg/l						61



Bilaga 5 - Sammanställt datamaterial från studier med TBT

Ämnesnamn	Testnivå	Kvalitativt resultat	Metod	Endpoint	StandardNr	LOEC	LOAEL	EC 50	NOEL	lägsta testade koncentration/dos	högsta testade koncentration/dos	ReferensID
Tributyltin oxide	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	reproductive success		10 mg/kg/d			5 mg/kg/d	2,5 mg/kg/d	16 mg/kg/d	68
Tributyltin oxide	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	growth and development in offspring		10 mg/kg/d			5 mg/kg/d	2,5 mg/kg/d	16 mg/kg/d	68
Tributyltin oxide	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	sexual differentiation		10 mg/kg/d			5 mg/kg/d	2,5 mg/kg/d	16 mg/kg/d	68
Tributyltin oxide	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	behaviour		10 mg/kg/d			5 mg/kg/d	2,5 mg/kg/d	16 mg/kg/d	68
Tributyltin oxide	Level 4	+	Repeated oral dose rat	hormonkoncentration		80 mg/kg in feed			20 mg/kg feed	5 mg/kg feed	320 mg/kg feed	74
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Freshwater snail reproduction test	spawning		0,11 µg/l			0,01 µg/l	0,001 µg/l	10 µg/l	53
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Sheepshead minnow reproduction test	reproductive success		0,72 µg/l			1,4-3,5 µg/l	0,45 µg/l	5,9 µg/l	55
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Echinoderms (Ophiuroidea) 4 weeks exposure	limb regeneration		0,1 µg/l				0,01 µg/l	0,5 µg/l	58
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Gastropod 2 week exposure	sexual differentiation		0,5 µg/l						60
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Tunicates	embryonic development		326 µg/l				33 µg/l	3255 µg/l	62
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	growth and development in offspring		5 mg/kg/d				5 mg/kg/d	25 mg/kg/d	66
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	behaviour		1 mg/kg/d				1 mg/kg/d	5 mg/kg/d	67
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	reproductive success		12,2 mg/kg/d			8,1 mg/kg/d	8,1 mg/kg/d	16,3 mg/kg/d	69
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	growth and development in offspring		12,2 mg/kg/d			8,1 mg/kg/d	8,1 mg/kg/d	16,3 mg/kg/d	69
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	reproductive success		16,3 mg/kg/d			8,1 mg/kg/d	8,1 mg/kg/d	32,5 mg/kg/d	70
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	embryonic development		16,3 mg/kg/d			8,1 mg/kg/d	8,1 mg/kg/d	32,5 mg/kg/d	70
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	embryonic development		50				25 mg/kg/d	100 mg/kg/d	71
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	sexual differentiation		25				25 mg/kg/d	100 mg/kg/d	71
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Repeated dose oral toxicity in pregnant rat	reproductive success		40 mg/kg/d				40 mg/kg/d	80 mg/kg/d	72
Tributyltin	Level 4	+	Fish sexual development test (FSDT)	sex ratio	TG 234	0,1 ng/l			0,01 ng/l	0,01 ng/l	100 ng/l	79
Tributyltin	Level 4	+	Fish sexual development test (FSDT)	sperm motility	TG 234	1 ng/l			0,01 ng/l	0,01 ng/l	100 ng/l	79
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Fish sexual development test (FSDT)	liver somatic index (LSI) in offspring	TG 234	594 ng/l				20,1 ng/l	1650 ng/l	64
Tributyltin-chloride	Level 4	+	Fish sexual development test (FSDT)	embryonic development	TG 234	594 ng/l				20,1 ng/l	1650 ng/l	64
Tributyltin	Level 4	-	Rats, in utero exposure, ventral prostate weights	body weight					10 mg/kg bw		10 mg/kg bw	31
Tributyltin oxide	Level 4	-	Rat oral exposure 2 years	sexual differentiation					50 mg/kg	0,5 mg/kg	50 mg/kg	65
Tributyltin-chloride	Level 4	-	Fish sexual development test (FSDT)	sex reversal in offspring	TG 234					20,1 ng/l	1650 ng/l	64
Tributyltin-chloride	Level 4	-	Fish sexual development test (FSDT)	hatchability	TG 234					20,1 ng/l	1650 ng/l	64
Tributyltin	Level 5	+	Copepod Reproduction and Development Test	reproductive success		0,01 µg/l				0,01 µg/l	10 µg/l	47
Tributyltin	Level 5	+	Gastropode 12 weeks exposure	reproductive toxicological effects, parents		240 ng/l				2,4 ng/l	240 ng/l	77
Tributyltin oxide	Level 5	+	Medaka Multigenerational Test (MMGT)	reproductive toxicological effects, offspring			1 g/BW/d					51
Tributyltin oxide	Level 5	+	Copepod Reproduction and Development Test	spawning		0,01 µg/l				0,01 µg/l	0,1 µg/l	52
Tributyltin-chloride	Level 5	+	Copepod Reproduction and Development Test	growth and development in offspring		0,1 µg/l				0,0125 µg/l	0,5 µg/l	54
Tributyltin-chloride	Level 5	+	Gastropode 12 weeks exposure	sexual differentiation		0,001 µg/l				0,001 µg/l	0,021 µg/l	57
Tributyltin	Level 5	-	Mollusc Full Lifecycle Assays	reproductive toxicological effects, offspring					240 2,4	2,4 ng/l	240 ng/l	77
Tributyltin	Level 5	-	Mollusc Full Lifecycle Assays	reproductive toxicological effects, offspring					240 2,4	2,4 ng/l	240 ng/l	77
Tributyltin	Level 5	-	Gastropode 12 weeks exposure	hatchability						2,4 ng/l	240 ng/l	77

**Bilaga 5 - TBT**

ReferensID	Referensinformation
9	Yamasaki, K; Takeyoshi, M; Yakabe, Y; Sawaki, M; Imatanaka, N; Takatsuki, M. 2002. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. <i>Toxicology Volume 170, Issues 1-2, 15 January 2002, Pages 21-30.</i>
12	Vanparys, C; Depiereux, S; Nadzialek, S; Robbens, J; Blust, R; Kestemont, P; De Coen, W. 2010. Performance of the flow cytometric E-screen assay in screening estrogenicity of pure compounds and environmental samples. <i>Science of The Total Environment, Volume 408, Issue 20, 15 September 2010, Pages 4451-4460.</i>
15	Kato, T; Tada-Oikawa, S; Takahashi, K; Saito, K; Wang, L; Nishio, A; Hakamada-Taguchi, R; Kawanishi, S; Kuribayashi, K. 2006. Endocrine disruptors that deplete glutathione levels in APC promote Th2 polarization in mice leading to the exacerbation of airway inflammation. <i>European Journal of Immunology, Volume 36, Issue 5, pages 1199–1209, May 2006.</i>
23	Ohshima, M; Ohno, S; Nakajin, S; 2005. Inhibitory effects of some possible endocrine-disrupting chemicals on the isozymes of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and expression of their mRNA in gonads and adrenal glands. <i>Environmental Science. 2005;12(4):219-30.</i>
24	Pavlikova N; Kortner TM; Arukwe A; 2010. Peroxisome proliferator-activated receptors, estrogenic responses and biotransformation system in the liver of salmon exposed to tributyltin and second messenger activator. <i>Aquat Toxicol. 2010, Aug 15; 99(2):176-85.</i>
25	McGinnis CL; Crivello JF; 2011. Elucidating the mechanism of action of tributyltin (TBT) in zebrafish. <i>Aquat Toxicol. 2011, May; 103(1-2):25-31.</i>
27	Mortensen AS; Arukwe A; 2007. Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> ) after exposure to tributyltin (TBT). <i>Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2007, Apr; 145(3):431-41.</i>
30	Adeeko A; Li D; Trasler JM; Hales BF; Robaire B; 2002. Exposure of dams to tributyltin has gender-specific effects on gonadal gene expression profiles of the fetuses. <i>Biol Reprod 2002;66(Suppl 1):221-2.</i>
31	Robaire B; Luu T; Adeeko A; Li D; Hales BF; 2002. Exposure in utero to tributyltin chloride reduced ventral prostate weight and altered gene expression in the progeny. <i>Biol Reprod 2002;66(Suppl 1):221.</i>
32	Sato, K; Nagai, F; Aoki, N. 2001. Several environmental pollutants have binding affinities for both androgen receptor and estrogen receptor alpha. <i>JOURNAL OF HEALTH SCIENCE, 47 (5): 495-501 OCT 2001.</i>
34	Dang, Z; Li, K; Yin, H; Hakkert, B; Vermeire, T. 2011. Endpoint sensitivity in fish endocrine disruption assays: Regulatory implications. <i>Toxicology Letters, Volume 202, Issue 1, 10 April 2011, Pages 36-46.</i>
41	Marca Pereira, P; Wheeler, J; Thorpe, K; Burkhardt-Holm P. 2011. Development of an ex vivo brown trout ( <i>Salmo trutta fario</i> ) gonad culture for assessing chemical effects on steroidogenesis. <i>Aquat Toxicol. 2011 Feb;101(3-4):500-11.</i>
42	Duft, M; Schmitt, C; Bachmann, J; Brandelik, C; Schulte-Oehlmann, U. 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals—an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail

Bilaga 5 - TBT

ReferensID	Referensinformation
	Potamopyrgus antipodarum. Ecotoxicology (2007) 16:169–182. Joerg Oehlmann
43	Stroben E. 1994 (thesis) Imposex und weitere Effekte von chronischer TBT-Intoxikation bei einigen Mesogastropoden und Bucciniden (Gastropoda: Prosobranchia). Cuvillier, Göttingen, Germany. PhD thesis, University of Münster, Germany
44	Grinwis, G; Wester, P; Vethaak, A. 2009. Histopathological effects of chronic aqueous exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) to environmentally relevant concentrations reveal thymus atrophy in European flounder (Platichthys flesus). Environmental Pollution 157 (2009) 2587–2593.
45	Grote, K; Stahlschmidt, B; Talsness, C; Gericke, C; Appel, K; Chahouda, I. 2004. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. Toxicology 202 (2004) 145–158.
46	Hárford, A; O'Halloran, K; Wright, P. 2007. EFFECT OF IN VITRO AND In vivo organotin exposure on the immune functions of murray cod (Maccullochella peelii peelii). Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 26, No. 8, pp. 1649–1656, 2007.
47	Lee, K; Raisuddin, S; Hwang, D; Park, H; Dahms, H; Ahn, I; Lee, J. 2008. Two-generation toxicity study on the copepod model species Tigriopus japonicus. Chemosphere 72 (2008) 1359–1365.
48	Matthiessen, P. 2008. An Assessment of Endocrine Disruption in Mollusks and the Potential for Developing Internationally Standardized Mollusk Life Cycle Test Guidelines. Integrated Environmental Assessment and Management — Volume 4, Number 3—pp. 274–284.
49	Saitoh, M; Yanase, T; Morinaga, H; Tanabe, M; Mu, Y; Nishi, Y; Nomura, M; Okabe, T; Goto, K; Takayanagi, R; Nawata, H. 2001. Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in human granulosa-like tumor cell line KGN. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol 289. 198-201.
50	Kanayama, T; Kobayashi, N; Mamiya, S. Nakanishi, T; Nishikawa, J. 2005. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-retinoid X receptor pathway. Mol. Pharmacol. Vol 67. 766-774.
51	Nirmala, K., Oshima, Y., Lee, R., Imada, N., Honjo, T. and Kobayashi, K. (1999) Transgenerational toxicity of tributyltin and its combined effects with polychlorinated biphenyls on reproductive processes in Japanese medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 4, 717-721.
52	Johansen, K. and Mohlenberg, F. (1987) Impairment of egg production in Acartia tonsa exposed to tributyltin oxide. Ophelia, 27, 137-141.
53	Ritchie, L.S., Lopez, V.A. and Cora, J.M. (1974) Prolonged applications of an organotin against Biomphalaria glabrata and Schistosoma mansoni. in Molluscicides in schistosomiasis control. New York, London, Academic Press, 77-88.

**Bilaga 5 - TBT**

ReferensID	Referensinformation
54	Hall,L.W.,Bushong,S.J.,Hall,W.S. and Johnson,W.E.(1988)Acute and chronic effects of tributyltin on a Chesapeake Bay copepod. <i>Environ.Toxicol.Chem.</i> ,7,41-46.
55	Manning,C.S., Lytle,T.F.,Walker,W.W. and Lytle,J.S.(1999)Life-cycle toxicity of bis(tributyltin) oxide to the sheepshead minnow( <i>Cyprinodon variegatus</i> ). <i>Arch.Environ.Contam.Toxicol.</i> ,37, 258-266.
56	Shimazaki, Y; Kitano, T; Oshima, Y; Imada, N; Honjo, T. 2000 Masculinization of flounders by tributyltin, Collected ummaries of lectures at the 3rd symposium of Japan Society of Endocrine Disrupter Research, A-3-1, 65.
57	Horiguchi,T.,Shiraishi,H.,Shimizu,M.,Yamazaki,S. Morita,M.(1995)Imposex in Japanese gastopods (Neogastropoda and Mesogastropoda):Effects of tributyltin and triphenyltin from antifouling paints. <i>Marine Pollution Bulletin</i> ,31,4-12,402-405.
58	Walsh,G.E.,McLaughlin,L.L.,Louie,M.K.,Deans,C.H. and Loes,E.M.(1986)Inhibition of arm regeneration by <i>Ophioderma brevispina</i> (Echinodenmata, Ophiuroidea) by tributyltin oxide and triphenyltin oxide. <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> ,12,95-100.
59	Khan,A.,Weis,J.S.,Saharig,C.E. and Polo,E.(1993)Effect of tributyltin on mortality and telson regeneration of grass shrimp, <i>Palaemonetes pugio</i> . <i>Bull.Environ.Contam.Toxicol.</i> ,50, 152-157.
60	Bryan,G.E.,Gibbs,P.E. and Burt,G.R.(1988)A comparison of the effectiveness of tri-n-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dog-whelk, <i>Nucella lapillus</i> . <i>J.Mar.Biol.Ass.U.K.</i> ,68,733-744.
61	Weis,J.S. and Kim.K.(1988)Tributyltin is a teratogen in producing deformities in limbs of the fiddler crab, <i>Uca pugilator</i> . <i>Arch.Environ.Contam.Toxicol.</i> ,17,583-587.
62	Cima,F.,Ballarin,L.,Bressa,G.,Martinucci,G. and Burighel,P.(1996)Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate( <i>Styrela plicata</i> ;Tunicata). <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> , 35,174-182.
64	SPEED (Strategic Programs on Environmental Endocrine Disrupters). 1998, Japanese Environment Agency (Ministry of the Environment Report on the Test Results of Endocrine Disrupting Effects of Tributyltin (TBT) on Fish (Draft).
65	Wester,P.W.,Krajnc,E.I.,Van Leeuwen,F.X.R.,Loeber,J.G.,Van der Heijden,C.A.,Vaessen, H.A.M.G. and Helleman,P.W.(1990)Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin) oxide(TBTO) in the rat. <i>Fd.Chem.Toxic.</i> ,28,3,179-196.
66	Itami,T.,Ema,M.,Amano,H.,Murai,T. and Kawasaki,H. (1990). Teratogenic evaluation of tributyltin chloride in rats following oral exposure. <i>Drug Chem.Toxicol.</i> ,13,4,283-295.

**Bilaga 5 - TBT**

ReferensID	Referensinformation
	Helleman, P.W. (1990) Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin) oxide (TBTO) in the rat. <i>Fd. Chem. Toxic.</i> , 28, 3, 179-196.
67	Gardlund, A.T., Archer, T., Danielsson, K., Danielsson, B., Fredriksson, A., Lidqvist, N.G., Lidstrom, H. and Luthman, J. (1991) Effects of prenatal exposure to tributyltin and trihexyltin on behaviour in rats. <i>Neurotoxicol. Teratol.</i> , 13, 1, 99-105.
68	Crofton, K.M., Dean, K.F., Boncek, V.M., Rosen, M.B., Sheets, L.P., Chernoff, N. and Reiter, L.W. 1989 Prenatal or postnatal exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. Postnatal evaluation of teratology and behavior. <i>Toxicology and Applied Pharmacology</i> , 97, 113-123.
69	Harazono, A., Ema, M. and Ogawa, Y. (1996) Pre-implantation embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. <i>Toxicol. Lett.</i> , 89, 3, 185-190.
70	Harazono, A., Ema, M. and Ogawa, Y. 1998. Evaluation of early embryonic loss induced by tributyltin chloride in rats. Phase- and dose-dependent antifertility effects. <i>Arch. Environ. Contam. Toxicol.</i> , 34, 1, 94-99.
71	Ema, M., Kurosaka, R., Amano, H. and Ogawa, Y. 1995. Further evaluation of the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. <i>Toxicology</i> , 96, 3, 195-201.
72	Ema, M., Kurosawa, R., Amano, H. and Ogawa, Y. 1995. Comparative developmental toxicity of tributyltin trichloride, dibutyltin dichloride and tributyltin chloride in rats. <i>J. Appl. Toxicol.</i> , 15, 4, 297-302.
74	Krajnc, E.I., Wester, P.W., Loeber, J.G., van Leeuwen, F.X.R., Vos, J.G., Vaessen, H.A.M.G. and van der Heijden, C.A. (1984) Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rats. 1. Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid system. <i>Toxicology and Applied Pharmacology</i> , 75, 363-386.
77	Czech, P; Weber, K; Dietrich, D. 2001. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail <i>Lymnaea stagnalis</i> L. <i>Aquatic Toxicology</i> 53 (2001) 103–114.
78	Horiguchi, T; Kojima, M; Kaya, M; Matsuo, T; Shiraiishi, H; Morita, M; Adachi, Y. 2002. Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, <i>Haliotis gigantea</i> . <i>Marine Environmental Research</i> 54 (2002) 679–684
79	McAllister, B; Kime, D. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ). <i>Aquatic Toxicology</i> 65 (2003) 309–316.





**[www.kemikalieinspektionen.se](http://www.kemikalieinspektionen.se)**

**Kemikalieinspektionen, Box 2, 172 13 Sundbyberg. Besöksadress: Esplanaden 3A  
Tel: 08-519 41 100, Fax: 08-735 76 98, E-post: kemi@kemi.se**