

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Dunnnett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群で対照群と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群で対照群と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、対照群と比較して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群で対照群と比較してカリウムの僅かな高値が、また、雌の1000 mg/kg群で対照群と比較して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群で対照群と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群で対照群と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、対照群と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、対照群と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 | 0 |
| | 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 | 0 |
| Slight yellow | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 |
| Yellow-brown | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Turbidity | | | | | | |
| Clear muddy | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| pH | | | | | | |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 6.5 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 7.5 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| 8 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 8.5 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| ≥9 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Occult blood | | | | | | |
| - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 |
| +/- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Ketones | | | | | | |
| - | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| +/- | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 |
| 1+ | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 0 |
| Glucose | | | | | | |
| - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| (g/dl) | | | | | | |
| Protein | | | | | | |
| - | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| (mg/dl) | | | | | | |
| +/- | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| 30 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 100 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| ≥300 | 0 | 0 | 2 | 1 | 3 | 0 |
| Bilirubin | | | | | | |
| - | 5 | 5 | 2 | 4 | 1 | 4 |
| 1+ | 0 | 0 | 3 | 1 | 4 | 1 |
| Urobilinogen | | | | | | |
| 0.1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| (E.U./dl) | | | | | | |
| 1.0 | 5 | 3 | 4 | 3 | 5 | 3 |
| Erythrocytes | | | | | | |
| - | 4 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 |
| 1+ | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Leukocytes | | | | | | |
| - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Epith. cells | | | | | | |
| - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Casts | | | | | | |
| - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fat glob. | | | | | | |
| - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| M. threads | | | | | | |
| - | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| others | | | | | | |
| - | 0 | 2 | 3 | 3 | 1 | 2 |
| + | 5 | 3 | 2 | 2 | 4 | 3 |

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 | 28 days dosing groups (mg/kg) | | | | | | | | | | | | 14 days recovery groups (mg/kg) | | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------|-----|---|-----|-----|---|-----|-----|---|------|-----|---|---------------------------------|-----|---|------|-----|---|---|---|
| | 0 | | | 100 | | | 300 | | | 1000 | | | 0 | | | 1000 | | | | |
| Organ | Findings | | 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: $0.73 \pm 0.06\%$, $n=50$, 雌副腎実重量; 66 ± 7 mg, $n=50$, 雌副腎相対重量: $0.028 \pm 0.004\%$, $n=50$)。

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. Rousseau, 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と簡易生殖毒性試験

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(100 mg/kg/day)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(100 mg/kg/day)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、ギムザ染色による膣垢塗抹標本作製し、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。交尾成立は雌の膣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