

2. 体重(Fig. 1)

全試験期間を通じて、いずれの投与群も対照群と同様の体重推移を示した。

3. 摂餌量

投与開始後3週に摂餌量の低値が500 mg/kg群の雌で認められた。回復期間には本変化は認められなかった。

4. 血液学検査(Table 1)

投与期間終了時の検査で、活性化部分トロンボプラスチン(APTT)時間の延長が500 mg/kg群の雄で認められた。回復期間終了時の検査では、本変化は認められなかった。

なお、回復期間終了時の検査で網状赤血球数の低値が100 mg/kg群の雄で認められたが、軽微な変動であることやその発現状況から被験物質に起因した変化ではないと判断した。

5. 血液生化学検査(Table 2)

投与期間終了時の検査で、血漿コリンエステラーゼの低値が500 mg/kg群の雌雄、血球コリンエステラーゼの低値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄で認められた。また、総コレステロールの高値が500 mg/kg群の雌、総タンパクの高値が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄、アルブミンの高値が100 および500 mg/kg群の雄で認められた。さらにGOTの低値が500 mg/kg群の雌、アルカリフォスファターゼの低値が100 および500 mg/kg群の雌で認められた。回復期間終了時の検査では、これらの変化のうち血漿コリンエステラーゼの低値が100 および500 mg/kg群の雌、血球コリンエステラーゼの低値が500 mg/kg群の雌雄で認められたが、いずれもその程度は軽減していた。

なお、回復期間終了時の検査で A/G 比と無機リンの高値が500 mg/kg群の雄で認められたが、いずれも軽微

な変動であることやその発現状況から被験物質に起因した変化ではないと判断した。

6. 尿検査

投与期間中の検査において、いずれの投与群にも異常は認められなかった。

7. 器官重量(Table 3)

投与期間終了時の検査で、肝臓の相対重量の高値が100 mg/kg群の雄、絶対重量と相対重量の高値が500 mg/kg群の雌雄で認められた。また、副腎の絶対重量と相対重量の高値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄で認められた。回復期間終了時の検査では、これらの変化のうち肝臓の相対重量の高値が500 mg/kg群の雌で認められたが、その程度は軽減していた。また、甲状腺の絶対重量および相対重量の高値が500 mg/kg群の雄で認められた。

8. 剖検所見(Table 4)

投与期間終了時の検査で、肝臓の褐色化が100 mg/kg群の雄4例、雌6例と500 mg/kg群の雄5例、雌6例に、腫大が500 mg/kg群の雌雄全例に認められた。回復期間終了時の検査では、上記変化のうち肝臓の腫大が500 mg/kg群の雌2例に認められた。なお、肝臓の腫大は100 mg/kg群の雄1例と4 mg/kg群の雌1例にも認められたが、いずれも遺伝性疾患である'Polycystic disease'に伴う変化であり、被験物質に起因した変化ではないと判断した。甲状腺の腫大が100 mg/kg群の雄1例と500 mg/kg群の雄3例、雌2例に認められた。回復期間終了時の検査では、本変化が500 mg/kg群の雌2例に認められた。副腎の腫大が100 mg/kg群の雌2例、雄1例と500 mg/kg群の雄5例、雌6例に認められた。腫大した副腎は全体に白色調を呈していた。回復期間終了時の検査では、本変化は認められなかった。

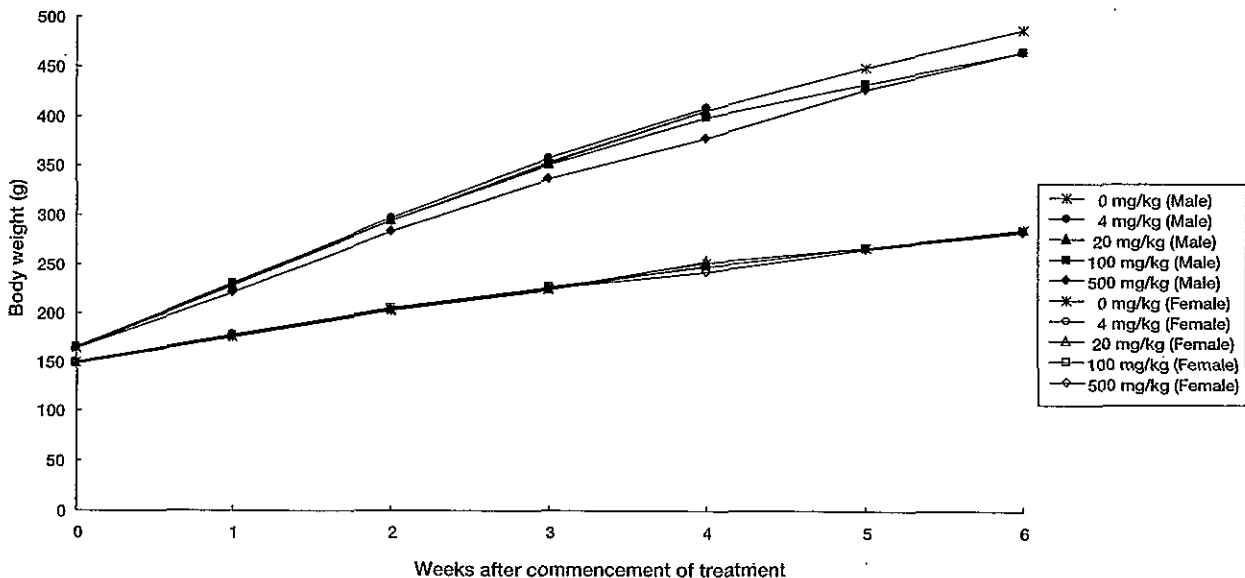


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

その他、被験物質投与群に種々の変化が認められたが、その発現状況からいずれも被験物質に起因した変化ではないと判断した。

9. 病理組織所見 (Table 5)

投与期間終了時解剖動物の検査で、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大が100 mg/kg群の雄2例、雌4例と500 mg/kg群の雌雄全例に認められた。肥大した肝細胞は好酸性を増し、くもり硝子様変化を呈した。雄では肥大した肝細胞内にオイルレッドO染色陰性の空胞が増加する例もみられた。回復期間終了時解剖動物の検査では、肝細胞肥大が100 mg/kg群の雌1例と500 mg/kg群の雌2例に認められたが、その程度は軽減していた。腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の増加が500 mg/kg群の雄4例で認められ、そのうち1例では近位尿細管上皮内の好酸性小体の出現も伴っていた。回復期間終了時解剖動物の検査では、近位尿細管上皮内の硝子滴の程度の増強が500 mg/kg群の雄2例、近位尿細管上皮内の好酸性小体が500 mg/kg群の雄4例、程度の強い好塩基性尿細管が500 mg/kg群の雄1例で認められた。甲状腺のろ胞上皮細胞の肥大が100 mg/kg群の雌雄各2例と500 mg/kg群の雄6例、雌5例に認められた。回復期間終了時解剖動物の検査でも、ろ胞上皮細胞の肥大が100 mg/kg群の雄2例と500 mg/kg群の雄3例、雌1例に認められた。副腎の束状帯の脂肪滴の増加が500 mg/kg群の雌雄全例に認められた。雄では大小様々な脂肪滴、雌では小型で均一な脂肪滴が出現していた。回復期間終了時解剖動物の検査では、本変化は認められなかった。

その他、被験物質投与群で種々の変化が認められたが、その発現状況からいずれも被験物質に起因した変化ではないと判断した。

考察

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルを0, 4, 20, 100, 500 mg/kgの用量でSD系ラットの雌雄に28日間反復経口投与し、その毒性を検討した。

一般症状として、投与前後の流涎が100および500 mg/kg群の雌雄で認められた。しかし、投与後の流涎は投与直後に発現する一過性の変化であり、投与前の流涎は動物の体に触れることによって発現する条件反射的な変化であることや、これらの変化は投与を止めることにより発現しないことから、被験物質の味等に起因した変化であり、毒性学的意義はないと判断した。従って、流涎は無影響量の評価の対象からは除外した。

体重に変化はみられなかったが、摂餌量の低値が500 mg/kg群の雌で認められた。本変化は投与を止めることにより回復した。

血液学検査で、活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が500 mg/kg群の雄で認められた。しかし、軽微な変化であることやプロトロンビン時間に異常がないことや肝傷害性の変化がないことなどから本変化の毒性学的意義は低いと思われる。本変化は投与を止めることによ

り回復した。

血液生化学検査で、血漿あるいは血球コリンエステラーゼの低値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄で認められた。被験物質はコリンエステラーゼ活性の阻害作用を有することが知られている有機リン化合物の一種であることから、同様のコリンエステラーゼ活性の阻害が惹起されたものと思われる。また、総コレステロール、総蛋白あるいはアルブミンの高値が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄で認められたが、これらの変化はコリンエステラーゼ活性阻害に伴い代償性に肝臓でのタンパク質や脂質の合成が亢進した結果生じたものと思われる。回復期間終了時には、上記変化のうち血漿あるいは血球コリンエステラーゼの低値が100および500 mg/kg群で認められたが、その程度は明らかに軽減していた。なお、投与期間終了時にGOTの低値が500 mg/kg群の雌、アルカリフォスファターゼの低値が100および500 mg/kg群の雌で認められたが、一般的に問題となる値の上昇ではなく、減少であることから毒性学的には意義の乏しい変化と思われる。

病理学検査では、肝臓の絶対重量あるいは相対重量の増加が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄、褐色化が100および500 mg/kg群の雌雄、小葉中心性の肝細胞肥大が500 mg/kg群の雌雄で認められた。小葉中心性の肝細胞肥大はくもり硝子様変化を特徴としており、これらの肝肥大性の変化は薬物代謝酵素誘導によるものと思われる。腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の増強が500 mg/kg群の雄で認められた。近位尿細管上皮の硝子滴は α_{2u} グロブリンを含む蛋白の再吸収像であり、正常な成熟ラットでしばしばみられる変化である。そして、種々の化学物質投与により硝子滴の増数の特徴とした α_{2u} グロブリン腎症が雄ラットに特異的に発現することが知られている²³⁾。被験物質投与により同様の α_{2u} グロブリン腎症が惹起されたものと思われる。また、近位尿細管上皮の好酸性小体あるいは好塩基性尿細管は硝子滴の過剰な蓄積に伴う変化と思われる。甲状腺の腫大が100 mg/kg群の雄と500 mg/kg群の雌雄、ろ胞上皮細胞の肥大が100および500 mg/kg群の雌雄で認められた。薬物代謝酵素誘導を起こす化学物質は、肝臓での甲状腺ホルモン代謝を促進し、二次的に視床下部-下垂体系を介して甲状腺ろ胞上皮細胞の肥大を惹起することが知られている⁴⁵⁾。前述のように本試験でも薬物代謝酵素誘導の発現を示唆する肝肥大が認められることから、同様の機序でろ胞上皮細胞の肥大が生じた可能性が考えられる。一方、被験物質の甲状腺への直接作用の可能性も考えられるが、本試験の結果のみからは明らかにはできなかった。副腎の絶対重量および相対重量の高値が100 mg/kg群の雌と500 mg/kg群の雌雄、腫大が100および500 mg/kg群の雌雄、束状帯の脂肪滴の増加が500 mg/kg群の雌雄で認められた。束状帯の脂肪滴の増加は、ステロイド合成阻害によって発現する脂質増生(lipid hyperplasia)の組織像と類似していた⁴⁶⁾。回復期間終了後解剖動物では、これらの変化は回復あるいは軽減していた。

なお、被験物質は有機リン化合物であり、ネコおよびサルに運動神経麻痺と脊髄の脱髄を起こすことが知られているトリフェニルフォスフェートが不純物として含まれている^{7,8)}。しかし、本試験では神経症状や中枢神経系の病理組織変化は認められなかった。

これらの試験結果から、本試験条件下におけるリン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの無影響量は雌雄いずれも20 mg/kg/dayと結論した。

文献

- 1) 化学工業日報社編, "12093 の化学商品," 化学工業日報社, 東京, 1993, pp. 911-914.
- 2) C.L. Alden, C.H. Frith, "Handbook of Toxicologic Pathology," eds. by W. M. Haschek, C.G. Rousseaux, Academic Press, San Diego, 1991, pp.340-342.
- 3) P. Greaves, "Histopathology of Preclinical Toxicity Studies," ed. by P. Greaves, Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp.532-538.
- 4) C.C. Capen, R.A. DeLellis, and J.T. Yarrington, "Handbook of Toxicologic Pathology," eds. by W.M. Haschek, C.G. Rousseaux, Academic Press, San Diego, 1991, pp.723-725.
- 5) G.O. Lumb and J.H. Rust, *Toxicol. Pathol.* 13, 315 (1985).
- 6) F. Zak, "Endocrine System. Monographs on Pathology of Laboratory Animals," eds. by T.C. Jones, U. Mohr, R.D. Hunt, Springer-Verlag, Berlin, 1983, pp.80-84.
- 7) W.L. Sutton, C.J. Terhaar, F.A. Miller, R.F. Scherberger, E.C. Riley, R.L. Roudabush and D.W. Fassett, *Arch. Environmental Health*, 1, 33(1960).
- 8) D. Tanaka, S.J. Bursian, E.J. Lehning and R.J. Aulerich, *Brain Research*, 531, 294(1990).

連絡先

試験責任者：須藤雅人
 試験担当者：清水優子, 土谷 稔, 勝田 修,
 豊田直人, 高野克代
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 〒314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Masato Sudo (Study director)
 Yuko Shimizu, Minoru Tsuchitani,
 Osamu Katsuta, Naoto Toyota,
 Katsuyo Takano
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Table 1 Hematology of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Dose level (mg/kg)	28 Day				
		0	4	20	100	500
Male						
Number of animals		6	6	6	6	6
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)		697 \pm 18.1	691 \pm 15.7	711 \pm 36.0	706 \pm 19.9	698 \pm 23.7
Hematocrit (%)		42.3 \pm 1.16	41.9 \pm 0.76	42.6 \pm 1.67	42.3 \pm 0.99	42.4 \pm 1.42
Hemoglobin (g/dl)		14.6 \pm 0.39	14.3 \pm 0.40	14.8 \pm 0.31	14.6 \pm 0.33	14.6 \pm 0.46
Reticulocyte (%)		34 \pm 1.9	36 \pm 3.9	34 \pm 3.9	35 \pm 4.0	34 \pm 4.9
MCV (μm^3)		60.6 \pm 1.77	60.6 \pm 0.92	59.9 \pm 1.46	59.9 \pm 0.79	60.7 \pm 0.85
MCH (pg)		20.9 \pm 0.57	20.7 \pm 0.38	20.8 \pm 0.90	20.6 \pm 0.28	20.9 \pm 0.32
MCHC (%)		34.5 \pm 0.13	34.2 \pm 0.51	34.6 \pm 1.07	34.4 \pm 0.42	34.4 \pm 0.30
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{l}$)		100.8 \pm 9.32	104.8 \pm 16.55	105.2 \pm 4.48	103.1 \pm 9.80	115.3 \pm 17.63
PT (sec)		13.1 \pm 0.28	13.5 \pm 0.50	13.3 \pm 0.44	12.8 \pm 0.45	13.9 \pm 0.87
APTT (sec)		16.5 \pm 1.34	16.1 \pm 1.72	14.9 \pm 2.42	16.7 \pm 0.88	20.8 \pm 2.18**
WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)		98 \pm 31.9	119 \pm 23.2	122 \pm 30.4	118 \pm 23.3	106 \pm 15.8
Differential leukocyte counts (%)						
Lymphocytes		89 \pm 2.5	92 \pm 5.3	91 \pm 2.1	88 \pm 4.6	89 \pm 3.6
Neutrophils						
segmented		8 \pm 1.9	4 \pm 2.3	4 \pm 1.1	8 \pm 3.9	8 \pm 3.3
band		0 \pm 0.8	0 \pm 0.0	0 \pm 0.4	0 \pm 0.4	0 \pm 0.4
Eosinophils		1 \pm 0.8	1 \pm 1.1	1 \pm 0.8	1 \pm 1.5	0 \pm 0.5
Basophils		0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
Monocytes		2 \pm 1.5	3 \pm 3.0	4 \pm 1.4	3 \pm 1.5	3 \pm 1.6
Female						
Number of animals		6	6	6	6	6
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)		691 \pm 22.5	700 \pm 30.9	685 \pm 27.9	709 \pm 11.1	696 \pm 35.8
Hematocrit (%)		41.2 \pm 0.95	40.7 \pm 2.18	40.6 \pm 1.50	41.9 \pm 0.86	41.0 \pm 1.73
Hemoglobin (g/dl)		14.3 \pm 0.34	14.3 \pm 0.89	14.2 \pm 0.44	14.7 \pm 0.44	14.2 \pm 0.50
Reticulocyte (%)		30 \pm 5.5	23 \pm 3.0	26 \pm 3.1	24 \pm 5.2	27 \pm 6.1
MCV (μm^3)		59.6 \pm 1.78	58.1 \pm 2.36	59.3 \pm 1.84	59.0 \pm 0.87	58.9 \pm 0.80
MCH (pg)		20.7 \pm 0.58	20.3 \pm 1.00	20.8 \pm 0.52	20.8 \pm 0.39	20.4 \pm 0.49
MCHC (%)		34.7 \pm 0.34	35.0 \pm 0.62	35.1 \pm 0.54	35.2 \pm 0.59	34.7 \pm 0.61
Platelet ($\times 10^4/\mu\text{l}$)		91.8 \pm 11.07	85.6 \pm 9.78	82.6 \pm 3.45	90.1 \pm 6.08	95.9 \pm 17.13
PT (sec)		14.1 \pm 0.39	15.0 \pm 0.85	14.2 \pm 0.46	13.3 \pm 0.60	13.1 \pm 1.25
APTT (sec)		16.6 \pm 1.34	17.7 \pm 2.38	15.9 \pm 1.32	15.7 \pm 1.96	17.5 \pm 2.54
WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)		77 \pm 17.3	80 \pm 33.8	68 \pm 23.5	83 \pm 37.6	100 \pm 22.3
Differential leukocyte counts (%)						
Lymphocytes		90 \pm 2.7	80 \pm 18.4	89 \pm 4.2	90 \pm 4.8	94 \pm 2.5
Neutrophils						
segmented		7 \pm 2.1	13 \pm 14.5	7 \pm 3.9	8 \pm 3.7	5 \pm 1.8
band		0 \pm 0.0	0 \pm 0.5	0 \pm 0.0	0 \pm 0.5	0 \pm 0.0
Eosinophils		1 \pm 0.4	1 \pm 0.8	1 \pm 0.5	0 \pm 0.4	1 \pm 0.8
Basophils		0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
Monocytes		2 \pm 1.2	6 \pm 8.6	3 \pm 0.8	2 \pm 1.9	2 \pm 1.4

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, **, $p < 0.01$.

Table 1 (continued)

Sex	Period Dose level (mg/kg)	Recovery		
		0	100	500
Male				
	Number of animals	6	6	6
	RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	786 \pm 30.3	781 \pm 26.8	783 \pm 32.2
	Hematocrit (%)	43.2 \pm 1.28	43.5 \pm 1.04	43.9 \pm 1.22
	Hemoglobin (g/dl)	15.1 \pm 0.38	15.1 \pm 0.28	15.1 \pm 0.42
	Reticulocyte (%)	29 \pm 1.8	25 \pm 2.4**	31 \pm 2.4
	MCV (μm^3)	55.1 \pm 1.50	55.7 \pm 1.12	56.1 \pm 1.45
	MCH (pg)	19.2 \pm 0.59	19.3 \pm 0.42	19.3 \pm 0.46
	MCHC (%)	34.9 \pm 0.33	34.7 \pm 0.35	34.4 \pm 0.40
	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	103.1 \pm 13.98	99.2 \pm 5.92	97.4 \pm 10.34
	PT (sec)	14.1 \pm 0.65	14.0 \pm 0.39	13.5 \pm 0.46
	APTT (sec)	18.0 \pm 1.54	18.8 \pm 1.34	16.8 \pm 1.99
	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	109 \pm 22.9	109 \pm 32.3	131 \pm 36.3
	Differential leukocyte counts (%)			
	Lymphocytes	86 \pm 3.6	83 \pm 4.5	87 \pm 4.4
	Neutrophils			
	segmented	10 \pm 3.5	13 \pm 4.1	10 \pm 3.3
	band	0 \pm 0.5	0 \pm 0.0	0 \pm 0.4
	Eosinophils	1 \pm 0.5	1 \pm 0.5	1 \pm 0.8
	Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	Monocytes	4 \pm 1.4	4 \pm 1.4	2 \pm 1.9
Female				
	Number of animals	6	6	6
	RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	721 \pm 41.5	739 \pm 27.8	741 \pm 20.5
	Hematocrit (%)	41.8 \pm 1.72	41.4 \pm 1.32	42.2 \pm 1.03
	Hemoglobin (g/dl)	14.6 \pm 0.60	14.5 \pm 0.55	14.7 \pm 0.14
	Reticulocyte (%)	29 \pm 4.2	26 \pm 3.8	29 \pm 4.0
	MCV (μm^3)	58.0 \pm 2.02	56.0 \pm 1.63	56.9 \pm 0.90
	MCH (pg)	20.3 \pm 0.77	19.6 \pm 0.77	19.9 \pm 0.49
	MCHC (%)	35.0 \pm 0.38	34.9 \pm 0.43	34.9 \pm 0.72
	Platelet ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	89.4 \pm 7.95	94.8 \pm 6.88	92.1 \pm 3.02
	PT (sec)	13.7 \pm 0.23	13.6 \pm 0.51	13.5 \pm 0.22
	APTT (sec)	16.5 \pm 1.31	16.3 \pm 1.86	16.8 \pm 1.31
	WBC ($\times 10^2/\text{mm}^3$)	61 \pm 24.2	66 \pm 12.3	76 \pm 26.7
	Differential leukocyte counts (%)			
	Lymphocytes	84 \pm 5.5	87 \pm 4.5	84 \pm 5.2
	Neutrophils			
	segmented	12 \pm 5.0	10 \pm 3.0	12 \pm 6.0
	band	1 \pm 0.5	0 \pm 0.4	0 \pm 0.8
	Eosinophils	1 \pm 1.0	1 \pm 0.9	1 \pm 1.0
	Basophils	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
	Monocytes	2 \pm 1.5	2 \pm 1.4	2 \pm 1.5

Values are expressed as Mean \pm S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, ** ; $p < 0.01$.

Table 2 Blood chemical examination of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period Dose level (mg/kg)	28 Day				
		0	4	20	100	500
Male						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Choline esterase brain ¹⁾	6.2 ± 1.54	7.2 ± 1.80	7.4 ± 1.41	7.2 ± 0.82	6.8 ± 0.51
	Choline esterase plasma (IU/ml)	0.40 ± 0.092	0.36 ± 0.037	0.40 ± 0.081	0.33 ± 0.056	0.24 ± 0.030**
	Choline esterase RBC (IU/ml)	1.62 ± 0.114	1.47 ± 0.096	1.53 ± 0.148	1.56 ± 0.128	1.05 ± 0.099**
	GOT (IU/l)	55 ± 4.9	55 ± 5.5	50 ± 5.0	50 ± 8.4	50 ± 5.3
	GPT (IU/l)	32 ± 3.1	33 ± 4.8	32 ± 5.2	32 ± 3.3	40 ± 9.1
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.0	1 ± 0.5	0 ± 0.8	1 ± 1.2	4 ± 1.5
	ALP (IU/l)	631 ± 192.5	634 ± 166.4	507 ± 73.6	514 ± 52.0	501 ± 66.4
	Urea nitrogen (mg/dl)	19.2 ± 2.41	18.8 ± 1.46	18.7 ± 1.76	17.9 ± 2.65	20.7 ± 4.13
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.04
	Glucose (mg/dl)	165 ± 5.6	166 ± 11.7	166 ± 13.1	161 ± 13.7	154 ± 8.7
	Total chol. (mg/dl)	69 ± 4.8	78 ± 14.8	75 ± 12.7	83 ± 7.4	80 ± 10.8
	Triglyceride (mg/dl)	113 ± 32.7	157 ± 53.2	127 ± 46.0	147 ± 67.6	76 ± 23.2
	Total protein (g/dl)	6.60 ± 0.259	6.75 ± 0.244	6.76 ± 0.294	7.03 ± 0.091*	7.19 ± 0.197**
	Albumin (g/dl)	3.53 ± 0.106	3.58 ± 0.092	3.57 ± 0.130	3.69 ± 0.048*	3.79 ± 0.104**
	A/G ratio	1.15 ± 0.036	1.13 ± 0.047	1.12 ± 0.053	1.11 ± 0.048	1.12 ± 0.034
	Calcium (mg/dl)	10.1 ± 0.22	10.1 ± 0.23	10.3 ± 0.29	10.2 ± 0.31	10.3 ± 0.29
	Inorganic phos. (mg/dl)	8.3 ± 0.39	8.3 ± 0.39	8.7 ± 0.46	8.2 ± 0.46	8.2 ± 0.38
	Na (mEq/l)	142 ± 1.3	141 ± 1.3	142 ± 1.0	142 ± 0.5	142 ± 0.5
	K (mEq/l)	3.8 ± 0.15	3.8 ± 0.29	4.0 ± 0.12	4.0 ± 0.14	3.8 ± 0.11
	Cl (mEq/l)	101 ± 1.1	99 ± 0.8	100 ± 0.8	100 ± 0.8	100 ± 1.2
Female						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Choline esterase brain ¹⁾	7.9 ± 0.82	7.6 ± 0.76	7.3 ± 1.18	7.3 ± 0.95	7.0 ± 0.61
	Choline esterase plasma (IU/ml)	1.02 ± 0.211	1.29 ± 0.519	1.06 ± 0.397	0.77 ± 0.210	0.39 ± 0.095**
	Choline esterase RBC (IU/ml)	1.44 ± 0.168	1.41 ± 0.093	1.39 ± 0.106	1.26 ± 0.084*	0.90 ± 0.115**
	GOT (IU/l)	51 ± 3.1	55 ± 14.0	50 ± 4.8	45 ± 4.4	40 ± 3.9**
	GPT (IU/l)	28 ± 8.7	30 ± 8.2	31 ± 7.0	24 ± 4.9	25 ± 3.7
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.4	0 ± 0.4	0 ± 0.0	1 ± 0.5	3 ± 1.0
	ALP (IU/l)	480 ± 121.7	390 ± 77.3	385 ± 44.4	339 ± 59.2*	286 ± 51.8**
	Urea nitrogen (mg/dl)	24.3 ± 5.00	20.4 ± 2.76	20.1 ± 2.77	20.2 ± 3.06	27.9 ± 8.32
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.04	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.05
	Glucose (mg/dl)	176 ± 24.6	163 ± 10.4	175 ± 20.5	169 ± 17.6	154 ± 6.6
	Total chol. (mg/dl)	80 ± 14.4	76 ± 21.4	76 ± 11.6	96 ± 17.6	105 ± 17.5*
	Triglyceride (mg/dl)	74 ± 70.2	50 ± 19.7	68 ± 41.3	52 ± 33.1	50 ± 38.9
	Total protein (g/dl)	6.83 ± 0.204	6.96 ± 0.449	6.78 ± 0.300	7.17 ± 0.275	7.48 ± 0.436*
	Albumin (g/dl)	3.71 ± 0.129	3.65 ± 0.183	3.71 ± 0.098	3.90 ± 0.147	3.89 ± 0.156
	A/G ratio	1.20 ± 0.044	1.13 ± 0.163	1.21 ± 0.088	1.20 ± 0.030	1.09 ± 0.071
	Calcium (mg/dl)	9.8 ± 0.24	9.9 ± 0.46	9.8 ± 0.19	9.9 ± 0.41	10.2 ± 0.37
	Inorganic phos. (mg/dl)	7.8 ± 0.59	7.2 ± 0.71	7.7 ± 0.81	7.3 ± 1.10	7.0 ± 0.39
	Na (mEq/l)	142 ± 0.8	142 ± 0.5	141 ± 1.0	142 ± 2.0	141 ± 0.8
	K (mEq/l)	4.0 ± 0.55	3.8 ± 0.61	3.8 ± 0.29	4.2 ± 1.20	4.0 ± 0.42
	Cl (mEq/l)	101 ± 0.8	102 ± 1.0	102 ± 1.2	101 ± 1.7	101 ± 1.2

Values are expressed as Mean ± S.D. 1), IU/g wet tissue.

Significantly different from 0 mg/kg group, *; P < 0.05, **; P < 0.01.

Table 2 (Continued)

Sex	Period	Recovery		
	Dose level (mg/kg)	0	100	500
Male				
	Number of animals	6	6	6
	Choline esterase brain ¹⁾	7.3 ± 1.08	7.5 ± 0.67	7.2 ± 0.64
	Choline esterase plasma (IU/ml)	0.30 ± 0.026	0.39 ± 0.081	0.32 ± 0.075
	Choline esterase RBC (IU/ml)	1.56 ± 0.105	1.51 ± 0.132	1.36 ± 0.098*
	GOT (IU/l)	60 ± 9.2	57 ± 4.5	59 ± 7.6
	GPT (IU/l)	35 ± 4.9	31 ± 3.9	37 ± 6.8
	γ-GTP (IU/l)	0 ± 0.4	0 ± 0.0	0 ± 0.4
	ALP (IU/l)	516 ± 162.4	432 ± 118.5	445 ± 53.9
	Urea nitrogen (mg/dl)	19.2 ± 4.02	18.8 ± 0.96	20.3 ± 2.83
	Creatinine (mg/dl)	0.4 ± 0.05	0.4 ± 0.05	0.4 ± 0.04
	Glucose (mg/dl)	166 ± 6.2	162 ± 4.8	164 ± 4.5
	Total chol. (mg/dl)	82 ± 15.2	69 ± 9.6	72 ± 19.9
	Triglyceride (mg/dl)	189 ± 76.0	164 ± 44.2	165 ± 107.3
	Total protein (g/dl)	6.96 ± 0.201	6.96 ± 0.367	7.05 ± 0.495
	Albumin (g/dl)	3.70 ± 0.119	3.65 ± 0.133	3.85 ± 0.209
	A/G ratio	1.13 ± 0.031	1.10 ± 0.045	1.21 ± 0.059*
	Calcium (mg/dl)	10.1 ± 0.21	10.1 ± 0.19	10.3 ± 0.41
	Inorganic phos. (mg/dl)	7.9 ± 0.29	8.1 ± 0.26	8.5 ± 0.34**
	Na (mEq/l)	142 ± 1.0	142 ± 0.5	142 ± 1.0
	K (mEq/l)	3.7 ± 0.12	3.6 ± 0.17	3.8 ± 0.15
	Cl (mEq/l)	100 ± 1.4	100 ± 1.6	99 ± 3.0
Female				
	Number of animals	6	6	6
	Choline esterase brain ¹⁾	7.5 ± 0.68	8.0 ± 0.76	7.5 ± 0.35
	Choline esterase plasma (IU/ml)	1.25 ± 0.220	1.02 ± 0.149*	0.84 ± 0.074**
	Choline esterase RBC (IU/ml)	1.26 ± 0.118	1.31 ± 0.083	1.08 ± 0.089*
	GOT (IU/l)	55 ± 11.3	49 ± 4.1	46 ± 3.7
	GPT (IU/l)	35 ± 7.7	33 ± 8.4	33 ± 6.2
	γ-GTP (IU/l)	1 ± 0.8	1 ± 0.8	1 ± 1.2
	ALP (IU/l)	373 ± 127.9	385 ± 108.3	356 ± 116.1
	Urea nitrogen (mg/dl)	20.8 ± 3.90	20.3 ± 2.30	24.8 ± 4.01
	Creatinine (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.04
	Glucose (mg/dl)	167 ± 10.1	162 ± 8.5	167 ± 10.3
	Total chol. (mg/dl)	77 ± 13.7	78 ± 10.1	84 ± 7.0
	Triglyceride (mg/dl)	79 ± 24.0	99 ± 22.4	97 ± 37.0
	Total protein (g/dl)	6.91 ± 0.200	7.02 ± 0.245	7.14 ± 0.330
	Albumin (g/dl)	3.87 ± 0.055	3.93 ± 0.064	3.96 ± 0.184
	A/G ratio	1.28 ± 0.071	1.28 ± 0.094	1.24 ± 0.037
	Calcium (mg/dl)	9.5 ± 0.32	9.5 ± 0.20	9.5 ± 0.21
	Inorganic phos. (mg/dl)	4.4 ± 0.88	5.2 ± 0.70	5.1 ± 0.55
	Na (mEq/l)	141 ± 0.0	141 ± 0.8	140 ± 0.8
	K (mEq/l)	3.4 ± 0.18	3.3 ± 0.22	3.5 ± 0.14
	Cl (mEq/l)	103 ± 1.0	102 ± 1.2	102 ± 1.2

Values are expressed as Mean ± S.D. 1), IU/g wet tissue.

Significantly different from 0 mg/kg group, *; P<0.05, **; P<0.01.

Table 3 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period Dose level (mg/kg)	28 Day				
		0	4	20	100	500
Male						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Final body weight	407 ± 10.6	408 ± 29.8	406 ± 24.0	405 ± 43.7	372 ± 32.7
	Absolute organ weight					
	Brain (g)	2.05 ± 0.031	1.99 ± 0.042	2.02 ± 0.047	2.06 ± 0.073	2.00 ± 0.037
	Thyroids (mg)	26.0 ± 4.10	26.0 ± 2.53	22.7 ± 3.08	25.8 ± 4.79	28.2 ± 5.04
	Thymus (mg)	732 ± 42.4	671 ± 47.9	696 ± 89.7	658 ± 110.9	681 ± 139.8
	Liver (g)	16.29 ± 1.104	16.61 ± 0.707	16.52 ± 0.832	18.94 ± 2.014	20.80 ± 2.809**
	Kidneys (g)	2.79 ± 0.294	2.79 ± 0.141	2.72 ± 0.187	3.37 ± 0.922	2.78 ± 0.164
	Adrenals (mg)	53.9 ± 5.03	56.1 ± 9.71	59.7 ± 2.98	56.4 ± 5.84	71.4 ± 12.93*
	Spleen (g)	0.76 ± 0.042	0.88 ± 0.103	0.78 ± 0.085	0.90 ± 0.153	0.74 ± 0.070
	Testes (g)	3.04 ± 0.166	2.97 ± 0.187	3.12 ± 0.232	3.08 ± 0.202	3.02 ± 0.202
	Relative organ weight					
	Brain	0.50 ± 0.014	0.49 ± 0.032	0.50 ± 0.033	0.51 ± 0.049	0.54 ± 0.044
	Thyroids (×10 ⁻³)	6.4 ± 1.08	6.4 ± 0.88	5.6 ± 0.79	6.4 ± 1.17	7.7 ± 1.49
	Thymus (×10 ⁻³)	180 ± 11.5	165 ± 17.3	172 ± 26.5	163 ± 20.0	184 ± 40.4
	Liver	4.00 ± 0.216	4.09 ± 0.291	4.08 ± 0.277	4.68 ± 0.315**	5.58 ± 0.300**
	Kidneys	0.69 ± 0.073	0.69 ± 0.035	0.67 ± 0.038	0.84 ± 0.248	0.75 ± 0.068
	Adrenals (×10 ⁻³)	13.2 ± 1.21	13.7 ± 1.77	14.7 ± 0.99	14.0 ± 1.25	19.3 ± 3.84**
	Spleen	0.19 ± 0.014	0.22 ± 0.020	0.19 ± 0.017	0.22 ± 0.044	0.20 ± 0.024
	Testes	0.75 ± 0.051	0.73 ± 0.028	0.77 ± 0.067	0.77 ± 0.086	0.82 ± 0.058
Female						
	Number of animals	6	6	6	6	6
	Final body weight	254 ± 19.3	249 ± 13.1	252 ± 23.0	242 ± 22.4	242 ± 6.1
	Absolute organ weight					
	Brain (g)	1.88 ± 0.063	1.88 ± 0.040	1.94 ± 0.059	1.88 ± 0.087	1.87 ± 0.055
	Thyroids (mg)	22.2 ± 0.75	19.5 ± 2.35	20.8 ± 1.17	21.5 ± 1.52	24.7 ± 3.14
	Thymus (mg)	492 ± 83.6	516 ± 83.4	543 ± 82.5	558 ± 177.5	548 ± 38.2
	Liver (g)	10.09 ± 0.962	10.32 ± 2.573	9.77 ± 1.397	10.54 ± 1.593	13.94 ± 0.725**
	Kidneys (g)	1.87 ± 0.147	2.20 ± 0.872	1.87 ± 0.131	1.84 ± 0.159	1.96 ± 0.179
	Adrenals (mg)	65.7 ± 10.72	72.9 ± 4.46	69.7 ± 10.14	80.7 ± 11.43*	95.3 ± 7.11**
	Spleen (g)	0.58 ± 0.096	0.64 ± 0.173	0.55 ± 0.077	0.52 ± 0.106	0.52 ± 0.068
	Ovaries (mg)	101.0 ± 21.93	101.8 ± 15.43	95.6 ± 14.11	94.5 ± 15.27	115.9 ± 15.91
	Relative organ weight					
	Brain	0.74 ± 0.052	0.75 ± 0.031	0.78 ± 0.062	0.78 ± 0.061	0.77 ± 0.017
	Thyroids (×10 ⁻³)	8.8 ± 0.88	7.8 ± 1.02	8.3 ± 0.95	9.0 ± 1.10	10.2 ± 1.36
	Thymus (×10 ⁻³)	193 ± 20.7	206 ± 25.5	215 ± 18.0	227 ± 55.8	226 ± 15.2
	Liver	3.97 ± 0.228	4.13 ± 0.989	3.87 ± 0.314	4.33 ± 0.285	5.76 ± 0.288*
	Kidneys	0.74 ± 0.104	0.88 ± 0.335	0.75 ± 0.062	0.77 ± 0.069	0.81 ± 0.088
	Adrenals (×10 ⁻³)	26.2 ± 5.79	29.3 ± 2.23	28.0 ± 5.57	33.5 ± 5.35*	39.3 ± 2.17**
	Spleen	0.23 ± 0.022	0.26 ± 0.069	0.22 ± 0.025	0.22 ± 0.029	0.22 ± 0.028
	Ovaries (×10 ⁻³)	40.5 ± 11.50	40.7 ± 4.88	37.9 ± 3.53	39.3 ± 7.05	47.8 ± 6.29

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 3 (Continued)

Sex	Period Dose level (mg/kg)	Recovery		
		0	100	500
Male				
	Number of animals	6	6	6
	Final body weight	485 ± 35.1	464 ± 20.7	463 ± 17.7
	Absolute organ weight			
	Brain (g)	2.08 ± 0.093	2.06 ± 0.079	2.03 ± 0.068
	Thyroids (mg)	24.0 ± 1.67	26.3 ± 4.23	30.3 ± 2.16**
	Thymus (mg)	643 ± 83.8	571 ± 64.7	552 ± 52.0
	Liver (g)	18.89 ± 2.317	17.25 ± 1.870	18.81 ± 1.796
	Kidneys (g)	3.20 ± 0.326	3.09 ± 0.360	3.31 ± 0.337
	Adrenals (mg)	59.5 ± 4.58	58.0 ± 7.04	57.8 ± 7.37
	Spleen (g)	0.81 ± 0.196	0.79 ± 0.094	0.89 ± 0.107
	Testes (g)	3.25 ± 0.196	3.21 ± 0.136	3.35 ± 0.290
	Relative organ weight			
	Brain	0.43 ± 0.023	0.44 ± 0.031	0.44 ± 0.010
	Thyroids (×10 ⁻³)	4.9 ± 0.48	5.7 ± 0.72	6.6 ± 0.45**
	Thymus (×10 ⁻³)	133 ± 16.2	123 ± 13.0	120 ± 13.8
	Liver	3.88 ± 0.250	3.71 ± 0.266	4.06 ± 0.320
	Kidneys	0.66 ± 0.055	0.67 ± 0.050	0.71 ± 0.055
	Adrenals (×10 ⁻³)	12.3 ± 1.00	12.5 ± 1.25	12.5 ± 1.45
	Spleen	0.16 ± 0.032	0.17 ± 0.015	0.19 ± 0.025
	Testes	0.67 ± 0.026	0.69 ± 0.045	0.73 ± 0.063
Female				
	Number of animals	6	6	6
	Final body weight	284 ± 16.8	284 ± 28.3	282 ± 22.3
	Absolute organ weight			
	Brain (g)	1.96 ± 0.080	1.87 ± 0.055	1.91 ± 0.043
	Thyroids (mg)	18.5 ± 2.43	20.3 ± 2.66	21.7 ± 3.44
	Thymus (mg)	507 ± 95.2	430 ± 91.8	540 ± 93.9
	Liver (g)	10.40 ± 0.885	10.82 ± 1.003	11.75 ± 1.170
	Kidneys (g)	1.86 ± 0.163	1.86 ± 0.202	1.90 ± 0.194
	Adrenals (mg)	73.4 ± 10.94	66.5 ± 8.21	68.2 ± 11.04
	Spleen (g)	0.58 ± 0.102	0.61 ± 0.098	0.62 ± 0.065
	Ovaries (mg)	108.2 ± 9.30	102.0 ± 13.88	104.2 ± 12.53
	Relative organ weight			
	Brain	0.69 ± 0.048	0.66 ± 0.074	0.68 ± 0.057
	Thyroids (×10 ⁻³)	6.5 ± 0.80	7.2 ± 0.61	7.7 ± 1.33
	Thymus (×10 ⁻³)	179 ± 34.9	152 ± 27.4	191 ± 28.0
	Liver	3.65 ± 0.142	3.82 ± 0.220	4.16 ± 0.121**
	Kidneys	0.65 ± 0.040	0.66 ± 0.045	0.68 ± 0.083
	Adrenals (×10 ⁻³)	25.8 ± 3.65	23.5 ± 1.93	24.4 ± 4.90
	Spleen	0.20 ± 0.032	0.22 ± 0.025	0.22 ± 0.019
	Ovaries (×10 ⁻³)	38.0 ± 2.30	36.0 ± 3.49	37.2 ± 5.83

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group, *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 4 Summary of gross findings of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period	28day					Recovery			
		Dose level (mg/kg)		0	4	20	100	500	0	100
Male	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Spleen										
Nodule		0	0	0	0	0	0	0	0	1
Liver										
Brownish		0	0	0	4	5	0	0	0	0
Enlargement		0	0	0	1	6	0	0	0	0
Granular, surface		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Kidney										
Cyst, multiple		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Testis										
Small		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Thyroid										
Enlargement		0	0	0	1	3	0	0	0	0
Adrenal										
Enlargement		0	0	0	2	5	0	0	0	0
Female	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Liver										
Brownish		0	0	0	6	6	0	0	0	0
Enlargement		0	1	0	0	6	0	0	0	2
Granular, surface		0	1	0	0	0	0	0	0	0
Hepatodiaphragmatic nodule		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Kidney										
Cyst, multiple		0	1	0	0	0	0	0	0	0
Dilatation, pelvis		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ovary										
Cystic dilatation, bursa		0	0	0	0	0	1	0	0	0
Uterus										
Cyst		0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thyroid										
Enlargement		0	0	0	0	2	0	0	0	2
Adrenal										
Enlargement		0	0	0	1	6	0	0	0	0

Table 5 Summary of histopathological findings of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Sex	Period	Male							
		28day					Recovery		
		0	4	20	100	500	0	100	500
Organ findings	Dose level (mg/kg)	6	6	6	6	6	6	6	6
	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Liver	(Grade)								
Fibrosis, focal	total	1	0	0	0	0	0	0	0
	1+	1	0	0	0	0	0	0	0
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total	0	0	0	2	6**	0	0	0
	1+	0	0	0	2	0	0	0	0
	2+	0	0	0	0	6	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	total	1	0	1	1	1	1	0	1
	1+	1	0	1	1	1	1	0	1
Microgranuloma	total	4	4	4	2	3	5	4	4
	1+	4	4	4	2	3	5	4	4
Necrosis, focal	total	0	0	0	0	0	1	0	0
	1+	0	0	0	0	0	1	0	0
Polycystic disease	total	0	0	0	1	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0	0	0
Kidney									
Basophilic tubule	total	4	4	4	2	4	5	6	4
	1+	4	4	4	2	4	5	6	3
	2+	0	0	0	0	0	0	0	1
Cast, hyaline	total	2	0	0	0	0	0	0	0
	1+	2	0	0	0	0	0	0	0
Cyst	total	0	0	0	0	0	0	1	0
	1+	0	0	0	0	0	0	1	0
Eosinophilic body, tubular epithelium, proximal	total	0	0	0	0	1	0	1	4*
	1+	0	0	0	0	1	0	1	3
	2+	0	0	0	0	0	0	0	1
Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal	total	6	6	6	6	6*	6	6	6
	1+	6	6	6	6	2	6	6	4
	2+	0	0	0	0	4	0	0	2
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	total	0	2	0	1	0	2	1	0
	1+	0	2	0	1	0	2	1	0
Polycystic disease	total	0	0	0	1	0	0	0	0
	2+	0	0	0	1	0	0	0	0
Thyroid									
Ectopic thymic tissue	total	0	0	0	1	0	1	0	0
	1+	0	0	0	1	0	1	0	0
Hypertrophy, follicular cell	total	0	0	0	2	6**	0	2	3*
	1+	0	0	0	2	6	0	2	3
Adrenal									
Increase in lipid droplet, fascicular zone	total	0	0	0	0	6**	0	0	0
	1+	0	0	0	0	6	0	0	0

1+, Slight; 2+, Moderate; 3+, Severe.

Significantly different from 0 mg/kg group, *, P<0.05; **, P<0.01.

Table 5 Summary of histopathological findings of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

Organ findings	Sex	Female							
	Period	28day					Recovery		
	Dose level (mg/kg)	0	4	20	100	500	0	100	500
	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Liver	(Grade)								
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	total	0	0	0	4*	6**	0	1	2
	1+	0	0	0	4	0	0	1	2
	2+	0	0	0	0	6	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	total	0	0	0	2	1	1	1	0
	1+	0	0	0	2	1	1	1	0
Microgranuloma	total	5	2	4	4	4	2	4	6*
	1+	5	2	4	4	4	2	4	6
Polycystic disease	total	0	1	0	0	0	0	0	0
	2+	0	1	0	0	0	0	0	0
Kidney									
Basophilic tubule	total	1	0/1 ^s	#	0/1	1	#	#	#
	1+	1	0/1	#	0/1	1	#	#	#
	2+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Cast, hyaline	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Cyst	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Dilatation, pelvis	total	0	0/1	#	1/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	1/1	0	#	#	#
Eosinophilic body, tubular epithelium, proximal	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	2+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Hyaline droplet, tubular epithelium, proximal	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	2+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Inflammatory cell infiltration, lymphocyte, focal	total	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
Mineralization, papilla	total	1	0/1	#	0/1	1	#	#	#
	1+	1	0/1	#	0/1	1	#	#	#
Polycystic disease	total	0	1/1	#	0/1	0	#	#	#
	1+	0	0/1	#	0/1	0	#	#	#
	2+	0	1/1	#	0/1	0	#	#	#
Thyroid									
Ectopic thymic tissue	total	1	0	0	0	0	0	1	2
	1+	1	0	0	0	0	0	1	2
Hypertrophy, follicular cell	total	0	0	0	2	5**	0	0	1
	1+	0	0	0	2	5	0	0	1
Adrenal									
Increase in lipid droplet, fascicular zone	total	0	0	0	0	6**	0	0	0
	1+	0	0	0	0	6	0	0	0

1+, Slight; 2+, Moderate; 3+, Severe.

#, Not examined. \$, Number of animals showing the finding/Number of animals examined.

Significantly different from 0 mg/kg group, *, P<0.05; **, P<0.01.

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on Bacteria

要約

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium*(TA100, TA1535, TA98, TA1537)および*Escherichia coli*(WP2 *uvrA*)を用い、プレインキュベーション法により実施した。予備試験の結果をもとに、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000~313 μg /プレート(公比2)の5濃度を設定した。

2回の本試験の結果とも、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果より、本試験条件下ではリン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルは、変異原性を有さない(陰性)と判定された。

方法

〔使用菌株〕

カリフォルニア大学 B.N. Ames 教授より1983年5月27日に入手した *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537¹⁾ および東京大学医科学研究所 松島教授より1985年10月14日に入手した *Escherichia coli* WP2 *uvrA*²⁾ の5菌株を用いた。各使用菌株は超低温槽で-80℃以下に凍結保存した。

試験に際して、各凍結菌株を融解後、その20 μl をニュートリエントブロス(Oxoid Nutrient Broth No.2, Unipath社)25 gを1 lの精製水に溶解して作成した液体完全培地10 mlに接種し、37℃で8時間振盪培養した。培養終了後の菌懸濁液は菌濃度を測定した後、試験に使用した。

〔被験物質〕

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステル(CAS No.:1241-94-7, ロット番号:K70801, 純度:91.4%; 大八化学工業(株)製造)は、分子量362.44の水に不溶の無色透明液体であり通常の取り扱い条件では安定である。なお、本ロットについては試験期間中安定であることを確認した。

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルはジメチルスルホキシド(DMSO, ロット番号:708S1611, 関東化学(株))を用いて最高濃度(50 mg/ml)の溶液を調製した後、同溶媒で公比2で希釈したものを用いた。

〔陽性対照物質〕

陽性対照物質として下記のものを用いた。

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(純度:98.8%, 和光純薬工業(株))
- NaN₃ : アジ化ナトリウム(純度:96.5%, 和光純薬工業(株))
- ENNG : *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン(純度:99.0%, Sigma Chemical Co.)
- 9-AA : 9-アミノアクリジン(純度:99%, Sigma Chemical Co.)
- 2-AA : 2-アミノアントラセン(純度:98.0%, 和光純薬工業(株))

NaN₃は注射用水(株大塚製薬工場)に、その他はDMSOに溶解したものを使用した。

〔培地およびS9 mixの組成〕

1) トップアガー

アミノ酸水溶液として、精製水を用いてD-ピオチン、L-ヒスチジンおよびL-トリプトファン(0.5 mM混合水溶液)を調製し、これをろ過滅菌後、冷蔵庫に保管した。精製水100 mlに対して、粉末寒天(Bacto-Agar; Difco社)0.6 g, 塩化ナトリウム0.5 gの割合で加え、オートクレープで滅菌し完全に溶解させた後、上記のアミノ酸水溶液を1/10量加えて混和し、約45℃に保温した。

2) 最少グルコース寒天平板培地

クリメディアAM-N培地(オリエンタル酵母工業(株))を購入し、使用した。なお、培地1 lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム七水塩	0.2 g
クエン酸一水塩	2 g
リン酸水素二カリウム無水塩	10 g
リン酸-アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
ブドウ糖	20 g
寒天(OXOID Agar No.1)	15 g

径90 mmのシャーレ1枚あたり30 mlを流して固めてある。

3) S9 mix

S9 mix 1 mlあたり以下の組成で調製し、使用時まで水中に保存した。

S9*	0.1 ml
塩化マグネシウム六水塩	8 μmol

塩化カリウム	33 μmol
D-グルコース6-リン酸	5 μmol
β -NADPH	4 μmol
β -NADH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μmol
滅菌精製水	残量

*: 購入したS9(キッコーマン株)を使用した。このS9は、7週齢の雄性SD系ラットにフェノバルビタールと5,6-ベンゾフラボンを用いて併用投与して作製した肝ホモジネートの9000 \times g遠心上清分画である。

〔試験方法〕

試験はプレインキュベーション法で実施した。

試験管に被験物質溶液0.1 mlを分注し、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mlと菌懸濁液0.1 mlを加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で20分間振盪した。S9 mixを共存させる場合には、0.1 Mナトリウム-リン酸緩衝液の代わりにS9 mixを0.5 ml加えた。プレインキュベーション後、トップアガー2 mlを上記の試験管に加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地に重層した。重層したトップアガーが凝固した後、37 $^{\circ}\text{C}$ で48時間培養した。実体顕微鏡を用いて菌叢の生育状態を観察し、被験物質による抗菌性の有無を調べた後、プレート上の復帰変異コロニー数を自動コロニーカウンターで計測した。予備試験は各濃度あたり1枚のプレートを使用した。本試験は各濃度あたり3枚のプレートを使用し、再現性を確認するため2回実施した。また、被験物質溶液の代わりに陰性対照物質(溶媒)および各菌株毎の陽性対照物質を用いて、被験物質群と同様の操作を行う対照群を設けた。

〔試験結果の判定基準〕

いずれかの試験菌株で、S9 mixの有無によらず、被験物質濃度の増加にともなって復帰変異コロニー数(平均値)が陰性対照値の2倍以上に増加し、さらにその増加に再現性が認められる場合に、当該被験物質は陽性と判定した。その他の場合はすべて陰性と判定した。試験結果の判定には統計学的手法は用いなかった。

結果および考察

〔予備試験〕

5000, 1250, 313, 78.1, 19.5, 4.88, 1.22 μg /プレートの濃度で実施した結果、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても抗菌性は認められなかった。従って、本試験ではS9 mix非共存下および共存下の各菌株について5000, 2500, 1250, 625, 313 μg /プレートの5濃度を設定した。

〔本試験〕

結果をTable 1,2に示した。上記の濃度範囲で試験を実施した結果、2回の本試験ともにS9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても陰性(溶媒)対照値の2倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかつ

た。また、抗菌性も、S9 mixの有無によらず、いずれの菌株においても認められなかった。

S9 mix非共存下および共存下の625 μg /プレート以上で沈殿物が認められた。

以上の結果から、リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの変異原性は陰性と結論した。

文献

- 1) D.M. Maron and B.N. Ames, *Mutation Research*, 113, 173-215(1983).
- 2) M.H.L. Green and W.J. Muriel, *Mutation Research*, 38, 3-32(1976).

連絡先

試験責任者: 水野 文夫
 試験担当者: 榎本 佳明, 石毛 裕子
 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
 314-02 茨城県鹿島郡波崎町砂山14
 Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Fumio Mizuno (Study director)
 Yoshiaki Enomoto, Yuko Ishige
 Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.,
 Kashima Laboratory
 14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun,
 Ibaraki, 314-02 Japan
 Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874