

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルのラットを用いる 28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in Rats

要約

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルは、リン酸エステル系の可塑剤である¹⁾。今回、既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、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および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、その毒性について検討した。対照群, 100および500 mg/kg群については14日間回復群を設けた。

摂餌量の低値が500 mg/kg群の雌で認められた。血液学検査では、活性化部分トロンボプラスチン時間の延長が500 mg/kg群の雌で認められた。血液生化学検査では、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、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、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。尿検査では、異常は認められなかった。病理学検査では、肝臓の変化として相対重量の高値が100 mg/kg群の雄、絶対重量および相対重量の高値が500 mg/kg群の雌雄、褐色化が100 および500 mg/kg群の雌雄、腫大が500 mg/kg群の雌雄、小葉中心性の肝細胞肥大が100および500 mg/kg群の雌雄で認められた。腎臓の変化として、近位尿細管上皮内の硝子滴の増強が500 mg/kg群の雄で認められ、一部の動物では好酸性小体の発現も伴われていた。甲状腺の変化として、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。副腎の変化として、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、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。これらの変化は、投与を止めることにより軽減ないし回復していた。20 mg/kg群では雌雄いずれも被験物質に起因した変化は認められなかった。

以上の結果より、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であると判断した。

方法

1. 被験物質

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステル(大八化学工業(株), 製品名#41, CAS No. 1241-94-7, Lot No. K70801, 純度91.4%)は、凝固点-54℃, 融点239℃/13.3 hPa, 油溶性の無色透明液体である。本ロットは投与期間中安定であることが確認された。投与液は被験物質を0.1% Tween 80水溶液に乳化させ調製し、冷蔵保存した。投与液中の被験物質は冷蔵保存条件下で8日間安定であり、使用した投与液にはほぼ所定量の被験物質が均一に含有されていることを確認した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバー(株)より入手したSD系ラット(Crj:CD, SPF)の雌雄を7~8日間検疫・馴化し、試験に使用した。投与開始前日に体重別層化無作為抽出法により群分けした。1群の動物数は雌雄各6匹とし、対照群, 100および500 mg/kg群については雌雄各6匹の14日間回復群を設けた。投与開始時の週齢は5週齢, 体重範囲は雄が156~177 g, 雌が137~158 gであった。

検疫・馴化期間を含めた全飼育期間中, 温度20~25℃, 湿度40~70%, 換気約12回/時, 照明12時間(7:00~19:00)に自動調節された飼育室を使用した。動物は, 実験動物用床敷(ベータチップ:日本チャールス・リバー(株))を敷いたポリカーボネート製ケージに1ケージあたり2匹で収容し飼育した。

動物には, 実験動物用固型飼料(MF:オリエンタル酵母工業(株))および5 μmのフィルター濾過後, 紫外線照射した水道水を, それぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

被験物質を0, 100, 500および1000 mg/kgの各用量でSD系ラットに14日間反復経口投与した結果, 全投与群で流涎が発現し, 体重増加抑制とヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低値が1000 mg/kg群の雄で認められた。また, 肝臓の絶対重量および相対重量の高値が全投与群の雌雄で認められ, 1000 mg/kg群の雌雄では肝肥大が顕著であった。その他, 副腎の絶対重量および相対重量の高値が500 mg/kg以上の投与群の雌, 副腎の相対重量の高値が1000 mg/kg群の雄, 腎臓の相対重量の高値が1000 mg/kg群の雌雄で認められた。従って, 本試験では高用量を500 mg/kgとし, 以下公比5で中間量を100および20 mg/kg, 低用量を4 mg/kgとした。

被験物質は28日間毎日1回、午前中に胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与量は10 mL/kgとし、至近測定日の体重を基に算出した。対照群には同様に溶媒を投与した。

4. 観察および検査方法

1) 一般状態、体重および摂餌量

全例について一般状態を毎日観察した。体重および摂餌量は投与開始日およびその後週1回測定した。摂餌量については、各期間毎の1匹あたりの1日平均摂取量を算出した。

2) 血液学検査

各計画殺時の全例について、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で後大静脈より採血し、赤血球数(シースフローDCインピーダンス検出法)、白血球数(RF/DCインピーダンス検出法)、血小板数(シースフローDCインピーダンス検出法)、ヘモグロビン濃度(SLSヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)を多項目自動血球分析装置(NE-4500: 東亜医用電子)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-70A: 立石電機)、網状赤血球数(アルゴンレーザーを用いたフローサイトメトリー法)を自動網状赤血球測定装置(R-2000: 東亜医用電子)、プロトロンビン時間(PT; Quick一段法)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT; 活性化セファロプラスチン法)を血液凝固自動測定装置(KC10A: アメルング社)により測定した。また、検査の結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。凝固阻止剤として、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間測定には3.13%クエン酸ナトリウム水溶液を、それ以外の項目の測定にはEDTA-2Kを用いた。

3) 血液生化学検査

採取した血液の一部をヘパリン(リチウム塩)処理後、3000 r.p.m., 10分間遠心分離し、得られた血漿を用いてGOT(SSCC改良法)、GPT(SSCC改良法)、ALP(GSCC改良法)、 γ -GTP(SSCC改良法)、尿素窒素(Urease-GLDH法)、グルコース(GK-G6PDH法)、総コレステロール(CES-CO-POD法)、トリグリセライド(LPL-GK-G3PO-POD法)、クレアチニン(Jaffé法)、総蛋白(Biuret法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出)、カルシウム(O-CPC法)、無機リン(UV法)、ナトリウム、カリウム、クロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(日立736-10形: (株)日立製作所)により測定した。

全例の血漿コリンエステラーゼ(アセチルチオコリン-DTNB法)を自動分析装置(日立736-10形: (株)日立製作所)、血球コリンエステラーゼ(アセチルチオコリン-DTNB法)を自記分光光度計(日立U-3200形: (株)日立製作所)および脳コリンエステラーゼ(アセチルチオコリン-DTNB法)を自動分析装置(COBAS FARA:F.

Hoffmann La Roche & Co.)により測定した。

4) 尿検査

雄は投与開始後26日、雌は投与開始後25日に各群雌雄6匹の新鮮尿を採取して、pH、潜血、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、ウロビリノーゲン(試験紙法、マルティスティックス、マイルス・三共(株))を尿分析器(クリニテック100: マイルス・三共(株))により測定した。

5) 病理学検査

全例について採血後に腹大動脈を切断して放血致死させ剖検した。剖検後、全例の脳、肝臓、腎臓、副腎、胸腺、脾臓、甲状腺(上皮小体を含む)、精巣および卵巣の重量を測定した。また、全例の上記器官に加え、下垂体、眼球、ハーダー腺、肺、胃、心臓、膀胱、骨髄(大腿骨)、坐骨神経、脊髄を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定、保存した。ただし、眼球およびハーダー腺はDavidson液で固定した。

投与期間終了時解剖動物の対照群および500 mg/kg群の雌雄の心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、脳、坐骨神経、脊髄、甲状腺、下垂体および全動物の肉眼的異常部位を対象に、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し鏡検した。その結果、雌雄の肝臓、副腎、甲状腺と雄の腎臓に被験物質投与に起因すると考えられる変化が認められたため、投与期間終了時解剖動物の他の群と回復試験終了時解剖動物の当該器官(腎臓は雄のみ)を検査した。また、代表例の肝臓および副腎についてオイルレッドO染色と甲状腺の渡辺鍍銀染色を行い、鏡検した。

6) 統計解析

計量データについては、Bartlett法による等分散の検定を行い、分散が一樣の場合は一元配置分散分析を行った後、Dunnett法またはScheffé法により検定した。分散が一樣でない場合はKruskal-Wallisの検定を行い、Dunnett型またはScheffé型の順位和検定を行った。計数データおよび病理組織所見については、Armitageの χ^2 検定を行った。有意水準は5%未満とした。

結果

1. 一般状態

投与後の流涎が100 mg/kg群の雄で投与開始後6日以降、雌で投与開始後5日以降、500 mg/kg群の雄で投与開始後1日以降、雌で投与開始後4日以降に発現した。また、投与前の流涎が100 mg/kg群の雌で投与開始後8日に、500 mg/kg群の雄で投与開始後7日以降、雌で投与開始後13日以降に発現した。投与後の流涎は、投与直後に発現する一過性的変化であり、投与前の流涎は動物の体に触れることにより発現した。回復期間にはこれらの変化は認められなかった。

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群の雄2例、雌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。

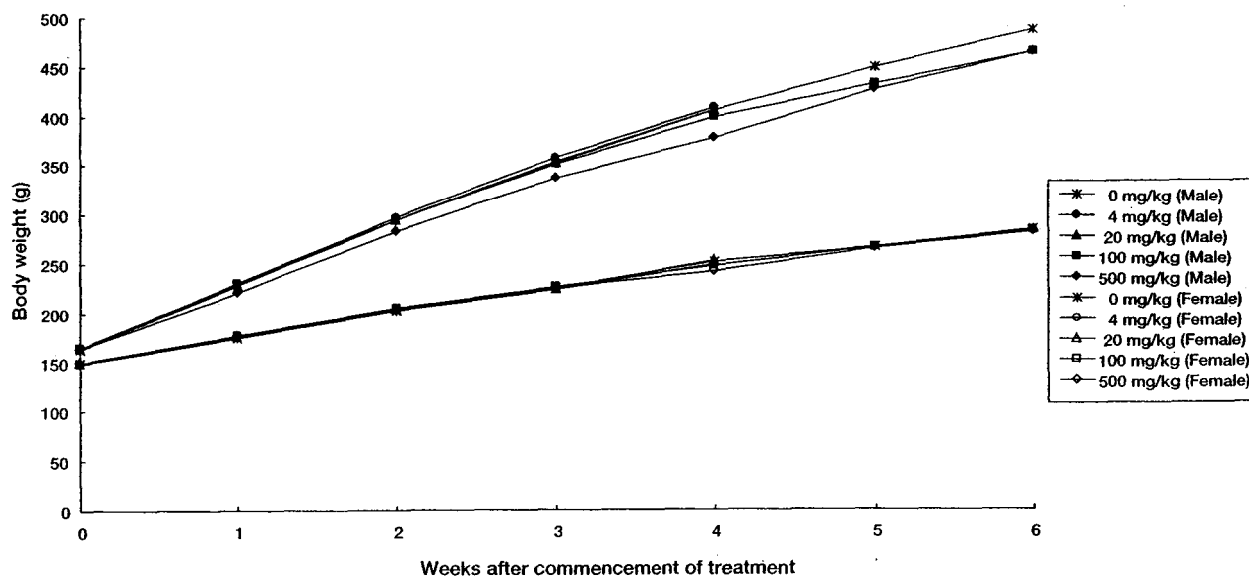


Fig. 1 Body weight changes of rats treated orally with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate in 28-day repeat dose toxicity test

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の代謝を促進し、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で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⁶⁾。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^{7a)}。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	Period 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 Dose level (mg/kg)	Recovery		
		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		
		0	4	20	100	500	0	100	500
Organ findings	Dose level (mg/kg)								
Male	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Spleen									
Nodule		0	0	0	0	0	0	0	1
Liver									
Brownish		0	0	0	4	5	0	0	0
Enlargement		0	0	0	1	6	0	0	0
Granular, surface		0	0	0	1	0	0	0	0
Kidney									
Cyst, multiple		0	0	0	1	0	0	0	0
Testis									
Small		0	0	0	1	0	0	0	0
Thyroid									
Enlargement		0	0	0	1	3	0	0	0
Adrenal									
Enlargement		0	0	0	2	5	0	0	0
Female	Number of animals	6	6	6	6	6	6	6	6
Liver									
Brownish		0	0	0	6	6	0	0	0
Enlargement		0	1	0	0	6	0	0	2
Granular, surface		0	1	0	0	0	0	0	0
Hepatodiaphragmatic nodule		0	0	0	0	1	0	0	0
Kidney									
Cyst, multiple		0	1	0	0	0	0	0	0
Dilatation, pelvis		0	0	0	1	0	0	0	0
Ovary									
Cystic dilatation, bursa		0	0	0	0	0	1	0	0
Uterus									
Cyst		0	0	0	0	1	0	0	0
Thyroid									
Enlargement		0	0	0	0	2	0	0	2
Adrenal									
Enlargement		0	0	0	1	6	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	Dose level (mg/kg)	Male						
			28day				Recovery		
			0	4	20	100	500	0	100
Organ findings	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 [§]	#	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、オートクレーブ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 μ mol
D-グルコース6-リン酸	5 μ mol
β -NADPH	4 μ mol
β -NADH	4 μ mol
ナトリウム-リン酸緩衝液(pH 7.4)	100 μ mol
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-ベンゾフラボンを併用投与して作製した肝ホモジネートの9000×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℃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℃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 μ g/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 μ g/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 μ g/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

Table 1 Results of reverse mutation test (I) of diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on bacteria

With (+) or Without (-) S9 Mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537
S9 Mix (-)	0	103 126 (110) 102 (± 14)	17 16 (15) 12 (± 3)	33 27 (34) 43 (± 8)	13 15 (14) 14 (± 1)	9 10 (11) 13 (± 2)
	313	132 95 (111) 105 (± 19)	15 14 (16) 18 (± 2)	24 56 (39) 37 (± 16)	14 20 (15) 12 (± 4)	11 13 (11) 8 (± 3)
	625 C	121 94 (105) 100 (± 14)	10 9 (12) 16 (± 4)	56 32 (41) 34 (± 13)	14 20 (18) 21 (± 4)	9 5 (8) 10 (± 3)
	1250 C	124 122 (117) 105 (± 10)	10 14 (14) 17 (± 4)	43 46 (42) 37 (± 5)	15 19 (17) 18 (± 2)	8 8 (8) 7 (± 1)
	2500 C	106 83 (107) 133 (± 25)	16 11 (14) 15 (± 3)	42 42 (38) 29 (± 8)	14 19 (18) 21 (± 4)	7 14 (11) 13 (± 4)
	5000 C	104 113 (107) 105 (± 5)	20 15 (16) 13 (± 4)	37 34 (38) 42 (± 4)	20 14 (18) 21 (± 4)	12 9 (10) 9 (± 2)
S9 Mix (+)	0	118 122 (118) 114 (± 4)	19 16 (16) 18 (± 4)	35 50 (42) 41 (± 8)	35 30 (31) 29 (± 3)	13 9 (12) 14 (± 3)
	313	143 131 (126) 103 (± 21)	14 14 (14) 13 (± 1)	31 43 (35) 31 (± 7)	30 25 (28) 30 (± 3)	10 13 (11) 9 (± 2)
	625 C	121 146 (132) 130 (± 13)	21 16 (20) 23 (± 4)	50 42 (44) 39 (± 6)	25 28 (27) 27 (± 2)	14 9 (12) 14 (± 3)
	1250 C	121 138 (129) 127 (± 9)	20 11 (15) 14 (± 5)	42 31 (39) 44 (± 7)	38 22 (27) 20 (± 10)	11 13 (10) 7 (± 3)
	2500 C	118 129 (126) 120 (± 6)	14 20 (17) 18 (± 3)	38 24 (35) 44 (± 10)	26 26 (26) 25 (± 1)	15 8 (10) 7 (± 4)
	5000 C	135 115 (122) 129 (± 10)	16 24 (18) 15 (± 5)	33 35 (39) 50 (± 9)	24 27 (24) 20 (± 4)	7 10 (10) 13 (± 3)
Positive control S9 Mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 Mix (-)	Number of revertants	656 638 (659) 684 (± 23)	303 335 (315) 307 (± 17)	518 599 (549) 529 (± 44)	516 508 (516) 523 (± 8)	383 539 (474) 499 (± 81)
	Positive control S9 Mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 Mix (+)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	906 945 (921) 913 (± 21)	354 359 (337) 297 (± 34)	1272 1270 (1239) 1176 (± 55)	292 236 (262) 257 (± 28)	199 171 (181) 173 (± 16)

AF-2: 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide

ENNG: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA: 9-aminoacridine, 2-AA: 2-aminoanthracene

(Mean)
(\pm S.D.)

C: Precipitates were observed on the surface of agar plates

Table 2 Results of reverse mutation test (II) of diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on bacteria

With(+)or Without(-) S9 Mix	Test Substance Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants(number of colonies/plate)				
		Base-pair change type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 Mix (-)	0	98 118 (105) 98 (± 12)	10 7 (9) 10 (± 2)	21 27 (23) 21 (± 3)	14 35 (26) 28 (± 11)	8 6 (9) 14 (± 4)
	313	91 108 (97) 92 (± 10)	10 11 (12) 16 (± 3)	20 31 (27) 29 (± 6)	24 36 (32) 35 (± 7)	3 5 (5) 7 (± 2)
	625 C	98 85 (97) 107 (± 11)	6 13 (9) 8 (± 4)	29 39 (32) 28 (± 6)	29 39 (29) 18 (± 11)	9 5 (8) 10 (± 3)
	1250 C	105 105 (111) 124 (± 11)	16 14 (13) 10 (± 3)	34 31 (31) 29 (± 3)	38 20 (31) 35 (± 10)	11 8 (9) 7 (± 2)
	2500 C	111 105 (111) 118 (± 7)	11 5 (8) 7 (± 3)	29 26 (32) 41 (± 8)	31 30 (27) 21 (± 6)	10 9 (10) 10 (± 1)
	5000 C	93 113 (97) 84 (± 15)	10 8 (9) 9 (± 1)	32 28 (34) 42 (± 7)	31 27 (29) 30 (± 2)	11 4 (7) 5 (± 4)
S9 Mix (+)	0	116 124 (120) 119 (± 4)	21 15 (17) 16 (± 3)	31 35 (34) 37 (± 3)	39 33 (37) 39 (± 3)	10 13 (12) 12 (± 2)
	313	96 121 (117) 135 (± 20)	9 12 (11) 11 (± 2)	40 38 (39) 38 (± 1)	37 34 (36) 36 (± 2)	11 10 (10) 9 (± 2)
	625 C	119 136 (126) 123 (± 9)	14 12 (12) 10 (± 2)	37 42 (39) 37 (± 3)	30 30 (33) 39 (± 5)	10 15 (15) 20 (± 5)
	1250 C	126 123 (129) 137 (± 7)	13 22 (15) 11 (± 6)	31 37 (31) 26 (± 6)	45 38 (40) 37 (± 4)	14 16 (15) 15 (± 1)
	2500 C	149 129 (136) 129 (± 12)	13 13 (15) 18 (± 3)	34 46 (37) 30 (± 8)	38 27 (34) 38 (± 6)	15 16 (12) 6 (± 6)
	5000 C	119 129 (122) 119 (± 6)	14 20 (17) 18 (± 3)	44 33 (33) 23 (± 11)	33 41 (39) 42 (± 5)	15 13 (15) 16 (± 2)
Positive control S9 Mix (-)	Name	AF-2	NaN ₃	ENNG	AF-2	9-AA
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01	0.5	2	0.1	80
S9 Mix (-)	Number of revertants	787 755 (758) 733 (± 27)	351 323 (329) 313 (± 20)	884 828 (828) 772 (± 56)	564 521 (539) 531 (± 23)	471 435 (446) 432 (± 22)
	Positive control S9 Mix (+)	Name	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
S9 Mix (+)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1	2	10	0.5	2
	Number of revertants	1014 974 (984) 963 (± 27)	370 368 (379) 400 (± 18)	1051 1053 (1064) 1087 (± 20)	258 360 (307) 303 (± 51)	111 192 (167) 198 (± 49)

AF-2:2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃:sodium azide (Mean)
 NNG:N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 9-AA:9-aminoacridine, 2-AA:2-aminoanthracene (\pm S.D.)

C:Precipitates were observed on the surface of agar plates

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの
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
Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate on Cultured Chinese Hamster Cells

要約

リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を、チャイニーズ・ハムスター培養細胞(CHL/IU)を用いて染色体異常試験を実施した。

細胞増殖抑制試験の結果をもとに、連続処理法の24時間処理では50 $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理では25 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix存在下では200 $\mu\text{g/ml}$ 、S9 mix非存在下では80 $\mu\text{g/ml}$ を最高濃度とし、以下、それぞれ公比2で4用量を設定した。

CHL/IU細胞を24時間および48時間連続処理した結果、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出現頻度は5%未満であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下の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出現頻度は5%未満であった。

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、染色体異常を誘発しない(陰性)と結論した。

材料および方法

1. 使用した細胞

大日本製薬(株)から入手(1994年8月、入手時:継代14代、凍結時:17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5代以内で試験に用いた。

2. 培養液の調製

培養には、非働化した仔牛血清(CS:GIBCO LABORATORIES, ロット番号:43N1140)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6cm, Becton Dickinson and Company)に播き、37°CのCO₂インキュベーター(5%CO₂)内で培養した。

連続処理法では、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、短時間処理法では、細胞播種3日目にS9 mixの存在下および非存在下で3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

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の水に不溶な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。

5. 被験物質溶液の調製

被験物質調製液は、用時調製した。溶媒はアセトン(和光純薬工業(株), ロット番号:ESP2354)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。なお、被験物質の秤量に際しては、純度換算を実施した。

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細胞に対する増殖抑制作用は、血球計算盤を用いて各群の生存細胞を数え、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、リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニルエステルの約50%の増殖抑制を示す濃度を、50%をはさむ2濃度の値より算出したところ、連続処理法の24時間および48時間処理ではそれぞれ33, 13 $\mu\text{g/ml}$ であった。また、短時間処理法のS9 mix存在下および非存在下における約50%の増殖抑制を示す濃度は、それぞれ131, 57 $\mu\text{g/ml}$ であった(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最高濃度は、連続処理法の24時間処理では50 $\mu\text{g/ml}$ 、48時間処理では25 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法のS9 mix存在下では200 $\mu\text{g/ml}$ 、S9 mix非存在下では80 $\mu\text{g/ml}$ とし、以下、それぞれ公比2で4用量を設定した。

陽性対照として、連続処理法は、マイトマイシンC(協和発酵工業(株), ロット番号:051AEG)を0.03 $\mu\text{g/ml}$ 、短時間処理法は、ベンゾ[a]ピレン(東京化成工業(株), ロット番号:AX01)を20 $\mu\text{g/ml}$ を設定した。

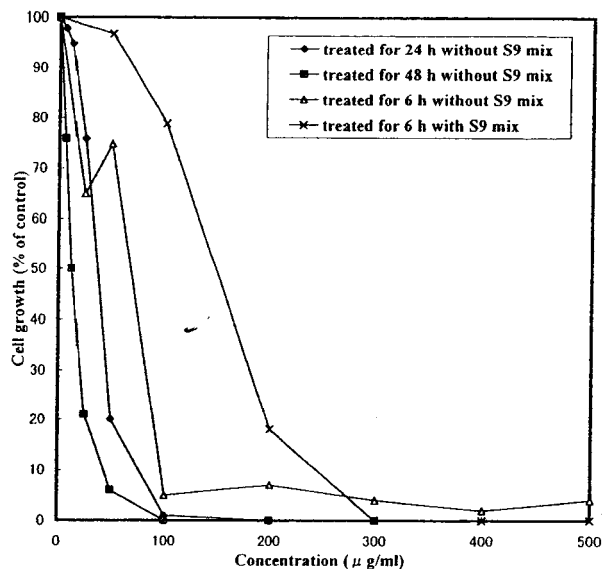


Fig. 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate

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 μg/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2枚作製した。作製した標本を、3%ギムザ溶液で20分間染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1枚のディッシュから得られたスライドを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・哺乳動物試験分科会(MMS)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、構造異常および倍数性細胞については1群200個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と測定

溶媒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。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

連続処理法による染色体分析の結果をTable 1に示した。リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニ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。

短時間処理法による染色体分析の結果をTable 2に示した。リン酸(2-エチルヘキシル)ジフェニ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。

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, 1988.
- 2) 石館 基 監修, “〈改訂〉染色体異常試験データ集,” エル・アイ・シー社, 1987.

連絡先

試験責任者: 西富 保
 試験担当者: 水野 文夫, 太田 絵律奈
 中川 宗洋, 穴澤(岩井)由美子
 (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: Tamotsu Nishitomi (Study director)
 Fumio Mizuno, Erina Ohta
 Munehiro Nakagawa,
 Yumiko Anazawa (Iwai)
 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 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) continuously treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations			Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)	SA		NA	
Solvent ¹⁾	0	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0			
DEP	6.25	24	200	1	1	0	0	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.5	-	-	
	12.5	24	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	25	24	200	0	0	1	1	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	50	24	200	0	1	2	0	0	0	3	3 (1.5)	3 (1.5)	0.0	-	-	
MC	0.03	24	200	1	27	18	0	1	0	47	41 (20.5)	41 (20.5)	0.0	+	-	
Solvent	0	48	200	0	0	1	0	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0			
DEP	3.13	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	6.25	48	200	1	0	0	1	0	0	2	1 (0.5)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	12.5	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
	25	48	200	0	0	0	1	1	0	2	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
MC	0.03	48	200	0	14	32	5	1	1	53	48 (24.0)	48 (24.0)	0.0	+	-	

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DEP: diphenyl 2-ethylhexyl phosphate, MC: mitomycin C

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).

Table 2 Chromosomal analysis of Chinese hamster cells (CHL) treated with diphenyl 2-ethylhexyl phosphate with and without S9 mix

Group	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	S9 mix	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations			Polyploid ²⁾ (%)	Judgement ³⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	total	-g (%)	+g (%)	SA		NA	
Solvent ¹⁾	0	-	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0			
DEP	10	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	20	-	6-(18)	200	0	0	0	0	1	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
	40	-	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
	80	-	6-(18)	100	0	0	0	1	0	0	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.5	-	-	
BP	20	-	6-(18)	200	0	0	0	1	0	0	1	1 (0.5)	1 (0.5)	0.0	-	-	
Solvent	0	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0			
DEP	25	+	6-(18)	200	0	1	0	1	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.0	-	-	
	50	+	6-(18)	200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.0	-	-	
	100	+	6-(18)	200	0	1	1	0	0	0	2	2 (1.0)	2 (1.0)	0.5	-	-	
BP	20	+	6-(18)	Toxic 200	4	55	162	0	0	0	221	166 (83.0)	167 (83.5)	0.0	+	-	

Abbreviations: gap: chromatid gap and chromosome gap, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f: acentric fragment (chromatid type), -g: total no. of cells with aberrations except gap, +g: total no. of cells with aberrations, SA: structural aberration, NA: numerical aberration, DEP: diphenyl 2-ethylhexyl phosphate, BP: benzo[a]pyrene

1) Acetone was used as solvent. 2) Two hundred cells were analysed in each group. 3) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987).