

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルの ラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of Tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in Rats

要約

既存化学物質の安全性を評価するため、1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルを雌雄のCrj:CD(SD)系ラットに単回経口投与し、急性毒性を検討した。なお、雌雄とも投与量は2000 mg/kgの1用量とし、対照として媒体(コーン油)投与群を設けた。

一般状態の観察では、コーン油の影響と考えられる軟便が2000 mg/kg群の雌雄全例に認められた。観察期間における死亡例は、2000 mg/kg群の雌雄いずれにも認められなかった。体重は、2000 mg/kg群の雌雄ともに観察期間終了時まで順調に増加した。剖検では、2000 mg/kg群の雌雄いずれにも異常は認められなかった。

方法

1. 被験物質

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステル(CAS No.3319-31-1, 大八化学工業(株), Lot.No. N-60601, 純度99.0%以上, 分子量546.87, 凝固点-30℃, 沸点430℃)は淡黄色透明, 油溶性の液体であり, 使用時まで室温条件下で密閉遮光保管した。なお, 投与液は調製後, 冷蔵保存で7日間安定であることを確認した。

2. 供試動物

生後5週のCrj:CD(SD)系ラット(SPF)雌雄各15匹を日本チャールス・リバー(株)から購入した。8日間にわたり動物を検疫・馴化飼育した後, 6週齢で試験に用いた。投与時の体重は, 雄で149~163 g, 雌で126~140 gであった。

3. 飼育

動物は, 温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 換気回数20回/時間, 照度150~300 lux, 照明時間12時間(午前7時点灯, 午後7時消灯)に設定された飼育室で, (株)東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し, ステンレス製網目飼育ケージに5匹ずつ収容して飼育した。飼育ケージおよび給餌器は週1回取り換えた。動物には, オリエンタル酵母工業(株)製造の固型飼料MFを自由に摂取させ, 飲料水としては, 水道水を自由に摂取させた。

4. 用量設定理由

200および2000 mg/kgの用量を雌雄各3匹のラットに投与した予備試験では, いずれの投与群にも死亡例は認められなかった。以上の結果を参考にして, 本試験では雌雄ともに2000 mg/kgの1用量を設定し, さらにコーン油のみを投与する対照群を設けた。

5. 群分け

動物はあらかじめ体重によって層別化し, 無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。

6. 投与液の調製および投与方法

所定量の被験物質をコーン油(ナカライテスク(株))に溶解し投与液を調製した。溶液の濃度は, 2000 mg/kg群で40.0 w/v%であった。

投与経路は経口とし, 16時間絶食させた動物に注射ポンプと胃ゾンデを用い, 被験物質溶液を投与した。投与容量は体重100 gあたり0.5 mlとし, 個体別に測定した体重に基づいて算出した。給餌は被験物質投与3時間後に行った。

7. 一般状態の観察

中毒症状および生死の観察は, 投与後6時間までは1時間毎に, その後は1日2回(午前と午後, 休日は午前のみ)の割合で, 投与後14日まで実施した。

8. 体重

体重は投与直前, 投与後7および14日に測定した。

9. 病理学検査

観察期間終了時の生存例については, エーテル麻酔下で放血安楽死させ解剖した。肉眼的異常所見を記録した。

結果および考察

1. 死亡率およびLD₅₀値

2000 mg/kg群の雌雄いずれにも死亡例は認められず, LD₅₀値は雌雄とも2000 mg/kg以上と推定された。

2. 一般状態

対照群および2000 mg/kg群の雌雄全例において, 軟便が投与後1時間から認められたが, 投与後4時間には消失した。軟便の発現および消失の時間については, 対

照群と2000 mg/kg群の間で差は認められなかったことから、軟便は、媒体として用いたコーン油の投与によるものと考えられた。

3. 体重

対照群および2000 mg/kg群の雌雄全例において、投与後7および14日の測定で対照群とほぼ同様な増加が認められた。

4. 剖検所見

対照群および2000 mg/kg群の雌雄いずれにも、異常を示す所見は認められなかった。

連絡先

試験責任者：大庭耕輔

試験担当者：藤島 敦

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Kousuke Oba (Study director)

Atsushi Fujishima

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and

Pesticides (An-Pyo Center)

582-2 Shioshinden Arahama, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

Tel +81-538-58-1266 Fax +81-538-58-1393

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルの ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in Rats

要約

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルは、塩化ビニル用可塑剤として使用される化合物である。本化合物の毒性については、ほとんど報告がないため、今回、既存化学物質の安全点検に係わる毒性調査事業の一環として、SD系ラットを用いる強制経口投与による28日間反復投与毒性試験を実施した。

ラットは1群雌雄各5匹で4試験群、対照群および高用量群には雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステルは、コーンオイルに溶解し、0, 100, 300および1000 mg/kgを毎日1回、4週間連続経口投与し、一般状態の観察、体重測定、摂餌量測定、血液学検査、血液凝固検査、血液生化学検査、尿検査、器官重量測定および病理学検査を行った。なお、回復期間は2週間とし、投与終了時と同様な検査を実施した。

その結果は、次のとおりである。

一般状態の観察では、雌雄いずれの群にも異常動物は観察されず、死亡例もなかった。

体重、摂餌量、飼料効率、および血液生化学検査および器官重量には、雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

血液学検査の結果、雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

尿検査の結果、雌雄の1000 mg/kg群で尿量が増加した動物が認められたが、平均尿量および尿比重に有意差は認められなかった。

病理学検査の結果、肉眼および組織学的検索ともに、被験物質投与の影響が示唆される病変は観察されなかった。なお、肉眼所見において肺の有色斑/区域が、組織所見において腎臓の好酸性小体が、対照群に比べ雄の投与群に多く観察されたが、いずれも自然発生性病変が偶発的に増加したものと考えられた。

以上の結果、雌雄とも無影響量は1000 mg/kg/dayと判断された。

材料および方法

1. 被験物質

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル) エステル (CAS No.3319-31-1, 大八化学工業(株)提供) は淡黄色透明の油性液体で、分子式 $C_{33}H_{54}O_6$ 、分子量

546.87の化合物である。本試験に用いたロットN-60601の純度は99.0%以上であった。

2. 供試動物

供試したラット[Crj:CD(SD)系, SPF]は日本チャールス・リバー(株)(神奈川県)から4週齢で購入した。動物を検収後、試験環境に9日間馴化させた後、6週齢で投与を開始した。動物はあらかじめ体重によって層別化し、無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした。動物の識別は、個別飼育ケージに動物標識番号(Animal ID-No.)を付すことにより行った。投与開始時の体重は雄で130~151 g、雌で110~121 gであった。

3. 飼育条件

動物はバリアシステムの飼育室で飼育し、環境調節の目標値は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数20回/時、照明150~300 lux、12時間(午前7時点灯、午後7時消灯)とした。(株)東京技研サービスの水洗式飼育機を使用し、金属製前面・床網目飼育ケージに動物を1匹ずつ収容し、オリエンタル酵母工業(株)製造の放射線滅菌改良NIH公開ラット・マウス飼料および水道水を自由に摂取させた。飼育ケージは隔週1回、給餌器は週1回取り換えた。

なお、動物の馴化期間を含め、投与および回復期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

4. 試験群の構成

試験群は0, 100, 300および1000 mg/kgの4群とし、1群雌雄各5匹を用い、0および1000 mg/kg群に雌雄各5匹の回復群を設け、計60匹を使用した。

〔用量設定理由〕

本試験に先立って用量設定のための2週間投与試験(投与量: 0, 200, 600および1800 mg/kg)を実施した。その結果、一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、器官重量および病理学検査において被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。従って、28日間反復投与試験の高用量は、1000 mg/kgとし、以下公比3で除し、中用量を300 mg/kg、低用量を100 mg/kgに設定した。

5. 投与方法

被験物質の投与経路は経口とした。被験物質はコーン

油に溶解し、胃ゾンデを用いて経口投与した。投与容量は体重100 g当り0.5 mlとした。対照群には溶媒のみ投与した。

6. 投与液の調製、分析

被験物質は、各用量(100, 300および1000 mg/kg)ごとに所定量を精秤し、コーン油(ナカライテスク株)に溶解した。投与液は調製後、冷蔵庫保存で1週間安定であることが確認されているので、本試験においては毎週1回調製を行い、1日分毎に小分けをし使用時まで冷蔵庫に保管した。投与液の濃度分析をすべての群に関し投与1および4週の調製液について実施した結果、設定濃度の98.0~102%の範囲であり、適切に調製されていた。

7. 投与期間

投与期間は28日間とし、投与終了後0および1000 mg/kg群について2週間の回復試験を実施した。

8. 観察、測定および検査

1) 一般状態の観察

全動物を毎日午前、午後の2回観察し、中毒症状の有無、行動異常、死期の迫った動物および死亡動物の有無等を記録した。

2) 体重

投与開始から回復試験終了時まで、毎週1回測定した。

3) 摂餌量

毎週1回給餌した残量を測定し、飼料摂取量(g/week)を算出した。

4) 臨床検査

投与終了時および回復期間終了時の計2回実施した。採血するに当り、動物は約16時間絶食させた。動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

a. 血液学検査

EDTA-3Kを添加した初血を用い、白血球数(WBC:暗視野板法)、赤血球数(RBC:暗視野板法)、ヘモグロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(HCT:RBC, MCVより算出)、平均赤血球容積(MCV:暗視野板法)、平均赤血球血色素量(MCH:HGB, RBCより算出)、平均赤血球血色素濃度(MCHC:HGB, HCTより算出)、血小板数(PLT:暗視野板法)および白血球百分率(フローサイトケミストリー法)を血液自動分析装置THMS H・1E(米国マイルス社)を用いて測定した。

網赤血球(RC)率算定用に、血液塗抹標本を作製しメイ・グリュンワルド・ギムザで染色後、鏡検した。

また、クエン酸ソーダ添加血液の血漿について、プロトロンビン時間(Quick 1段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(クロット法)およびフィブリノーゲン量

(トロンビン時間法)を血液凝固自動測定装置KC-40(独国Amelung社)を用いて測定した。

b. 血液生化学検査

血清を用いて、総蛋白(ビューレット法)、アルブミン(B.C.G.法)、A/G比(計算値)、血糖(グルコースオキシダーゼ法)、中性脂肪(酵素法)、総コレステロール(酵素法)、尿素窒素(BUN:ウレアーゼアンモニア法)、総ビリルビン(ジアゾ色素法)、カルシウム(アルセナゾIII色素法)、無機リン(モリブデン酸ブルー法)、ナトリウム(電極法)、カリウム(電極法)および塩素(電極法)をEKTACHEM 700N(米国コダック社)で、クレアチニン(Jaffé法)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT:IFCC法)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT:IFCC法)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP:Szasz改法)およびアルカリホスファターゼ(ALP:Bessey-Lowry-Brock改良法)をCentrifiChem ENCORE II(米国ベーカー社)で測定した。

c. 尿検査

血液学検査に先立ち、採尿器を用いて24時間(午前10時から翌日午前10時まで)尿を採取し、尿量、色調および濁度を検査後、尿比重計UR-S(株アタゴ)を用いて尿比重を測定した。また、尿を遠心分離後Sternheimer変法により沈渣を染色し、鏡検した。pH、潜血、ケトン体、糖、蛋白、ビリルビンおよびウロビリノーゲンについて、N-マルティスティックスSG試験紙(マイルス・三共株)およびCLINITEK 200(米国マイルス社)を用いて測定した。

5) 病理学検査

病理解剖は投与終了時および回復期間終了時に動物をエーテル麻酔し、放血致死させ実施した。肉眼的異常を病理解剖所見記録シートに記録した。また、脳、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣について重量を測定し、器官重量・体重比を算出した。上記重量測定器官と下垂体、眼球、甲状腺(上皮小体を含む)、心臓、肺、胃、膀胱、骨髄(大腿骨)および肉眼所見で変化が認められた雄の肺を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

病理組織学検査は固定した器官・組織のうち、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および骨髄(大腿骨)については対照群と高用量群、雄の腎臓についてはすべての群について行った。常法に従って薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し鏡検した。

6) データの記録および統計分析

各試験群の体重、摂餌量、血液学検査値、血液生化学検査値、尿検査値(尿量および尿比重のみ)、器官重量および器官重量・体重比は、下記に示した自動判別方式に従い、最初にBartlettの等分散検定を実施した。等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、分散が有意で各群の標本数が同数の場合はDunnnettの多重比較検定、各群の標本数が異なる場合はDuncanの多重範囲検定で対照群と各投薬群間の有意差を検定した。Bartlettの等分

散検定で不等分散の場合はKruskal-Wallisの順位検定を実施し、有意の場合はノンパラメトリックのDunnettの多重比較検定で対照群と各被験物質投与群間の有意差を検定した。また、病理学検査結果についてはFisherの直接確率検定を実施した。なお、用量相関性については、Jonckheereの傾向検定を用いて有意差を検定した。

有意水準は5および1%の片側検定で実施した。

試験結果

1. 死亡率

投与期間中、雌雄とも対照群を含むすべての試験群で死亡例は認められなかった。

また、回復期間中、雌雄とも対照群および1000 mg/kg群で死亡例は認められなかった。

2. 一般状態の観察

投与期間および回復期間を通じて、雌雄いずれの群にも異常動物は観察されなかった。

3. 体重

投与期間および回復期間を通じて、雌雄とも対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

4. 摂餌量

投与期間および回復期間を通じて、雌雄とも対照群と被験物質投与群とで差が認められず、0~4週および5~6週の総摂餌量にも差は認められなかった。

5. 血液学検査 (Table 1)

[投与終了時の検査結果]

血液学検査に関しては、雌雄とも検査したすべての項目について、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

血液凝固検査に関しては、雄では、1000 mg/kg群で対照群に比較してプロトロンビン時間が僅かに延長を示したが、生理的変動の範囲内の値であった。雌では、対照群と被験物質投与群とで3項目とも差が認められなかった。

[回復試験終了時の検査結果]

血液学検査に関しては、雌の1000 mg/kg群で対照群に比較してヘモグロビン量が僅かに高値を示したが、生理的変動の範囲内の値であった。その他の項目は雌雄とも対照群と差がなかった。

血液凝固検査に関しては、すべての検査項目について雌雄の1000 mg/kg群と対照群とで差がなかった。

6. 血液生化学検査 (Table 2)

[投与終了時の検査結果]

雄では、検査を行ったすべての項目について対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。雌では、対照群に比較して300および1000 mg/kg群で塩素が低値

を示した。

[回復試験終了時の検査結果]

雄の1000 mg/kg群で対照群に比較してカリウムの僅かな高値が、また、雌の1000 mg/kg群で対照群に比較してGOTの僅かな高値が認められたが、軽微な変化であり、投与終了時にはこれらの項目で変化が認められておらず意義のある変化ではなかった。その他の項目は雌雄とも対照群と差がなかった。

7. 尿検査 (Table 3)

[投与終了時の検査結果]

雌雄とも1000 mg/kg群で尿量の増加した動物が認められたが、平均尿量および雌雄とも1000 mg/kg群で尿比重は対照群と差が認められなかった。

[回復試験終了時の検査結果]

雌雄とも1000 mg/kg群はすべての検査項目で対照群との間に明確な差が認められなかった。

8. 器官重量 (Table 4)

[投与終了時の検査結果]

雌雄とも重量測定を行ったすべての器官について、対照群と被験物質投与群とで差は認められなかった。

[回復試験終了時の検査結果]

雌の1000 mg/kg群で対照群に比較して副腎重量が高値を示した。その他の器官は雌雄とも1000 mg/kg群と対照群とで差が認められなかった。

9. 器官重量・体重比 (相対重量) (Table 4)

[投与終了時の検査結果]

雌の100 mg/kg群で対照群に比較して肝臓相対重量が高値を示したが、用量相関性のない変化であった。その他の器官は雌雄とも、対照群と被験物質投与群とで差が認められなかった。

[回復試験終了時の検査結果]

雄の1000 mg/kg群で腎臓相対重量の低値、雌の1000 mg/kg群で副腎相対重量の高値が認められた。

10. 病理学検査

a) 剖検所見 (Table 5)

投与終了時において、対照群に比較して被験物質投与群で多くみられた所見として、肺の有色斑/区域が雄で、100 mg/kg群の1例、300 mg/kg群の2例、1000 mg/kg群の3例に観察された。その他は、雄に腎臓の嚢胞と肥大、上皮小体の肥大など、雌に胸腺の赤色斑、子宮の内腔拡大など、いずれも1ないし2例の発生にとどまった。回復試験終了時の検査結果において、対照群に比較して被験物質投与群で多くみられた所見は観察されなかった。観察された所見はいずれも1ないし2例に発生し、肺の黒色斑、子宮の内腔拡大などであった。

Table 1 Hematology of rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	42.2 ± 1.5	41.5 ± 1.6	41.1 ± 1.4	42.3 ± 1.5	44.4 ± 1.5	45.6 ± 3.5
HGB (g/dl)	14.3 ± 0.3	14.0 ± 0.3	14.1 ± 0.4	14.4 ± 0.4	15.2 ± 0.5	15.7 ± 1.0
RBC (×10 ⁶ /mm ³)	7.12 ± 0.15	7.06 ± 0.12	6.99 ± 0.39	7.24 ± 0.29	7.89 ± 0.15N	8.25 ± 0.75
MCV (μm ³)	59.3 ± 1.7	58.8 ± 1.6	58.9 ± 1.9	58.5 ± 1.0	56.4 ± 1.5	55.4 ± 2.2
MCH (pg)	20.1 ± 0.2	19.9 ± 0.3	20.2 ± 0.7	19.9 ± 0.4	19.3 ± 0.6	19.0 ± 0.6
MCHC (%)	34.0 ± 0.9	33.8 ± 0.6	34.3 ± 0.3	34.1 ± 0.6	34.2 ± 0.7	34.4 ± 0.7
PLT (×10 ³ /mm ³)	1082 ± 122N	1281 ± 295	1051 ± 68	1155 ± 72	1011 ± 47N	981 ± 201
WBC (×10 ³ /mm ³)	13.0 ± 2.7	13.1 ± 3.4	11.4 ± 2.4	12.9 ± 2.6	13.4 ± 3.9	11.9 ± 2.1
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	10 ± 2N	13 ± 7	10 ± 2	9 ± 1	9 ± 2	11 ± 3
LYMPH	86 ± 2N	83 ± 7	86 ± 3	88 ± 1	87 ± 3	85 ± 3
MONO	2 ± 0	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	2 ± 1
EOSN	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	23 ± 4	25 ± 8	27 ± 3	26 ± 8	22 ± 6	22 ± 4
PT (sec.)	13.1 ± 0.2N	13.0 ± 0.3	13.4 ± 0.3	14.1 ± 1.2*	14.4 ± 0.7	14.3 ± 1.5
APTT (sec.)	25.8 ± 1.2N	25.7 ± 0.5	26.5 ± 1.2	28.2 ± 3.2	26.8 ± 2.6	26.1 ± 3.2
Fibrinogen (mg/dl)	275 ± 9	268 ± 15	266 ± 14	255 ± 32	269 ± 21	272 ± 13
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
HCT (%)	41.1 ± 0.5	40.4 ± 0.9	40.6 ± 1.2	41.0 ± 0.8	40.6 ± 1.0	42.0 ± 1.4
HGB (g/dl)	14.5 ± 0.2	14.0 ± 0.4	14.3 ± 0.5	14.4 ± 0.3	14.5 ± 0.2	15.1 ± 0.4**
RBC (×10 ⁶ /mm ³)	7.20 ± 0.20	7.10 ± 0.19	7.11 ± 0.33	7.16 ± 0.12	7.39 ± 0.21	7.67 ± 0.29
MCV (μm ³)	57.1 ± 1.3N	56.9 ± 1.1	57.2 ± 1.0	57.3 ± 0.2	55.0 ± 0.4	54.7 ± 1.2
MCH (pg)	20.1 ± 0.6	19.7 ± 0.7	20.1 ± 0.4	20.2 ± 0.2	19.7 ± 0.7	19.7 ± 0.4
MCHC (%)	35.3 ± 0.3	34.7 ± 0.6	35.2 ± 0.4	35.2 ± 0.4	35.7 ± 1.2N	36.0 ± 0.3
PLT (×10 ³ /mm ³)	1086 ± 58	1115 ± 115	1142 ± 127	1233 ± 177	1046 ± 127	1105 ± 84
WBC (×10 ³ /mm ³)	5.7 ± 1.3	5.4 ± 1.4	5.6 ± 1.7	5.5 ± 1.6	8.4 ± 2.3	6.9 ± 1.1
Differential leukocyte counts (%)						
NEUT	11 ± 3	15 ± 4	13 ± 2	13 ± 4	11 ± 3	14 ± 5
LYMPH	85 ± 3	81 ± 4	82 ± 3	83 ± 4	84 ± 3	83 ± 6
MONO	1 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 1
EOSN	2 ± 1	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 0
BASO	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
LUC	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Reticulocyte (%)	13 ± 3	20 ± 7	20 ± 6	20 ± 10	23 ± 5	31 ± 9
PT (sec.)	14.3 ± 0.5	13.6 ± 0.2	13.9 ± 0.5	13.9 ± 0.4	14.1 ± 0.1N	14.0 ± 0.3
APTT (sec.)	23.0 ± 1.2	23.0 ± 1.2	22.5 ± 0.5	22.3 ± 1.4	20.5 ± 1.9	19.5 ± 2.1
Fibrinogen (mg/dl)	189 ± 20	202 ± 10	196 ± 14	191 ± 13	223 ± 15	226 ± 22

NEUT: Neutrophil LYMPH: Lymphocyte MONO: Monocyte EOSN: Eosinophil BASO: Basophil LUC: Large unstained cells

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 2 Blood chemistry of rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	10.0 ± 1.6N	12.7 ± 9.0	8.8 ± 1.0	10.3 ± 2.1	10.8 ± 1.1	12.2 ± 2.7
Creatinine (mg/dl)	0.61 ± 0.05	0.75 ± 0.08	0.66 ± 0.08	0.74 ± 0.10	0.69 ± 0.03	0.68 ± 0.07
T.cholesterol (mg/dl)	50 ± 8N	63 ± 30	44 ± 3	40 ± 13	39 ± 9	51 ± 22
T.protein (g/dl)	5.43 ± 0.16	5.41 ± 0.17	5.44 ± 0.19	5.39 ± 0.26	5.59 ± 0.19	5.76 ± 0.26
Albumin (g/dl)	3.12 ± 0.05	3.07 ± 0.21	3.13 ± 0.10	3.13 ± 0.11	3.16 ± 0.10	3.25 ± 0.19
A/G	1.35 ± 0.06	1.32 ± 0.14	1.36 ± 0.06	1.40 ± 0.13	1.30 ± 0.04	1.29 ± 0.07
Glucose (mg/dl)	138 ± 15	151 ± 15	145 ± 7	137 ± 13	145 ± 23	148 ± 10
Triglyceride (mg/dl)	65.0 ± 20.3	89.6 ± 30.9	63.2 ± 15.2	64.9 ± 47.8	69.6 ± 28.7	75.6 ± 15.0
GOT (U/l)	41 ± 9	53 ± 9	45 ± 3	47 ± 4	42 ± 5	42 ± 4
GPT (U/l)	12 ± 3	14 ± 2	11 ± 2	13 ± 2	12 ± 2	13 ± 4
ALP (U/l)	158 ± 27	146 ± 25	169 ± 34	184 ± 49	118 ± 31	133 ± 22
γ-GTP (U/l)	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.8	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2
T.bilirubin (mg/dl)	0.14 ± 0.03N	0.21 ± 0.22	0.12 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.13 ± 0.03
Sodium (mmol/l)	141.7 ± 0.9	142.6 ± 1.6	142.4 ± 1.1	142.7 ± 1.3	143.8 ± 0.5N	144.2 ± 2.1
Potassium (mmol/l)	4.75 ± 0.10	4.81 ± 0.21	4.66 ± 0.25	4.68 ± 0.12	4.61 ± 0.18	4.91 ± 0.20*
Chloride (mmol/l)	107.0 ± 1.4	107.1 ± 0.8	107.3 ± 1.7	107.5 ± 0.6	108.3 ± 1.9	105.6 ± 2.5
Calcium (mg/dl)	10.13 ± 0.32	10.00 ± 0.28	9.84 ± 0.36	9.81 ± 0.35	9.71 ± 0.25	9.77 ± 0.34
I.phosphate (mg/dl)	8.19 ± 0.48	8.43 ± 0.42	7.88 ± 0.65	8.48 ± 0.76	7.46 ± 0.69	7.37 ± 0.69
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
BUN (mg/dl)	12.8 ± 2.3	11.3 ± 1.0	12.1 ± 1.0	15.4 ± 3.3	13.7 ± 0.6N	14.2 ± 2.2
Creatinine (mg/dl)	0.55 ± 0.14	0.61 ± 0.05	0.58 ± 0.08	0.61 ± 0.10	0.68 ± 0.11	0.80 ± 0.07
T.cholesterol (mg/dl)	30 ± 16	40 ± 10	48 ± 12	39 ± 12	49 ± 13	54 ± 12
T.protein (g/dl)	5.44 ± 0.11	5.61 ± 0.22	5.54 ± 0.22	5.80 ± 0.29	5.69 ± 0.17	5.88 ± 0.20
Albumin (g/dl)	3.29 ± 0.07	3.45 ± 0.20	3.36 ± 0.14	3.59 ± 0.22	3.38 ± 0.15	3.49 ± 0.14
A/G	1.54 ± 0.08	1.60 ± 0.09	1.55 ± 0.07	1.62 ± 0.12	1.46 ± 0.07	1.46 ± 0.06
Glucose (mg/dl)	108 ± 8	121 ± 9	117 ± 10	108 ± 8	125 ± 17	126 ± 9
Triglyceride (mg/dl)	33.8 ± 6.6	34.3 ± 3.7	39.1 ± 7.3	29.9 ± 3.2	43.6 ± 6.2	45.5 ± 9.6
GOT (U/l)	50 ± 10	55 ± 7	51 ± 8	61 ± 12	52 ± 8	62 ± 12
GPT (U/l)	11 ± 2	10 ± 2	11 ± 2	11 ± 1	10 ± 1N	13 ± 4*
ALP (U/l)	100 ± 22	90 ± 20	102 ± 49	102 ± 40	79 ± 15	86 ± 34
γ-GTP (U/l)	0.7 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.4
T.bilirubin (mg/dl)	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.19 ± 0.04
Sodium (mmol/l)	142.8 ± 0.7	142.3 ± 0.6	141.9 ± 1.0	142.7 ± 1.4	142.9 ± 0.8	143.0 ± 1.4
Potassium (mmol/l)	4.45 ± 0.12	4.55 ± 0.17	4.55 ± 0.24	4.66 ± 0.30	4.58 ± 0.37	4.68 ± 0.20
Chloride (mmol/l)	111.3 ± 1.5	110.3 ± 0.9	109.2 ± 1.8*	108.1 ± 0.5**	111.3 ± 1.4	110.8 ± 1.0
Calcium (mg/dl)	9.61 ± 0.17	9.67 ± 0.09	9.65 ± 0.07	9.75 ± 0.24	9.58 ± 0.15	9.77 ± 0.22
I.phosphate (mg/dl)	6.01 ± 0.76	6.23 ± 0.54	6.29 ± 0.57	6.41 ± 0.63	5.91 ± 0.63	6.30 ± 0.39

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 3 Urinalysis of rats treated orally with tris (2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	13 ± 3	20 ± 10	16 ± 5	23 ± 14	16 ± 4	20 ± 10
Specific gravity	1.059 ± 0.011	1.044 ± 0.018	1.038 ± 0.023	1.040 ± 0.025	1.033 ± 0.010	1.033 ± 0.021
Color	Colorless	0	0	0	1	0
	Slight yellow	5	5	5	4	5
Turbidity	Clear	5	5	5	5	5
	muddy	5	5	5	5	5
pH	6	0	1	0	0	0
	7	0	0	1	2	0
	7.5	1	1	0	0	1
	8	0	0	0	1	2
	8.5	1	0	1	0	1
	≥9	3	3	3	2	3
Occult blood	-	5	4	5	4	5
	+/-	0	0	0	1	0
	2+	0	1	0	0	0
Ketones	-	0	0	1	1	0
	+/-	2	3	3	2	2
	1+	2	2	1	2	3
	2+	1	0	0	0	0
Glucose	-	5	5	5	5	5
(g/dl)						
Protein	+/-	0	0	0	1	0
(mg/dl)	30	1	0	4	2	5
	100	1	3	0	0	0
	≥300	3	2	1	2	0
Bilirubin	-	3	5	4	4	5
	1+	2	0	1	1	0
Urobilinogen	0.1	1	0	3	3	3
(E.U./dl)	1.0	4	5	2	2	2
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5
Leukocytes	-	5	5	5	5	5
Epith. cells	-	5	5	5	5	5
Casts	-	5	5	5	5	5
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	4	3	4	5
	+	0	1	2	1	0
others	-	0	2	2	2	4
	+	5	3	3	3	1

Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, others: Crystals

Values of volume and specific gravity are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals

Table 3 (continued)

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Volume (ml)	12 ± 3N	11 ± 5	11 ± 4	17 ± 13	9 ± 4	12 ± 4
Specific gravity	1.043 ± 0.008	1.042 ± 0.020	1.053 ± 0.017	1.049 ± 0.028	1.068 ± 0.024N	1.037 ± 0.006
Color	Colorless	0	0	0	1	0
	Slight yellow	5	5	5	4	5
	Yellow-brown	0	0	0	0	1
Turbidity	Clear muddy	5	5	5	5	5
pH	6	0	0	2	2	0
	6.5	1	0	2	0	1
	7	1	1	0	2	0
	7.5	1	1	1	0	1
	8	0	1	0	1	0
	8.5	0	1	2	0	1
	≥9	2	1	0	0	1
Occult blood	-	5	5	5	5	3
	+/-	0	0	0	0	2
Ketones	-	1	2	1	2	1
	+/-	4	2	2	1	3
	1+	0	1	2	2	0
Glucose	-	5	5	5	5	5
(g/dl)						
Protein	-	0	2	1	2	0
(mg/dl)	+/-	1	0	1	0	1
	30	3	0	0	1	0
	100	1	3	1	1	2
	≥300	0	0	2	1	3
Bilirubin	-	5	5	2	4	1
	1+	0	0	3	1	4
Urobilinogen	0.1	0	2	1	2	0
(E.U./dl)	1.0	5	3	4	3	5
Erythrocytes	-	4	4	5	5	4
	1+	1	1	0	0	1
Leukocytes	-	5	5	5	5	5
Epith. cells	-	5	5	5	5	5
Casts	-	5	5	5	5	5
Fat glob.	-	5	5	5	5	5
M. threads	-	5	5	5	5	5
others	-	0	2	3	3	1
	+	5	3	2	2	4

Fat glob.: Fat globule, M. threads: Mucous threads, others: Crystals

Values of volume and specific gravity are expressed as Mean ± S.D., other values are expressed as No. of animals

N: Non parametric analysis

Table 4 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
	0	100	300	1000	0	1000
Male						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	343 ± 22	329 ± 28	328 ± 25	334 ± 18	378 ± 29	378 ± 38
Absolute organ weight						
Brain (g)	2.00 ± 0.04	2.06 ± 0.06	2.08 ± 0.06	2.07 ± 0.09	2.16 ± 0.11	2.10 ± 0.07
Liver (g)	11.03 ± 0.48	11.37 ± 0.96	10.62 ± 0.75	11.24 ± 1.66	10.62 ± 0.95	11.17 ± 1.67
Kidneys (g)	3.02 ± 0.72N	4.24 ± 4.02	2.45 ± 0.15	2.52 ± 0.17	2.84 ± 0.43	2.54 ± 0.29
Spleen (g)	0.60 ± 0.06	0.59 ± 0.09	0.55 ± 0.06	0.59 ± 0.06	0.63 ± 0.06	0.63 ± 0.07
Adrenals (mg)	47 ± 7	45 ± 5	45 ± 9	47 ± 9	48 ± 6	46 ± 9
Testes (g)	2.79 ± 0.12	2.82 ± 0.28	2.90 ± 0.25	2.75 ± 0.11	3.00 ± 0.17	3.10 ± 0.25
Relative organ weight						
Brain (%)	0.585 ± 0.030	0.628 ± 0.047	0.637 ± 0.043	0.620 ± 0.037	0.574 ± 0.037	0.560 ± 0.053
Liver (%)	3.224 ± 0.136	3.471 ± 0.447	3.247 ± 0.153	3.356 ± 0.349	2.812 ± 0.177	2.943 ± 0.207
Kidneys (%)	0.891 ± 0.260N	1.358 ± 1.426	0.752 ± 0.084	0.757 ± 0.093	0.749 ± 0.063	0.671 ± 0.032*
Spleen (%)	0.176 ± 0.019	0.183 ± 0.044	0.170 ± 0.025	0.175 ± 0.014	0.166 ± 0.016	0.168 ± 0.023
Adrenals (%)	0.014 ± 0.002	0.014 ± 0.001	0.014 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.012 ± 0.002
Testes (%)	0.816 ± 0.069N	0.862 ± 0.112	0.885 ± 0.028	0.825 ± 0.031	0.796 ± 0.068	0.823 ± 0.071
Female						
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	202 ± 14	204 ± 26	216 ± 18	209 ± 15	226 ± 14	228 ± 19
Absolute organ weight						
Brain (g)	1.87 ± 0.06	1.87 ± 0.06	1.91 ± 0.10	1.94 ± 0.10	1.95 ± 0.07	1.96 ± 0.11
Liver (g)	5.65 ± 0.78	6.51 ± 0.74	6.51 ± 0.66	6.27 ± 0.52	6.03 ± 0.35	6.20 ± 0.72
Kidneys (g)	1.62 ± 0.13	1.65 ± 0.09	1.66 ± 0.14	1.65 ± 0.22	1.65 ± 0.16	1.71 ± 0.25
Spleen (g)	0.39 ± 0.08	0.37 ± 0.09	0.40 ± 0.08	0.37 ± 0.06	0.42 ± 0.06	0.43 ± 0.07
Adrenals (mg)	59 ± 13	58 ± 5	63 ± 4	60 ± 12	58 ± 5	70 ± 8*
Ovaries (mg)	85 ± 20	95 ± 16	87 ± 14	77 ± 16	75 ± 7	91 ± 23
Relative organ weight						
Brain (%)	0.926 ± 0.077	0.924 ± 0.096	0.886 ± 0.067	0.931 ± 0.094	0.862 ± 0.062	0.861 ± 0.046
Liver (%)	2.781 ± 0.194	3.191 ± 0.072**	3.013 ± 0.193	2.995 ± 0.175	2.663 ± 0.066	2.711 ± 0.128
Kidneys (%)	0.802 ± 0.031	0.812 ± 0.067	0.770 ± 0.052	0.789 ± 0.080	0.728 ± 0.060	0.747 ± 0.059
Spleen (%)	0.192 ± 0.031	0.178 ± 0.019	0.184 ± 0.028	0.178 ± 0.024	0.187 ± 0.026	0.188 ± 0.016
Adrenals (%)	0.029 ± 0.005	0.029 ± 0.003	0.029 ± 0.003	0.029 ± 0.004	0.026 ± 0.003	0.031 ± 0.002**
Ovaries (%)	0.042 ± 0.007	0.046 ± 0.005	0.040 ± 0.005	0.037 ± 0.007	0.033 ± 0.003	0.039 ± 0.007

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 5 Summary of gross findings in rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)				14 days recovery groups (mg/kg)	
			0	100	300	1000	0	1000
Male								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	black patch/zone	0	0	0	0	1	1
		colored patch/zone	0	1	2	3	0	0
URINARY SYSTEM								
	kidney	cyst	1	1	0	0	0	0
		enlarged	0	1	0	0	0	0
	ureter	dilated lumen	0	1	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM								
		parathyroid gland						
		hypertrophic	0	0	0	1	0	0
Female								
		No. of animals necropsied	5	5	5	5	5	5
HEMATOPOIETIC SYSTEM								
	thymus	red patch/zone	0	0	1	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM								
	lung	colored patch/zone	0	0	0	0	1	0
DIGESTIVE SYSTEM								
	liver	white patch/zone	0	1	0	0	0	0
REPRODUCTIVE SYSTEM								
	uterus	dilated lumen	0	1	0	0	1	2

b) 組織所見 (Table 6)

投与終了時において、対照群に比較して被験物質投与群に多い発生を示した所見として、腎臓の好酸性小体が雄の対照群、100 mg/kg群、300 mg/kg群および1000 mg/kg群の順に、0, 1, 1および3例と投与群にやや多く観察された。

その他、肺の出血および細胞浸潤、肝臓の肉芽巣、腎臓の好塩基化、石灰沈着、副腎の空胞化などが観察された。

回復試験終了時の検査結果において、対照群に比較して被験物質投与群で多くみられた所見は観察されなかった。腎臓の好酸性小体は対照群でも軽度の所見が1例観察された。

その他、肺の出血、腎臓の好塩基化、石灰沈着など、投与終了時計画屠殺動物に観察された所見とはほぼ同様の所見が観察された。

考察および結論

一般状態の観察で、雌雄いずれの群にも異常動物は認められず死亡例も認められなかった。

体重および摂餌量は、雌雄とも対照群と被験物質投与群で差がなく、被験物質投与の影響は認められなかった。また、体重および摂餌量に変化が認められないことから、飼料効率にも被験物質投与の影響は認められなかった。

血液学検査の結果、雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。また、凝固検査においても被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

血液生化学検査の結果、雄では被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。雌では、対照群に比較して300および1000 mg/kg群で塩素の低値が認められたが、ナトリウムおよびカリウムに変化は認められず、塩素の変化自体も軽微であることから、毒性学

Table 6 Summary of histopathological findings in rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in the twenty-eight-day repeated dose toxicity test

Item	Organ	Findings	28 days dosing groups (mg/kg)												14 days recovery groups (mg/kg)					
			0			100			300			1000			0			1000		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Male																				
No. of animals necropsied																				
			5			5			5			5			5			5		
RESPIRATORY SYSTEM																				
lung																				
			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
hemorrhage			3	0	0	3	0	0	3	0	0	4	0	0	2	0	0	1	0	0
accumulation of foamy cells			0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
infiltration/cellular			3	0	0	1	0	0	4	0	0	4	0	0	1	0	0	1	0	0
interstitial pneumonia			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
fibrosis			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DIGESTIVE SYSTEM																				
liver																				
			(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
bile duct dilatation			0	1	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
necrosis, focal			1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
granulation			3	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-
infiltration/cellular			1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
lymphocytic infiltration			2	0	0	-	-	-	-	-	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-
bile duct hyperplasia			0	1	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
extramedullary hematopoiesis			1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
URINARY SYSTEM																				
kidney																				
			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)			(5)		
basophilic change			3	1	0	4	0	0	4	0	0	3	0	0	5	0	0	3	0	0
cyst			1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
deposit of calcium			1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
eosinophilic body			0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0	1	0	0	1	1	0
protein cast			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tubular dilatation			1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
lymphocytic infiltration			5	0	0	4	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0
scarring			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ENDOCRINE SYSTEM																				
adrenal gland																				
			(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
vacuolic change			3	0	0	-	-	-	-	-	-	4	0	0	-	-	-	-	-	-
Female																				
No. of animals necropsied																				
			5			5			5			5			5			5		
DIGESTIVE SYSTEM																				
liver																				
			(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
granulation			4	0	0	-	-	-	-	-	-	5	0	0	-	-	-	-	-	-
lymphocytic infiltration			2	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
URINARY SYSTEM																				
kidney																				
			(5)			(0)			(0)			(5)			(0)			(0)		
basophilic change			4	0	0	-	-	-	-	-	-	2	0	0	-	-	-	-	-	-
deposit of calcium			1	0	0	-	-	-	-	-	-	1	0	0	-	-	-	-	-	-
deposit of pigment			1	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
lymphocytic infiltration			2	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-

1:slight 2:moderate 3:marked

Numbers in parenthesis indicate No. of animals examined microscopically at this site.

的意義は乏しいと考えられる。

尿検査の結果、雌雄とも1000 mg/kg群で尿量の増加した動物が認められたが、その他の定性項目、沈渣には被験物質投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

器官重量測定の結果、投与終了時の測定では雌雄とも被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。回復期間終了時の測定では、1000 mg/kg群の雄で腎臓相対重量の低値、雌で副腎の実重量および相対重量の高値が認められたが、いずれも軽微な変化で、被験物質投与とそれに続く投与の休止に関連した変化とは考えられなかった(背景値、雄腎臓相対重量: 0.73 ± 0.06%, n=50, 雌副腎実重量; 66 ± 7 mg, n=50, 雌副腎相対重量: 0.028 ± 0.004%, n=50)。

病理学検査の結果、対照群と比較して投与群に多くみられた所見として、肉眼所見では投与終了時計画屠殺動物において肺の有色斑/区域が、また、組織所見では腎臓に好酸性小体が、ともに雄にそれぞれ観察された。肺の有色斑/区域については、直径1~2 mm程度の褐色あるいは黒色調の小さな斑点が、単一あるいは少数個観察された。組織学的には限局性の出血、その周囲間質への炎症細胞浸潤などで説明される変化と考えられた。これらの組織変化は、雄の全群を通じて発生率ならびに程度に差はみられなかったことから、被験物質投与による変化ではなく、自然発生的な変化と考えられた。

また、腎臓の好酸性小体については、hyalin bodyの1種とされており²⁾ d-Limoneneや無鉛ガソリンなどの化学物質の影響で特に雄の近位尿細管での顕著な発生が報告されている²⁾。しかし、本所見は雄に自然発生性にも観察され、過去に当センターで実施した同系統、同週齢の背景値(8試験、雄45匹)によると22.2% (0~100%)の発生率で観察されていること、雄の1000 mg/kg群に特に多く観察されたものの全例には観察されず、また全投与群を通じて明らかな用量相関もみられないこと、回復試験群の対照群にも観察されたことから、肺の肉眼所見同様、自然発生性病変が偶発的に投与群に多くみられたものと考えられた。また、その他に観察された所見も発

生率および程度に用量相関性は認められずすべて自然発生病変と考えられた。

以上のことから、本被験物質は、最大投与可能量の1000 mg/kg投与でも明確な被験物質投与の影響は示唆されず無影響量は雌雄とも1000 mg/kg/dayと判断された。

参考文献

- 1) 渡辺満利, "泌尿器系, 毒性病理学," 前川昭彦, 林裕造編, 地人書館, 東京, 1991, p. 229.
- 2) Carl L. Alden and Charles H. Frith, "Urinary System, Handbook of toxicologic pathology," ed. by Wanda M. Haschek and Colin G. Rousseauk, Academic Press, Inc., San Diego, 1991, pp.340-342

連絡先

試験責任者: 井上博之

試験担当者: 各務 進, 庄子明德, 渡 修明,
小林和雄, 山本慎二

(財)食品農医薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜 582-2

Tel 0538-58-1266 Fax 0538-58-1393

Correspondence

Authors: Hiroyuki Inoue (Study director),

Susumu Kakamu, Akinori Shoji,

Nobuaki Watari, Kazuo Kobayashi,

Shinji Yamamoto

Biosafety Research Center, Foods, Drugs and
Pesticides (An-pyo Center)

582-2 Shioshinden Aza Arahama, Fukude-cho,

Iwata-gun, Shizuoka, 437-12, Japan

Tel 81-538-58-1266 Fax 81-538-58-1393

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル のラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of Tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate by Oral Administration in Rats

要約

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル100, 300および1000 mg/kgを雄ラットに対しては交配前, 交配期間および交配後の計46日間, 雌ラットに対しては交配前, 交配および妊娠期間, ならびに哺育3日までの期間, 経口反復投与し, 雌雄ラットへの反復投与による影響, 雌雄ラットの生殖および次世代の発生に及ぼす影響についてスクリーニング試験を実施して, 以下の知見を得た。

反復投与毒性では, 雄の精巣の病理組織学検査で300 mg/kg群の2例および1000 mg/kg群の12例全例に精母細胞および精子細胞の減少が認められた。雌雄の一般状態, 体重推移, 摂餌量, 剖検所見, 生殖器重量および卵巣の病理組織学所見にはいずれの投与群においても被験物質投与による影響は認められなかった。以上のことから, 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルの反復投与による無影響量は, 雄で100 mg/kg/day, 雌で1000 mg/kg/dayであると判断された。

生殖発生毒性では, 上述の如く雄の精巣に病理組織学的変化が認められたが, 生殖能検査, 生殖器重量, 分娩および母性行動, 新生児の生存率, 一般状態, 体重推移および剖検所見に被験物質投与による影響は認められなかった。以上のことから, 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルの雄の生殖に対する無影響量は100 mg/kg/day, 雌の生殖に対する無影響量は1000 mg/kg/day, 次世代の発生に対する無影響量は1000 mg/kg/dayであると判断された。

方法

1. 被験物質

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルは, 淡黄色透明液体であり, 遮光気密容器に入れ, 室温で保存した。本試験では, 大八化学工業(株)製造のロット番号N-80301(純度:99.0%)を使用した。なお, 被験物質は投与期間中安定であったことが製造業者の分析により確認された。

投与には, 被験物質を20, 60および200 mg/mLの濃度となるようにトウモロコシ油(片山化学工業(株))に溶解して調製した。調製頻度は7日間に1回以上とし, 投与に用いるまで遮光気密容器に入れ, 室温で保存した。各濃度の調製液は規定の濃度であり, かつ均一であることがエヌシー技研(株)により確認された。

2. 試験動物および飼育条件

生後8週齢のCrj:CD(SD)系のSPFラットを日本チャールス・リバー(株)から受け入れ, 14日間の検疫・馴化を行い, 順調な発育を示した動物を試験に用いた。雌については, 10日間の性周期検査を併せて行い, 性周期に異常の認められない動物を用いた。

動物は, 温度 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$, 換気回数10~15回/時間および照明時間12時間に設定されたバリアシステムの飼育室において, ブラケット式金属製金網床ケージを用いて飼育した。雌は, 妊娠17日から金網床のかわりに実験動物用床敷(ホワイトフレック, 日本チャールス・リバー(株))を敷いたステンレス製受皿を使用した。ケージ当たりの収容匹数は, 群分け前は2匹以内, 群分け後は1匹, 交配中は雌雄各1匹, 妊娠期間中は1母動物, 哺育期間中は1腹とした。飼料は固形飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を金属製給餌器を用いて, 飲料水は水道水(札幌市水道水)を自動給水装置を用いて, それぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量の設定, 試験群の構成および群分け

1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル100, 300および1000 mg/kgを雌雄各5例に14日間反復経口投与した予備試験では, 雌の100および1000 mg/kg群で摂餌量の低値傾向, 雌の1000 mg/kg群で体重の低値傾向がみられた。したがって, 最高用量は親動物に対して毒性を与えるが死亡させない量として, 予備試験と同じ1000 mg/kg/dayとし, 以下, 予備試験と同じく公比約3で, 300および100 mg/kg群を設定した。さらに媒体であるトウモロコシ油を投与する対照群を設け, 計4群とし, 動物数は1群当たり雌雄各12匹を用いた。群分けは, 投与開始前日に投与開始前々日の体重値をもとに各群の体重が均一になるように体重別層化無作為抽出法を用いて行った。

4. 投与方法

投与経路は経口投与とし, 胃ゾンデを用いて強制的に胃内に投与した。

投与期間は, 雄については交配前14日間および交配期間を含む46日間, 雌については交配前14日間および交尾までの交配期間, さらに交尾例は妊娠期間および哺育3日までの期間とした。

投与容量は, 体重1 kg当たり5 mLとして投与日に当日または最も近い日の体重に基づいて算出した。投与は10週齢から開始し, 投与開始時の平均体重(体重範囲)

は雄で401.2 g(373~435 g), 雌で 237.4 g(217~257 g)であった。

5. 観察, 測定および検査項目

(1) 一般状態

一般状態は, 1日1回以上の頻度で, 視診および触診により行動, 外観を観察した。

(2) 体重測定

体重は, 投与1日(投与前), 投与2, 5, 7, 10および14日, その後は雄については7日毎(投与終了日を含む)および剖検日に, 雌については妊娠0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17および20日, 哺育0, 1および4日に, また交配期間中(雄と同居中)は相手雄の測定日と同じ日に電子天秤を用いて体重を測定した。雄については投与1から46日の, 雌については投与1から14日, 妊娠0から20日および哺育0から4日の体重増加量および体重増加率を算出した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は, 雄については交配期間および剖検日を除き, 雌については妊娠0日および哺育0日を除き体重測定日と同じ日(投与終了日を除く)に電子天秤を用いて測定した。

(4) 剖検および器官重量測定

雄については交尾成立例は投与46日の翌日に, 交尾不成立例は交配期間終了の翌日に, エーテル麻酔下で採血後, 放血致死させ, 全身の器官および組織を肉眼的に観察した。雌については交尾不成立例は交配期間終了の翌日に, 哺育3日まで生存児のみられた例は哺育4日に, 妊娠25日まで分娩の認められない例は妊娠26日に, エーテル麻酔下で放血致死させ, 全身の器官および組織を肉眼的に観察し, 子宮の着床痕および卵巣の妊娠黄体を計数した。さらに, 雌雄の全例について, 精巣, 精巣上体および卵巣の重量を電子天秤を用いて測定するとともに, 器官体重重量比を算出した。

(5) 病理組織学検査

雄全例の精巣および精巣上体について, パラフィン包埋後薄切し, ヘマトキシリン・エオジン染色標本あるいは精巣のセルトリ細胞を確認するため, ストレプトアビジン・ビメンチン法を用いた免疫酵素抗体染色標本作製し, 病理組織学検査を行った。また, Matsui et al. の方法¹⁾に従い, 精細管上皮の減少傾向がみられた例を優先して各群5例を選び, 精子形成サイクルの14ステージのうち, ステージI~VI(Group 1), ステージVII~VIII(Group 2), ステージIX~XI(Group 3), ステージXII~XIV(Group 4)について各グループに属する精細管を5本ずつ任意に選択して, 精上皮細胞数をカウントし, 各グループ毎に1精細管あたりの〔生殖細胞(精子細胞および精母細胞)数/セルトリ細胞数〕を算出した。雌については, 全例の卵巣をパラフィン包埋後薄切し, ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し, 病理組織学検査を行った。

(6) 生殖能検査

雌全例について, 投与開始日の10日前から交尾まで

の連日, ギムザ染色による腔垢塗抹標本作製し, 光学顕微鏡下で性周期段階(発情前期, 発情期前期, 発情期後期, 発情後期および発情休止期)の判定を行い, 性周期の異常の有無を検索した。

投与14日の雌雄について, 同試験群内で夕方から1対1(無作為組み合わせ)で14日間を限度として同居させた。交尾成立は雌の腔垢中に精子が確認された場合とし, その日を妊娠0日とした。妊娠の成立は雌の子宮に着床痕が確認された場合とした。交尾率〔(交尾動物数/同居動物数)×100〕および受胎率〔(受胎動物数/交尾動物数)×100〕を算出した。

(7) 分娩および母性行動

交尾した雌全例について, 妊娠21日から分娩終了日まで分娩状態を観察し, 午前9時に分娩が終了していた動物を当該日分娩とし, その日を哺育0日とした。分娩終了が確認された母動物について母性行動, 総出産児数, 生児数および死亡児数, 出産児の性別および外表を観察した。また, 妊娠期間〔妊娠0日から哺育0日(分娩終了日)までの日数〕, 出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕, 分娩率〔(総出産児数/着床痕数)×100〕, 出生率〔(出生生児数/総出産児数)×100〕, 哺育4日時哺育率〔(哺育4日時に哺育児の認められる雌動物数/正常に分娩した雌動物数)×100〕および性比〔雄生児数/雌生児数〕を算出し, 解剖時の計測結果から着床率〔(着床痕数/妊娠黄体数)×100〕を算出した。

(8) 新生児の一般状態および生存率

全例について, 哺育0日から哺育4日まで1日1回生存および死亡を確認し, 一般状態および外表について観察した。観察結果から, 新生児の哺育4日の生存率〔(哺育4日生児数/出生生児数)×100〕を1腹を単位として算出した。なお, 喰殺を受け死亡あるいは不明例となった新生児は死亡例として扱った。

(9) 新生児の体重測定

測定対象となる全例について, 哺育0および4日に電子天秤を用いて測定し, 体重値は1腹に雌雄別に1匹あたりの平均値で示した。得られた測定値から体重増加量〔(哺育4日体重-哺育0日体重)〕および体重増加率〔(体重増加量/哺育0日体重)×100〕を算出した。

(10) 新生児の剖検

死亡例は発見後直ちに剖検し, その他の例については哺育4日に体外表(口腔内を含む)を観察した後, 二酸化炭素吸入法を用いて安楽致死させ, 全身の器官および組織を肉眼的に観察した。死亡例および異常所見部位の認められた例については, whole bodyを10%中性緩衝ホルマリン液で固定し, 保存した。

6. 統計解析

性周期, 交尾率, 受胎率, 出産率および哺育率, ならびに病理組織学検査結果のうち1段階の陽性グレードがみられた所見については, 多試料 χ^2 -検定を行い, 有意な場合2試料 χ^2 -検定を行った。また, これらの検定に不適合の場合はFisherの直接確率検定法を用いた。

その他の項目および病理組織学検査の結果のうち2段

階以上の陽性グレードがみられた所見については Bartlett の等分散性検定後、一元配置分散分析法あるいは Kruskal-Wallis 法により解析し、有意な場合、Dunnnett の検定法あるいは Mann-Whitney の U-検定法により、対照群と 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステル各投与群との比較を行った。

対照群との検定に際しては、有意水準を 5 および 1% とした。

結果

1. 反復投与毒性

(1) 一般状態

雌雄ともに、いずれの群にも異常は認められなかった。

(2) 体重推移 (Table 1, 2)、摂餌量および器官重量

雌雄ともに、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

(3) 剖検

雄では、腎臓に腎盂の拡張が 300 mg/kg 群で 1 例に、嚢胞が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められた。他に精巣上体に黄白色斑が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められ、いずれも先天性の異常と考えられた。

雌では、頭頂骨の隆起が 100 mg/kg 群の交尾不成立の 1 例に、空腸の憩室が 300 mg/kg 群の 1 例に認められた。

(4) 病理組織学検査 (Table 3, 4)

雄では、精巣の病理組織学検査で、精母細胞および精子細胞の軽度の減少が 300 mg/kg 群で 2 例、1000 mg/kg 群で 11 例、中等度の同所見が 1000 mg/kg 群で 1 例に認められた。中等度の精母細胞および精子細胞の減少が認められた 1000 mg/kg 群の 1 例では精細管内に多核巨細胞の軽度の出現およびセルトリ細胞の軽度の空胞化も認められ、精巣上体には管腔内に中等度の細胞残屑ならびに精子の中等度の減少が認められた。また、剖検で精巣上体に黄白色斑が認められた 1000 mg/kg 群の 1 例では、精母細胞および精子細胞の軽度の減少の他に、精巣上体に軽度の精子肉芽腫が認められた。対照群でも 2 例に精巣で精細管の軽度の萎縮が認められ、これら 2 例では精巣上体の管腔内に軽度の細胞残屑が認められ、そのうち 1 例で精巣上体管内精子の軽度の減少が認められた。

精巣の精上皮細胞数を計数した結果、Group 1 (ステージ I ~ VI) では 300 mg/kg 群で精子細胞 (round および elongate) の低値、1000 mg/kg 群で精母細胞および精子細胞 (round および elongate) の低値が認められ、Group 2 (ステージ VII ~ VIII) では 1000 mg/kg 群で精子細胞 (round) および精子細胞 (round) のセルトリ細胞比の低値が認められた。Group 3 (ステージ IX ~ XI) では 1000 mg/kg 群で精子細胞 (elongate) および精子細胞の (elongate) のセルトリ細胞比の低値が認められ、Group 4 (ステージ XII ~ XIV) では 1000 mg/kg 群で精母細胞、精子細胞 (elongate) および精子細胞 (elongate) のセルトリ細胞比の低値が認められた。雌では、黄体嚢胞が 300

mg/kg 群の 2 例に認められた。100 mg/kg 群の交尾不成立の 1 例、対照群および 100 mg/kg 群の各 1 例では、卵巣に異常は認められなかった。

2. 生殖発生毒性

(1) 生殖能検査 (Table 5)

いずれの群にも交尾成立までの日数、交尾率および受胎率に有意差は認められなかった。雌の性周期観察では、被験物質投与との関連を示唆する変化は認められなかった。なお、発情休止期の継続が投与期間に 100 mg/kg 群の 1 例で認められ、同例は交尾不成立であった。不妊例が対照群および 100 mg/kg 群で各 1 組に認められた。

(2) 分娩および母性行動 (Table 6)

いずれの群にも分娩および母性行動の観察項目に被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

(3) 新生児の生存率 (Table 6)

いずれの群にも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

(4) 新生児の一般状態

いずれの例にも被験物質投与との関連を示唆する症状は認められなかった。

(5) 新生児の体重推移 (Table 6)

300 mg/kg 群の雄で哺育 4 日体重および哺育 4 日までの体重増加量に低値が認められ、同群の雌でも哺育 1 および 4 日ならびに哺育 4 日までの体重増加量に低値が認められた。

しかし、100 および 1000 mg/kg 群では対照群と比較して有意差は認められなかった。

(6) 新生児の剖検

死亡例および哺育 4 日に屠殺した新生児の剖検では、被験物質投与との関連を示唆する所見は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性

雄では、精巣の病理組織学検査で 300 mg/kg 群の 2 例、1000 mg/kg 群の 12 例全例に精母細胞および精子細胞の減少が認められた。300 mg/kg 群および 1000 mg/kg 群では体重増加抑制および副生殖器の萎縮性変化は認められないことから、栄養障害あるいはホルモンのアンバランスによるものではなく、被験物質が直接、精母細胞に影響を及ぼした可能性が考えられた。一方、本スクリーニング試験と同じく 1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルの 100、300 および 1000 mg/kg/day を 28 日間経口反復投与した試験²⁾では精細胞に影響は認められていない。今回の試験で精巣上体に精子の減少が認められたのは 1000 mg/kg 群の 1 例のみであり、その他の例では精巣上体管内の精子数に異常はみられないことから、本スクリーニング試験において認められた精細胞への影響は 46 日間の投与期間の後期に発現したと考えられた。

精巣上体では1000 mg/kg群の1例で精子肉芽腫が認められたが、この所見は自然発生的にも認められ、被験物質投与によるものとは考えられなかった。

上記の他に、雌雄の一般状態、摂餌量、剖検所見および生殖器重量ならびに雌の卵巣の病理組織学所見に被験物質投与による影響は認められなかった。

以上のことから、本試験における1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルの反復投与による無影響量は、雄で100 mg/kg/day、雌で1000 mg/kg/dayであると判断された。

2. 生殖発生毒性

生殖能検査では交尾率および受胎率などに影響は認められず、300 mg/kg群および1000 mg/kg群の全例で交尾および妊娠が成立した。このことから、前述のように46日間の投与で精細胞の減少がみられるものの、本試験における交配前14日間の投与では妊娠の成立に影響を及ぼすものではなかったと考えられた。

なお、100 mg/kg群で認められた交尾不成立例1組では雌で頭頂骨の隆起がみられたが、生殖器に交尾不成立の原因を示唆する病理組織学所見は認められず、発情休止期の継続により交尾不成立となったと考えられ、より高用量の300および1000 mg/kg群で性周期に異常は認められず、全例で交尾が成立していることから、100 mg/kg群の交尾不成立例は被験物質投与との関連はないものと考えられた。

その他、雌の性周期に対して被験物質投与による影響は認められなかった。

新生児の観察では、300 mg/kg群で新生児の雌雄に体重の低値がみられたが、用量依存性は認められないことから、被験物質投与による影響とは考えられなかった。

他に、新生児の生存性、一般状態および剖検所見に被験物質投与による影響は認められなかった。

以上のことから、本スクリーニング試験における1,2,4-ベンゼントリカルボン酸トリス(2-エチルヘキシル)エステルの親世代の生殖に対する無影響量は雄で100 mg/kg/day、雌で1000 mg/kg/day、次世代の発生に対する無影響量は1000 mg/kg/dayであると判断された。

文献

- 1) H. Matsui *et al.*, *J. Toxicol. Pathol.*, **9**, 285(1996).
- 2) 井上博之ら, 化学物質毒性試験報告, **4**, 701(1996).

連絡先

試験責任者: 吉村浩幸

試験担当者: 茂野 均, 古川正敏, 河村公太郎,
武田みよ子, 引地のゆみ

(株)化合物安全性研究所

〒004-0839 北海道札幌市清田区真栄363番24号

Tel 011-885-5031 Fax 011-885-5313

Correspondence

Authors: Hiroyuki Yoshimura (Study director)

Hitoshi Shigeno, Masatoshi Furukawa,

Kohtarō Kawamura, Miyoko Takeda,

Noyumi Hikichi

Safety Research Institute for Chemical

Compounds Co., Ltd.

363-24 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo, Hokkaido,

004-0839, Japan

Tel +81-11-885-5031 Fax +81-11-885-5313