

Table 1 Body weight changes of male rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	400.3 ± 17.6	402.2 ± 16.7	400.0 ± 15.1	402.5 ± 14.4
2	400.2 ± 16.9	400.2 ± 19.1	399.5 ± 14.9	401.3 ± 17.5
5	420.7 ± 20.8	419.8 ± 23.0	419.8 ± 18.6	421.3 ± 18.1
7	430.4 ± 21.9	429.3 ± 23.7	430.7 ± 19.4	432.9 ± 20.0
10	443.3 ± 23.6	444.3 ± 28.4	445.8 ± 21.7	446.9 ± 20.6
14	461.1 ± 24.3	463.5 ± 33.0	463.0 ± 23.1	463.7 ± 20.0
21	486.3 ± 24.7	491.3 ± 38.3	489.2 ± 26.9	484.6 ± 21.0
28	511.4 ± 27.2	519.3 ± 45.2	514.1 ± 27.0	511.3 ± 22.5
35	537.6 ± 31.2	554.0 ± 46.5(11)	542.1 ± 28.2	538.2 ± 25.0
42	555.8 ± 34.3	571.7 ± 50.7(11)	561.6 ± 35.3	552.8 ± 27.4
46	566.4 ± 33.8	585.5 ± 51.1(11)	576.6 ± 34.9	560.2 ± 29.0
Day 1-46, gain	166.2 ± 24.5	181.5 ± 38.5(11)	176.6 ± 26.5	157.7 ± 21.4
Body weight gain ^a (%)	41.5 ± 5.9	44.7 ± 8.3(11)	44.1 ± 6.2	39.2 ± 5.1

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram).

Values in parentheses are no. of animals examined.

a) : (Body weight gain/body weight on day 1)×100

Table 2 Body weight changes of female rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
Before gestation period				
No. of animals	12	12	12	12
Day 1	238.3 ± 14.0	239.0 ± 9.2	236.8 ± 11.6	235.4 ± 11.1
2	238.6 ± 11.1	240.2 ± 10.8	237.3 ± 13.7	237.5 ± 12.5
5	245.6 ± 15.6	248.7 ± 10.7	243.5 ± 13.8	242.3 ± 12.7
7	251.8 ± 12.5	252.6 ± 11.1	250.7 ± 12.0	247.6 ± 12.4
10	254.3 ± 15.0	258.3 ± 13.6	252.8 ± 16.2	251.4 ± 16.7
14	261.3 ± 18.0	264.1 ± 15.8	258.5 ± 17.9	257.8 ± 16.9
Day 1-14, gain	22.9 ± 10.4	25.1 ± 10.3	21.8 ± 10.8	22.3 ± 8.8
Body weight gain ^a (%)	9.6 ± 4.3	10.5 ± 4.2	9.2 ± 4.6	9.4 ± 3.6
During gestation period				
No. of animals	11	10	12	12
Day 0	267.0 ± 16.7	274.7 ± 16.5	265.6 ± 17.4	266.7 ± 18.4
1	270.8 ± 17.1	280.1 ± 16.7	273.3 ± 15.4	271.5 ± 17.3
3	285.9 ± 20.0	291.3 ± 17.6	286.8 ± 17.2	285.7 ± 18.4
5	296.2 ± 20.7	302.0 ± 17.0	295.0 ± 15.3	296.1 ± 17.7
7	304.9 ± 21.5	309.9 ± 16.7	305.0 ± 15.4	304.9 ± 19.1
10	319.2 ± 23.2	323.3 ± 18.5	319.3 ± 16.1	318.7 ± 21.7
14	343.1 ± 25.7	348.3 ± 20.0	342.7 ± 17.8	344.3 ± 20.6
17	372.1 ± 24.8	378.4 ± 23.9	372.3 ± 22.1	375.2 ± 21.6
20	420.1 ± 27.9	428.9 ± 27.0	422.2 ± 28.7	426.1 ± 22.0
Day 0-20, gain	153.1 ± 15.2	154.2 ± 15.5	156.6 ± 17.8	159.4 ± 14.9
Body weight gain ^b (%)	57.4 ± 4.9	56.2 ± 5.4	59.1 ± 6.4	60.1 ± 7.3
During lactation period				
No. of animals	11	10	12	12
Day 0	328.9 ± 28.1	327.6 ± 22.3	321.6 ± 19.6	329.5 ± 27.6
1	325.5 ± 25.4	331.5 ± 23.3	323.8 ± 23.0	326.1 ± 22.0
4	337.6 ± 26.9	343.2 ± 25.5	336.8 ± 20.6	336.6 ± 23.5
Day 0-4, gain	8.7 ± 10.1	15.6 ± 8.1	15.3 ± 8.5	7.1 ± 17.8
Body weight gain ^b (%)	2.7 ± 3.3	4.7 ± 2.4	4.8 ± 2.8	2.4 ± 5.3

Values are expressed as Mean ± S.D. (gram).

a) : (Body weight gain/body weight on day 1)×100

b) : (Body weight gain/body weight on day 0)×100

Table 3 Number of cells in seminiferous tubules of male rats treated orally with tris (2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5	5
Group 1 (Stage I - VI)				
No. of Sertoli cells	20.12 ± 3.18	19.08 ± 1.49	18.52 ± 1.45	18.08 ± 1.45
Spermatogonia				
No.	16.80 ± 5.65	20.52 ± 2.58	18.48 ± 3.17	15.76 ± 2.61
ratio ^{a)}	0.85 ± 0.29	1.08 ± 0.19	1.01 ± 0.21	0.87 ± 0.11
Spermatocytes				
No.	50.80 ± 7.44	51.80 ± 4.84	43.64 ± 2.63	40.84 ± 5.63*
ratio	2.53 ± 0.13	2.72 ± 0.26	2.37 ± 0.24	2.25 ± 0.16
Round spermatids				
No.	138.36 ± 17.20	128.00 ± 8.89	117.68 ± 5.59*	112.60 ± 3.11**
ratio	6.91 ± 0.35	6.75 ± 0.84	6.39 ± 0.70	6.26 ± 0.48
Elongate spermatids				
No.	130.00 ± 21.71	132.32 ± 11.17	103.28 ± 12.34*	95.36 ± 8.44**
ratio	6.53 ± 1.15	6.98 ± 0.88	5.62 ± 0.90	5.30 ± 0.69
Group 2 (Stage VII - VIII)				
No. of Sertoli cells	16.96 ± 2.63	17.04 ± 2.17	16.64 ± 2.73	16.52 ± 2.23
Spermatogonia				
No.	2.92 ± 1.06	2.40 ± 0.93	2.04 ± 0.68	2.60 ± 1.10
ratio	0.18 ± 0.09	0.14 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.16 ± 0.06
Spermatocytes				
No.	91.68 ± 10.37	94.68 ± 6.55	84.44 ± 6.99	82.32 ± 6.70
ratio	5.45 ± 0.56	5.60 ± 0.51	5.16 ± 0.79	5.03 ± 0.54
Round spermatids				
No.	142.08 ± 13.39	131.64 ± 13.72	123.96 ± 8.23	118.76 ± 8.28*
ratio	8.45 ± 0.62	7.75 ± 0.39	7.66 ± 1.66	7.25 ± 0.62*
Elongate spermatids				
No.	129.24 ± 17.37	128.32 ± 16.88	114.72 ± 9.80	105.64 ± 13.47
ratio	7.78 ± 1.54	7.56 ± 0.72	7.09 ± 1.62	6.46 ± 1.05
Group 3 (Stage IX - XI)				
No. of Sertoli cells	19.28 ± 1.92	20.52 ± 1.55	19.20 ± 1.58	19.32 ± 2.18
Spermatogonia				
No.	4.52 ± 1.32	4.20 ± 1.50	4.92 ± 1.63	3.32 ± 1.02
ratio	0.23 ± 0.05	0.21 ± 0.08	0.26 ± 0.11	0.18 ± 0.05
Spermatocytes				
No.	102.52 ± 10.83	99.08 ± 8.42	97.56 ± 4.50	89.04 ± 9.00
ratio	5.34 ± 0.56	4.85 ± 0.50	5.10 ± 0.36	4.62 ± 0.32
Elongate spermatids				
No.	145.24 ± 11.01	130.64 ± 9.90	131.68 ± 19.71	119.24 ± 15.90*
ratio	7.56 ± 0.61	6.37 ± 0.23	6.88 ± 1.04	6.21 ± 0.83*
Group 4 (Stage XII - XIV)				
No. of Sertoli cells	19.16 ± 2.81	20.92 ± 1.73	18.64 ± 1.72	16.72 ± 0.92
Spermatogonia				
No.	4.04 ± 0.89	3.72 ± 0.72	3.64 ± 0.48	3.64 ± 0.71
ratio	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.05
Spermatocytes				
No.	109.80 ± 13.15	110.36 ± 9.22	99.44 ± 4.54	88.76 ± 4.33**
ratio	5.76 ± 0.29	5.28 ± 0.12	5.36 ± 0.34	5.32 ± 0.46
Elongate spermatids				
No.	159.76 ± 15.91	150.28 ± 18.99	137.08 ± 17.70	105.16 ± 18.34**
ratio	8.39 ± 0.63	7.19 ± 0.71	7.35 ± 0.62	6.33 ± 1.31**

Values are expressed as Mean±S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group ; *:p≤0.05,**:p≤0.01.

a) : (No. of spermatogenic cells/no. of Sertoli cells in a seminiferous tubule)

Table 4 Histopathological findings in rats treated orally with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate in preliminary reproduction toxicity screening test

Item		0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of male animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings	Grade				
Testis:					
Decrease, spermatocyte and spermatid	Total	0	0	2	12**
	+	0	0	2	11
	++	0	0	0	1
Multinuclear giant cell, seminiferous tubule	+	0	0	0	1
Vacuolization, Sertoli cell	+	0	0	0	1
Atrophy, seminiferous tubule	+	2	0	0	0
Epididymis:					
Cell debris, lumen	Total	2	0	0	1
	+	2	0	0	0
	++	0	0	0	1
Decrease, sperm	Total	1	0	0	1
	+	1	0	0	0
	++	0	0	0	1
Granuloma, spermatic	+	0	0	0	1
No. of female animals examined		12	12	12	12
Organ: Findings					
Ovary:					
Cyst, corpus luteum	<+>	0	0	2	0

Values are no. of animals with findings.

Grade: +=slight, ++=moderate change and <+>=detected.

Significantly different from 0 mg/kg group; **:p≤0.01.

Table 5 Influence of tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate on reproductive performances of rats in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pairs mated	12	12	12	12
No. of pairs with successful copulation	12	11	12	12
Duration of mating (days, Mean±S.D.)	2.1 ± 1.2	2.3 ± 1.3	2.7 ± 1.2	2.7 ± 1.1
Copulation index ^{a)} (%)	100.0	91.7	100.0	100.0
No. of pregnant animals	11	10	12	12
Fertility index ^{b)} (%)	91.7	90.9	100.0	100.0

a): (No. of pairs with successful copulation/no. of pairs mated)×100

b): (No. of pregnant animals/no. of pairs with successful copulation)×100

Table 6 Influence of tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate on developmental performances of rats in preliminary reproduction toxicity screening test

Item	0 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg
No. of pregnant animals	11	10	12	12
No. of corpora lutea	16.8 ± 1.5	17.3 ± 1.3	17.0 ± 2.3	17.9 ± 2.2
No. of implantation sites	15.5 ± 1.7	16.6 ± 1.3	16.0 ± 2.0	16.3 ± 2.3
Implantation index ^a (%)	92.5 ± 7.2	96.2 ± 6.6	94.5 ± 8.4	91.3 ± 8.8
No. of pups born (%)	13.7 ± 3.1	15.0 ± 1.7	15.0 ± 1.8	15.1 ± 2.7
Delivery index ^b (%)	87.6 ± 15.4	90.3 ± 6.8	94.1 ± 7.2	92.2 ± 9.6
Live pups born				
No.	13.3 ± 2.9	14.7 ± 2.0	14.9 ± 2.0	15.0 ± 2.7
Live birth index ^c (%)	97.1 ± 5.6	97.8 ± 3.6	99.2 ± 2.6	99.4 ± 2.1
Sex ratio (M/F)	1.09 ± 0.69	1.05 ± 0.50	1.17 ± 0.75	0.76 ± 0.44
Dead pups born				
No.	0.5 ± 0.9	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3
Gestation length (day)	22.7 ± 0.5	22.7 ± 0.5	22.5 ± 0.5	22.6 ± 0.5
Gestation index ^d (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Nursing index ^e (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
Live pups on day 4				
No.	13.2 ± 2.8	14.6 ± 2.1	14.4 ± 2.9	14.5 ± 2.9
Viability index ^f (%)	99.5 ± 1.8	99.3 ± 2.3	95.6 ± 11.5	96.7 ± 6.7
Body weight of pups (g)				
Male				
Day 0	7.32 ± 0.77	7.13 ± 0.52	6.69 ± 0.55	6.87 ± 0.84
Day 4	11.71 ± 1.76	11.09 ± 0.93	10.23 ± 0.98*	10.60 ± 1.47
Day 0-4, gain (g)	4.39 ± 1.04	3.96 ± 0.53	3.54 ± 0.77*	3.73 ± 0.80
Body weight gain ^g (%)	59.41 ± 8.87	55.54 ± 6.16	53.19 ± 11.91	54.39 ± 9.50
Female				
Day 0	6.93 ± 0.83	6.63 ± 0.64	6.33 ± 0.58	6.58 ± 0.62
Day 4	11.08 ± 1.71	10.28 ± 1.01	9.48 ± 1.01*	10.03 ± 1.46
Day 0-4, gain (g)	4.16 ± 1.00	3.65 ± 0.56	3.14 ± 0.79*	3.46 ± 0.96
Body weight gain (%)	59.63 ± 10.42	55.24 ± 8.07	49.95 ± 13.09	52.17 ± 11.10

Values are expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from 0 mg/kg group ; * : p ≤ 0.05.

a) : (No. of implantation sites/no. of corpora lutea) × 100

b) : (No. of pups born/no. of implantation sites) × 100

c) : (No. of live pups born/no. of pups born) × 100

d) : (No. of females with live pups delivered/no. of pregnant females) × 100

e) : (No. of females nursing live pups/no. of females with normal delivery) × 100

f) : (No. of live pups on day 4/no. of live pups born) × 100

g) : (Body weight gain/body weight on day 0) × 100

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 細菌を用いる復帰突然変異試験

Reverse Mutation Test of Tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate on Bacteria

要約

既存化学物質安全性調査事業の一環として、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)エステルについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537および*Escherichia coli* WP2 *uvrA*の5菌株を用い、S9 mix無添加および添加の条件でプレート法により用量設定試験を50~5000 µg/プレートの用量で実施したところ、いずれの検定菌においても、抗菌性は認められなかった。したがって、本試験はS9 mix無添加試験および添加試験を313~5000 µg/プレートの範囲で用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた検定菌のいずれについて、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、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)エステルは、用いた試験系において変異原性を有しない(陰性)と判定された。

方法

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

*S. typhimurium*の4菌株¹⁾は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学のB. N. Ames博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA*株²⁾は1979年5月9日に国立遺伝学研究所の賀田恒夫博士から分与を受けた。

検定菌は-80℃以下で凍結保存したものをを用い、ニュートリエントプロスNo. 2(Oxoid)を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10時間往復振とう培養した

〔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)は、分子量546.87の淡黄色透明液体である。試験には、大八化学工業(株)製〔ロット番号:N-60601, 純度99.0%以上(不純物:不明)]を、

(注)日本化学工業協会から供与された、使用時まで室温遮光保管して用いた。

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、アセトンに溶解性がよいことから、アセトンに50 mg/mlになるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

試験の開始に先立って、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)エステルのアセトン溶液中での安定性試験、および含量測定試験を実施した。安定性試験においては、低濃度(3.13 mg/ml)溶液は本試験Iで調製したものについて、また高濃度(500 mg/ml)溶液は染色体異常試験で調製したものについて、室温遮光条件下で、安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、ともに初期値(0時間)の平均値に対して、101%であった。また、含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、低濃度は91.4%、高濃度は91.7%であった。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (上野製薬(株))

SA : アジ化ナトリウム (和光純薬工業(株))

9AA : 9-アミノアクリジン (Sigma Chem. Co.)

2AA : 2-アミノアントラセン (和光純薬工業(株))

AF2, 2AAはジメチルスルホキシド(DMSO, 和光純薬工業(株))に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9AAはDMSOに、SAは純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地およびS9 mixの組成〕

1) トップアガー

下記の水溶液(A)および(B)を容量比10:1の割合で混合した。

(A) バクトアガー(Difco)	0.6%
塩化ナトリウム	0.5%
(B)* L-ヒスチジン	0.5 mM
D-ビオチン	0.5 mM

*:WP2 *uvrA* 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉(株)製の最少寒天培地を用いた。なお、

培地1lあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g
クエン酸・1水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸一アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
バクタアガー (Difco)	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

1 ml中下記の成分を含む

S9**	0.1 ml
塩化マグネシウム	8 μmol
塩化カリウム	33 μmol
グルコース-6-リン酸	5 μmol
NADH	4 μmol
NADPH	4 μmol
ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol

**：7週齢のSprague-Dawley系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5,6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製したS9を用いた。

〔試験方法〕

プレート法により、S9 mix無添加試験およびS9 mix添加試験を行った。

小試験管中に、被験物質調製液0.1 ml、リン酸緩衝液0.5 ml (S9 mix 添加試験 においてはS9 mix 0.5 ml)、検定菌液0.1 mlを混合したのちトップアガー2 mlを加えて混和し、合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにアセトン、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は各Table中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。

用いた平板は用量設定試験においては、溶媒および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれの平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、結果の再現性の確認を行った

〔判定基準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix無添加あるいはS9 mix添加条件において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

結果および考察

〔用量設定試験〕

50~5000 μg/プレート の範囲で公比を約3として、試験を実施したところ、すべての検定菌においてS9 mix無添加試験および添加試験のいずれも抗菌性は認められなかった。

〔本試験〕

結果をそれぞれTable 1, 2に示した。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)エステルを、S9 mix添加試験および添加試験とともに313~5000 μg/プレートの範囲で公比を2として試験を実施した。その結果、2回の試験のいずれも、用いた5種類の検定菌のS9 mix無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、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、用いた試験系において変異原性を有しないもの(陰性)と判定した。

文献

- 1) D. M. Maron, B. N. Ames, *Mutation Res.*, 113, 173 (1983).
- 2) M. H. L. Green, "Handbook of Mutagenicity Test Procedures," eds. by B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, pp. 161-187.

連絡先

試験責任者：澁谷 徹

試験担当者：原 巧, 坂本京子, 川上久美子,
清水ゆり, 松木容彦, 中込まどか,
飯田さやか

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257 秦野市落合729-5

Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Tohru Shibuya (Study Director)

Takumi Hara, Kyoko Sakamoto,

Kumiko Kawakami, Yuri Shimizu,

Yasuhiko Matsuki, Madoka Nakagomi

and Syaka Iida

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center

729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa 257 Japan

Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1. Mutagenicity of tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate** in reverse mutation test (I) on bacteria

With (+) or without (-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, Mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9mix (-)	0	96 111 91 (99 \pm 10.4)	20 11 14 (15 \pm 4.6)	20 21 22 (21 \pm 1.0)	26 10 22 (19 \pm 8.3)	6 10 5 (7 \pm 2.6)	
	313 #	117 104 125 (115 \pm 10.6)	13 11 20 (15 \pm 4.7)	26 34 31 (30 \pm 4.0)	21 26 19 (22 \pm 3.6)	12 7 10 (10 \pm 2.5)	
	625 #	155 112 119 (129 \pm 23.1)	15 12 26 (18 \pm 7.4)	26 21 20 (22 \pm 3.2)	25 36 22 (28 \pm 7.4)	10 9 8 (9 \pm 1.0)	
	1250 #	117 130 130 (126 \pm 7.5)	21 14 15 (17 \pm 3.8)	19 24 25 (23 \pm 3.2)	22 23 25 (23 \pm 1.5)	8 11 11 (10 \pm 1.7)	
	2500 #	143 142 148 (144 \pm 3.2)	15 21 12 (16 \pm 4.6)	23 28 20 (24 \pm 4.0)	21 27 23 (24 \pm 3.1)	3 5 11 (6 \pm 4.2)	
	5000 #	132 121 138 (130 \pm 8.6)	13 20 12 (15 \pm 4.4)	25 36 32 (31 \pm 5.6)	14 28 19 (20 \pm 7.1)	5 3 9 (6 \pm 3.1)	
S9mix (+)	0	107 125 125 (119 \pm 10.4)	16 19 9 (15 \pm 5.1)	23 24 28 (25 \pm 2.6)	25 32 28 (28 \pm 3.5)	12 13 9 (11 \pm 2.1)	
	313	144 118 116 (126 \pm 15.6)	12 13 11 (12 \pm 1.0)	31 27 33 (30 \pm 3.1)	38 33 42 (38 \pm 4.5)	19 18 17 (18 \pm 1.0)	
	625	168 137 137 (147 \pm 17.9)	18 13 12 (14 \pm 3.2)	35 33 23 (30 \pm 6.4)	38 29 32 (33 \pm 4.6)	19 14 14 (16 \pm 2.9)	
	1250 #	130 120 166 (139 \pm 24.2)	8 20 15 (14 \pm 6.0)	35 42 35 (37 \pm 4.0)	36 30 36 (34 \pm 3.5)	18 16 12 (15 \pm 3.1)	
	2500 #	138 129 107 (125 \pm 15.9)	12 15 8 (12 \pm 3.5)	32 29 25 (29 \pm 3.5)	37 39 37 (38 \pm 1.2)	10 12 8 (10 \pm 2.0)	
	5000 #	149 144 128 (140 \pm 11.0)	12 7 11 (10 \pm 2.6)	24 15 25 (21 \pm 5.5)	37 39 23 (33 \pm 8.7)	10 11 7 (9 \pm 2.1)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix (-)	Number of colonies/plate	499 483 527 (503 \pm 22.3)	576 533 509 (539 \pm 33.9)	107 100 111 (106 \pm 5.6)	665 569 726 (653 \pm 79.1)	798 714 804 (772 \pm 50.3)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix (+)	Number of colonies/plate	1091 1292 1423 (1269 \pm 167.2)	326 304 322 (317 \pm 11.7)	1391 1251 1387 (1343 \pm 79.7)	438 455 387 (427 \pm 35.4)	252 243 261 (252 \pm 9.0)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

#:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

**:.Purity was above 99.0 % and impurity was unknown.

Table 2. Mutagenicity of tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate** in reverse mutation test (II) on bacteria

With(+) or without(-) S9 mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate, Mean \pm S.D.)					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537	
S9 mix (-)	0	124 106 135 (122 \pm 14.6)	10 11 15 (12 \pm 2.6)	29 28 25 (27 \pm 2.1)	24 28 20 (24 \pm 4.0)	9 3 12 (8 \pm 4.6)	
	313 #	125 130 142 (132 \pm 8.7)	14 18 18 (17 \pm 2.3)	22 21 23 (22 \pm 1.0)	26 21 25 (24 \pm 2.6)	11 10 15 (12 \pm 2.6)	
	625 #	125 116 141 (127 \pm 12.7)	18 10 16 (15 \pm 4.2)	22 31 30 (28 \pm 4.9)	33 13 19 (22 \pm 10.3)	9 7 10 (9 \pm 1.5)	
	1250 #	134 125 127 (129 \pm 4.7)	17 18 7 (14 \pm 6.1)	21 16 23 (20 \pm 3.6)	27 29 24 (27 \pm 2.5)	9 11 6 (9 \pm 2.5)	
	2500 #	129 120 124 (124 \pm 4.5)	11 9 12 (11 \pm 1.5)	21 17 13 (17 \pm 4.0)	19 22 25 (22 \pm 3.0)	7 10 8 (8 \pm 1.5)	
	5000 #	145 147 141 (144 \pm 3.1)	13 13 12 (13 \pm 0.6)	18 21 21 (20 \pm 1.7)	18 12 21 (17 \pm 4.6)	12 15 13 (13 \pm 1.5)	
S9 mix (+)	0	138 130 126 (131 \pm 6.1)	9 13 12 (11 \pm 2.1)	23 26 16 (22 \pm 5.1)	26 25 41 (31 \pm 9.0)	23 16 15 (18 \pm 4.4)	
	313	153 125 140 (139 \pm 14.0)	15 20 18 (18 \pm 2.5)	32 20 25 (26 \pm 6.0)	33 38 34 (35 \pm 2.6)	26 18 16 (20 \pm 5.3)	
	625	131 140 138 (136 \pm 4.7)	13 17 16 (15 \pm 2.1)	26 28 24 (26 \pm 2.0)	25 32 26 (28 \pm 3.8)	14 15 19 (16 \pm 2.6)	
	1250 #	129 156 161 (149 \pm 17.2)	18 12 16 (15 \pm 3.1)	30 23 12 (22 \pm 9.1)	32 33 40 (35 \pm 4.4)	17 17 15 (16 \pm 1.2)	
	2500 #	122 138 160 (140 \pm 19.1)	9 12 13 (11 \pm 2.1)	19 18 20 (19 \pm 1.0)	37 32 33 (34 \pm 2.6)	16 22 22 (20 \pm 3.5)	
	5000 #	156 158 164 (159 \pm 4.2)	14 25 15 (18 \pm 6.1)	21 29 18 (23 \pm 5.7)	29 39 30 (33 \pm 5.5)	16 15 15 (15 \pm 0.6)	
Positive control	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
S9 mix(-)	Number of colonies/plate	682 650 670 (667 \pm 16.2)	232 245 242 (240 \pm 6.8)	108 151 190 (150 \pm 41.0)	954 935 930 (940 \pm 12.7)	1103 1071 999 (1058 \pm 53.3)	
Positive control	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2	
S9 mix(+)	Number of colonies/plate	1262 1111 1309 (1227 \pm 103.5)	299 270 290 (286 \pm 14.8)	1510 1537 1546 (1531 \pm 18.7)	455 457 566 (493 \pm 63.5)	300 295 294 (296 \pm 3.2)	

AF2:2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA:Sodium azide, 9AA:9-Aminoacridine, 2AA:2-Aminoanthracene

#:Precipitate was observed on the surface of agar plates.

**Purity was above 99.0 % and impurity was unknown.

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 チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験

In Vitro Chromosomal Aberration Test of Tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、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)エステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて試験管内染色体異常試験を実施した。

連続処理(48時間)、短時間処理(6時間)ともに5.0 mg/mlの濃度においても50%を越える増殖抑制は認められなかったことから、すべての試験において5.0 mg/mlの濃度を最高処理濃度とした。最高処理濃度の1/2および1/4をそれぞれ中濃度、低濃度として設定した。連続処理では、S9 mix非存在下における24時間および48時間連続処理後、短時間処理ではS9 mix存在下および非存在下で6時間処理(18時間の回復時間)後、標本を作製し、検鏡することにより染色体異常誘発性を検討した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。短時間処理では、S9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常や倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

以上の結果より、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、上記の試験条件下で染色体異常を誘発しないと結論した。

方法

1. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク(JCRB)から入手(1988年2月、入手時：継代4代、現在12代)したチャイニーズ・ハムスター由来のCHL/IU細胞を、解凍後継代10代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、牛胎児血清(FCS: Biocell)を10%添加したイーグルMEM(日水製薬(株))培養液を用いた。

3. 培養条件

2×10^4 個のCHL/IU細胞を、培養液5 mlを入れたディッシュ(径6 cm, Corning)に播き、37℃のCO₂インキュベーター(5% CO₂)内で培養した。連続処理では、細

胞播種3日目に被験物質を加え、24時間および48時間処理した。また、短時間処理では、細胞播種3日目にS9 mix存在下および非存在下で6時間処理し、処理終了後新鮮な培養液でさらに18時間培養した。

4. 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(略号: TEBTC, CAS No.: 3319-31-1, ロット番号: N-60601, 大八化学工業(株)製造, (株)日本化学工業協会提供)は、淡黄色透明液体、水に対しては不溶で、DMSOおよびアセトンには極めてよく溶け、凝固点-30℃、沸点430℃(760 mmHg)、蒸気圧0.01 mmHg以下(25℃)、分子式C₃₃H₅₄O₆、分子量546.87、純度99.0%以上(不純物は不明)の物質である。

被験物質原体は高温時、水により加水分解を受ける。溶媒中(アセトン)では、3.13~500 mg/mlの濃度範囲で4時間安定であった。

5. 被験物質の調製

被験物質の調製は、使用のつど行った。溶媒はアセトン(和光純薬工業(株))を用いた。原体を溶媒に溶解して原液を調製し、ついで原液を溶媒で順次希釈して所定の濃度の被験物質調製液を作製した。被験物質調製液は、すべての試験において培養液の1%(v/v)になるように加えた。染色体異常試験に用いた被験物質調製液の濃度は、許容範囲内(溶媒中での平均含量が添加量の90.0~110%)の値であった。なお濃度の記載について、純度換算は行わなかった。

6. 細胞増殖抑制試験による処理濃度の決定

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、被験物質の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。被験物質のCHL/IU細胞に対する増殖抑制作用は、単層培養細胞密度計(Monocellater™, オリンパス光学工業(株))を用いて各群の増殖度を計測し、被験物質処理群の陰性対照群に対する細胞増殖の比をもって指標とした。

その結果、連続処理、短時間処理ともに、処理したすべての濃度範囲で50%を明らかに越える増殖抑制作用は認められなかった(Fig. 1)。

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理とも5.0 mg/mlとし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃

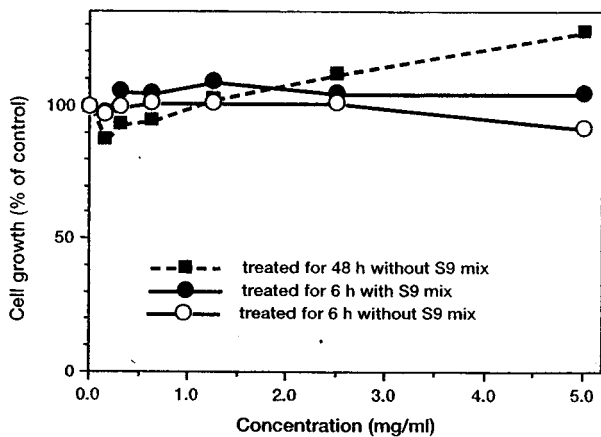


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate

度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水(株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各ディッシュにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞(polyploid)の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、陰性および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。

染色体異常を有する細胞の出現頻度について、林²⁾の方法を参考にして、溶媒の背景データと被験物質処理群間でフィッシャーの直接確率法³⁾(多重性を考慮してfamilywiseの有意水準を5%とした)により、有意差検定を実施した。また、フィッシャーの直接確率法で有意差が認められた場合には、用量依存性に関してコ克蘭・アーミテッジの傾向性検定⁴⁾($p < 0.05$)を行った。原

則として以上2回の検定でともに有意差が認められた場合を陽性とした。傾向性検定で有意差が認められない場合には疑陽性とした。観察細胞数が、構造異常については100個未満、倍数性細胞については400個未満の場合を細胞毒性のため判定不能とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。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)エステルを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。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)エステルを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発作用は認められなかった。

従って、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、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) continuously treated with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate (TEBTC)* without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾		
				gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA	
Control			200	1	3	0	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.13		
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.50		
TEBTC	1.3	24	200	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63		
TEBTC	2.5	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25	NT	NT
TEBTC	5.0	24	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38		
MC	0.00005	24	200	4	43	84	0	1	0	132	1	92 (46.0)	92 (46.0)	0.13			
Solvent ¹⁾	0	48	200	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25		
TEBTC	1.3	48	200	0	0	0	2	0	0	2	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
TEBTC	2.5	48	200	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	NT	NT
TEBTC	5.0	48	200	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
MC	0.00005	48	200	1	29	63	1	8	0	102	4	65 (32.5)	64 (32.0)	0.13			

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, MC: mitomycin C, NT: not tested. 1) Acetone was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran Armitage's trend test was done at p<0.05 when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. *: Purity was more than 99.0%.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate (TEBTC)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid ⁴⁾ (%)	Trend test ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control				200	1	3	0	0	0	0	4	0	4 (2.0)	3 (1.5)	0.38		
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	0	1	2	0	0	3	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.38		
TEBTC	1.3	-	6-(18)	200	1	2	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.13		
TEBTC	2.5	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50	NT	NT
TEBTC	5.0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38		
CPA	0.005	-	6-(18)	200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.25		
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	2	5	0	0	0	7	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0.25		
TEBTC	1.3	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (1.0)	1 (0.5)	0.25		
TEBTC	2.5	+	6-(18)	200	2	1	1	0	0	0	4	0	4 (2.0)	2 (1.0)	0.50	NT	NT
TEBTC	5.0	+	6-(18)	200	2	2	1	0	0	0	5	0	5 (2.5)	3 (1.5)	0.25		
CPA	0.005	+	6-(18)	200	5	34	112	1	0	0	152	8	89 (44.5)	86 (43.0)	0.25		

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), mul: multiple aberrations, TAG: total no. of cells with aberrations, TA: total no. of cells with aberrations except gap, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, CPA: cyclophosphamide, NT: not tested. 1) Acetone was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Cochran Armitage's trend test was done at p<0.05 when the incidence of TAG and polyploid in the treatment groups was significantly different from historical solvent control at p<0.05 by Fisher's exact test. **: Purity was more than 99.0%.

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, “化学物質による染色体異常アトラス,” 朝倉書店, 東京, 1988.
- 2) 林 真, 変異原性試験, 1, 255 (1992).
- 3) 吉村 功 編著, “毒性・薬効データの統計解析, 事例研究によるアプローチ,” サイエンティスト社, 東京, 1987.
- 4) 吉村 功, 大橋靖夫 編, “毒性試験講座14, 毒性試験データの統計解析,” 地人書館, 東京, 1992.

連絡先

試験責任者: 田中憲穂
試験担当者: 山影康次, 若栗 忍, 日下部博一,
橋本恵子, 長尾哲二
(財)食品薬品安全センター秦野研究所
〒257 神奈川県秦野市落合729-5
Tel 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,
Hirokazu Kusakabe, Keiko Hashimoto,
Tetsuji Nagao
Hatano Research Institute, Food and Drug Safety
Center
729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
Tel +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE

CAS No.	3319-31-1
Chemical Name	Tris(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate
Structural Formula	
RECOMMENDATIONS	
The chemical is currently of low priority for further work.	
SUMMARY CONCLUSIONS OF THE SIAR	
Human Health	
<p>In a single dose study of rats, 75 % of the orally administered chemical at 100 mg/kg bw was excreted in an unchanged form in the feces, 16 % as metabolites in the urine and 1.9 % was expired as CO₂.</p> <p>The acute toxicity of the chemical is low because it showed no toxic signs at 2,000 mg/kg bw by oral route in rats [OECD TG 401] and at 2 mL/kg by dermal route in rabbits. During exposure by inhalation at 2600 mg/m³, no death occurred in rats, but reddening patches in the lungs were observed after 14 days post exposure. In an irritation-test for animals, the chemical was slightly irritating to the skin and the eyes. A sensitization test on guinea pigs showed no sensitization [OECD TG 406].</p> <p>A feeding study with rats for 28 days showed a decrease of hemoglobin and an increases of leucocyte counts and serum cholesterol as well as an increased liver weight in the mid and high dose groups (0.67 and 2.0 %). Liver biochemistry revealed increases in palmitoyl CoA oxidation (increased in both sexes at 2.0% and males at all dose levels) and catalase activity (increased in males at 2.0%), suggesting the induction of peroxisome proliferation. Further analysis by an electron microscope indicated slight increased number of peroxisomes in hepatocytes at the high dose. It is generally accepted that the induction of peroxisome proliferation occurs specifically in rodents but much less in other species including humans. There were no dose-related histopathological changes in any treated groups. The NOAEL in this study was considered to be 0.2 % (184 mg/kg bw/day).</p> <p>The OECD reproductive/developmental toxicity screening test [TG 421] for at least 46 days at doses of 100, 300 and 1,000 mg/kg/day demonstrated a decrease of spermatocytes and spermatids in testis in the 300 and 1000 mg/kg groups but not in the 100 mg/kg group.</p> <p>Based on the testicular toxicity, the NOAEL for repeated dose toxicity is considered to be 100 mg/kg bw/day.</p> <p>As for reproductive/developmental toxicity, the chemical showed no adverse effects on copulation, fertility, delivery and nursing of females nor on the viability, body weight and morphology of offspring in the above screening test [OECD TG 421]. However, the NOAEL for reproductive toxicity in males was considered to be 100 mg/kg bw/day</p>	

because of the testicular toxicity described above. Both NOAELs for reproductive toxicity in females and developmental toxicity of offspring were considered to be 1,000 mg/kg bw/day.

The genotoxicity of this chemical was evaluated in many *in vitro* assay systems. It was neither mutagenic in bacteria [OECD TG 471 & 472] nor clastogenic in mammalian cells [Guidelines for Screening Mutagenicity Testing of Chemicals (Japan)].

Environment

The Mackay level III fugacity Model was employed to estimate the environmental distribution of this chemical in air, water, soil and sediment. If released to air, this chemical will exist solely in the particulate phase in the ambient atmosphere. If released to soil, this chemical is not expected to be distributed to other compartments.

This chemical has to be considered as weakly toxic against aquatic organisms and is not biodegradable. This chemical has a high logPow value (5.94), the measured BCF is reported as less than 1 to 2.7 in carp for 6 weeks, but some uncertainty still remains regarding the bioaccumulation potential of this chemical. This result indicates that the bioavailability of this chemical is low. The toxicity results to aquatic plants (algae; *Selenastrum capricornutum*) were >100 mg/L for EC₅₀ (72hr). The acute toxicity data in fish (medaka; *Oryzias latipes*) were >100 mg/L (96h, LC₅₀) and >75 mg/L (14d, LC₅₀). In *Daphnia magna*, the acute toxicity was >180mg/L (48hr: EC₅₀) and the chronic toxicity was >55.6 mg/L (21d, reproduction). All these data were obtained in supersaturated solution with the aid of solubilizer (HCO-40). The test solution was considered to be homogeneous. Another chronic toxicity data in *Daphnia magna* (NOEC >0.082mg/L) was reported (Procedure of ASTM and USEPA). Though this value is lower than the saturation point, the measured concentration data were less reliable.

Based on the description of the test results above, it can be concluded that Tris(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate does not show any toxic effects at the limit of solubility towards those aquatic organisms, which were tested in the laboratory. Though it is difficult to determine a PNEC, this substance is not toxic at its water solubility (OECD TG105; 0.13 mg/L 25 C).

Exposure

This chemical is manufactured as a plasticizer for PVC.

The production volume in Japan is approximately 20,000 tonnes/year and there are 5 manufacturers in Japan. Estimated global production is 40,000-100,000 tonnes/year. This chemical is mainly used as a plasticizer for PVC electrical cable and wire.

Occupational exposure may occur through dermal contact and inhalation of mist. This chemical is produced in closed system and workers wear protective gloves and goggles during the operation, so actual exposure in the work place is considered to be low.

Since this chemical is difficult to extract from the polymeric matrix, consumer and environmental exposure are considered to be low.

NATURE OF FURTHER WORK RECOMMENDED

There is no recommendation for further work. The hazards of this chemical towards the environment and human health are considered to be low. Both occupational and consumer exposure are considered to be low.