

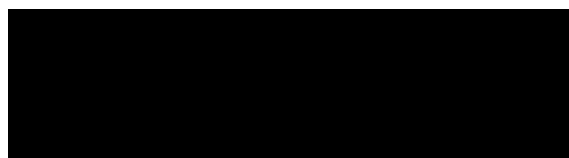
平成 23 年度

内分泌かく乱化学物質
スクリーニング試験

Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester の卵巣摘出マウスにおける皮下投与子宮肥大試験

機 関 名 株式会社 化合物安全性研究所

研究責任者名
(契約者)



信 頼 性 保 証 書

表題：Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester の卵巣摘出マウスにおける
皮下投与子宮肥大試験

試験番号：SR11136

本試験は、株式会社 化合物安全性研究所 QAUによって、下記のとおり査察された。

査 察 段 階	査 察 日	試 験 責 任 者 への 報 告 日	運 営 管 理 者 への 報 告 日
試験計画書	2011 年 12 月 26 日	2011 年 12 月 26 日	2011 年 12 月 26 日
被験物質の受入・表示・保存	2011 年 12 月 26 日	2011 年 12 月 26 日	2011 年 12 月 26 日
投与液の調製	2012 年 1 月 13 日	2012 年 1 月 13 日	2012 年 1 月 13 日
動物受入・検疫・馴化	2011 年 12 月 27 日	2011 年 12 月 27 日	2011 年 12 月 27 日
群分け	2012 年 1 月 12 日	2012 年 1 月 12 日	2012 年 1 月 12 日
投与	2012 年 1 月 13 日	2012 年 1 月 13 日	2012 年 1 月 13 日
一般状態観察	2012 年 1 月 13 日	2012 年 1 月 13 日	2012 年 1 月 13 日
体重測定	2012 年 1 月 13 日	2012 年 1 月 13 日	2012 年 1 月 13 日
剖検・器官重量測定	2012 年 1 月 20 日	2012 年 1 月 20 日	2012 年 1 月 20 日
生データ	2012 年 2 月 13 日	2012 年 2 月 13 日	2012 年 2 月 13 日
最終報告書(草案)：図表	2012 年 2 月 13 日	2012 年 2 月 13 日	2012 年 2 月 13 日
最終報告書(草案)：本文	2012 年 2 月 13 日	2012 年 2 月 13 日	2012 年 2 月 13 日
最終報告書	2012 年 2 月 17 日	2012 年 2 月 17 日	2012 年 2 月 17 日

1. 本試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成 23 年 3 月 31 日 薬食発 0331 第 8 号・平成 23・03・29 製局第 6 号・環企発第 110331010 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知）および経済協力開発機構の「OECD Guideline for the testing of chemicals; Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties (440), Adopted 16 October 2007」に従い実施された。
2. 本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社 化合物安全性研究所

QAU責任者

2012 年 2 月 17 日

目 次

	頁
表題、試験番号、試験目的、試験実施基準および試験法ガイドライン、動物愛護、試験委託者	1
試験施設、試験責任者、試験従事者およびその業務分担、試験期間	2
要約	3
緒言	4
材料および方法	4
成績	12
考察	13
結論	14
参考資料	15
試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	15
資料の保存	15
試験責任者の記名なつ印	15
Figures and Tables	添付
Figure 1 Body weight of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)	
Figure 2 Body weight of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)	
Table 1 General appearance of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)	
Table 2 General appearance of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)	
Table 3 Body weight of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)	
Table 4 Body weight of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)	
Table 5 Autopsy findings of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)	
Table 6 Autopsy findings of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)	

Table 7 Absolute and relative organ weights of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Table 8 Absolute and relative organ weights of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Individual data ----- 添付

Symbols and process for statistical analysis in INDIVIDUAL DATA

1-1-1~1-2-5 General appearance

2-1-1~2-2-5 Body weight

3-1-1~3-2-5 Autopsy findings

4-1-1~4-2-5 Absolute and relative organ weights

Appendices ----- 添付

1 検査成績書(322-26072)

2 Certificate of analysis(10006486)

表題

Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester の卵巣摘出マウスにおける皮下投与子宮
肥大試験

試験番号

S R 1 1 1 3 6

試験目的

Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester を卵巣摘出マウスに 7 日間反復皮下投与
し、子宮重量等の変化からエストロゲン作用および抗エストロゲン作用の有無を評価した。

試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準(GLP) : 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準につい
て」(平成 23 年 3 月 31 日 薬食発 0331 第 8 号・平成 23・03・29 製局第 6
号・環境企発第 110331010 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製
造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン : 経済協力開発機構の「OECD Guideline for the testing of
chemicals; Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term
screening test for oestrogenic properties (440), Adopted 16
October 2007」

動物愛護

本試験は、試験施設の動物実験倫理委員会の承認を得、かつ、標準操作手順書(動物実験倫
理規定)に準拠した。

法規および基準等 : 「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日 法律第 105
号、最終改正 平成 23 年 8 月 30 日 法律第 105 号)
「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年
4 月 28 日 環境省告示第 88 号)
「動物実験に関する指針」(昭和 62 年 5 月 22 日承認 社団法人日本実験
動物学会)

試験委託者

名称 : 国立医薬品食品衛生研究所
所在地 : 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
担当者 : 安全性生物試験研究センター 総合評価研究室

試験施設

名称 : 株式会社 化合物安全性研究所
所在地 : 札幌市清田区真栄 363 番 24 (〒004-0839)
運営管理者 : 

試験責任者

氏名 : 
所属 : 株式会社 化合物安全性研究所 安全性研究部

試験従事者およびその業務分担

被験物質管理 :

動物管理 :

検疫・馴化 :

投与・観察・測定 :

病理検査 :

試験期間

試験開始日 : 2011 年 12 月 26 日
被験物質受入 : 2011 年 9 月 13 日
動物受入 : 2011 年 12 月 27 日
群分け : 2012 年 1 月 12 日
実験開始日 : 2012 年 1 月 13 日
投与開始 : 2012 年 1 月 13 日
投与終了 : 2012 年 1 月 19 日
剖検(生存例) : 2012 年 1 月 20 日
実験終了日 : 2012 年 1 月 20 日
試験終了日 : 2012 年 2 月 17 日

要 約

Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester の 30、100、300 および 1000 mg/kg を 1 群につき 6 匹の卵巣摘出雌性マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用の有無について検討した。さらに、Ethinyl Estradiol を併用投与した際の子宮重量の変化から、抗エストロゲン作用の有無についても検討し、以下の成績を得た。

1. 一般状態では、エストロゲン作用検出群および抗エストロゲン作用検出群のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。
2. 体重推移では、エストロゲン作用検出群および抗エストロゲン作用検出群のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。
3. 剖検では、エストロゲン作用検出群および抗エストロゲン作用検出群のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。
4. 器官重量では、エストロゲン作用検出群の 300 および 1000 mg/kg 群で肝臓の重量増加、抗エストロゲン作用検出群の 100 mg/kg 以上の群で肝臓の重量増加または増加傾向、1000 mg/kg 群で腎臓の重量増加が認められたが、子宮重量にはエストロゲン作用検出群および抗エストロゲン作用検出群のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。

以上のことから、本試験条件下では、Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester のエストロゲン作用および抗エストロゲン作用はいずれについても陰性と結論された。

緒 言

Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester の 30、100、300 および 1000 mg/kg を 1 群につき 6 匹の卵巣摘出雌性マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用の有無について検討した。さらに、Ethinyl Estradiol を併用投与した際の子宮重量の変化から、抗エストロゲン作用の有無についても検討した。

材料および方法

1. 被験物質

名称 : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester

別名 ^{1), 2)} : 亜りん酸ジフェニル(2-エチルヘキシル)

亜りん酸 2-エチルヘキシルジフェニル

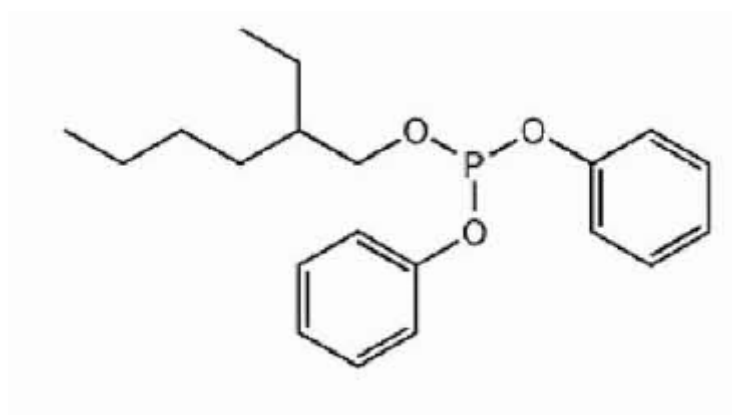
亜りん酸ジフェニル 2-エチルヘキシル

CAS 番号 : 15647-08-2

官報公示整理番号 : 化審法 ; (3)-2525

分子式 : C₂₀H₂₇O₃P ¹⁾

構造式



分子量 : 346.40 ¹⁾

物理化学的性質 : 外観 ; 無色透明の液体(Appendix 1)

引火点 ; 206°C(クリーブランド開放式) ¹⁾

比重 ; 1.02(25°C) ¹⁾

溶解性 ; エタノール及びアセトンに混和するが、水にほとんど溶けない ¹⁾。

ロット番号

: XXXXXXXXXX

濃度	: 単一製品 ¹⁾ (規格設定なし)
製造者	: 
入手量	: 25 g×2 本 (関連試験と共用)
安定性	: データなし ¹⁾ 。
保存条件	: 直射日光を避け、換気のよいなるべく涼しい場所に密閉して保管した ¹⁾ 。火気注意 ¹⁾ 。可燃物を近くに置かない ¹⁾ 。火気、熱源より遠ざけた ¹⁾ 。
保存場所	: 被験物質保存室の冷蔵室 (実測範囲 2～10℃、受入から投与終了日まで)
取り扱い上の注意	: 吸い込んだり、目、皮膚及び衣類に触れないように、適切な保護具を着用した。
毒性情報	: 経口 ラット LD50: 1880mg/kg 自律神経-副交感神経刺激様 末梢神経-神経, 外筒での形の変化 振るえ (RTECS) ¹⁾ 経口 マウス LD50: 2150mg/kg 自律神経-副交感神経刺激様 末梢神経-神経, 外筒での形の変化 振るえ (RTECS) ¹⁾
サンプリング	: 適用しなかった。
残余被験物質	: 関連試験の投与操作終了後、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

2. 比較対照物質

名称	: Ethynyl Estradiol (以下、EE)
CAS 番号	: 57-63-6
分子量	: 296.40
製造業者	: Cayman Chemical Company
販売業者	: 和光純薬工業株式会社
Batch number	: 0422603
純度	: 99.5% (HPLC) (Appendix 2)
保存条件	: 冷凍
保存場所	: 被験物質保存室の冷凍庫 [実測範囲-28～-24℃、2011 年 9 月 29 日(受入)から投与終了日まで]
使用期限	: 2012 年 8 月 17 日

3. 対照物質

名称 : 日本薬局方オリーブ油
 製造業者 : ヤクハン製薬株式会社
 ロット番号 : 109043
 保存条件 : 室温
 使用期限 : 2014 年 9 月

4. 投与液の調製

(1) 被験物質

調製方法 : 被験物質を精秤し、日本薬局方オリーブ油に所定の濃度になるように溶解または懸濁させた。
 調製頻度 : 用時調製
 調製上の注意 : クリーンベンチを使用し、マスク、保護手袋および保護眼鏡等を着用した。
 残余投与液の処置 : 焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

(2) 比較対照物質

調製方法 : 比較対照物質を精秤し、無水エタノールに溶解後、日本薬局方オリーブ油を加えてメスアップした。エタノールの量は全調製量の 5%以内とした。
 調製頻度 : 投与開始日までに 1 回調製した。
 投与液の保存条件 : 遮光気密容器に入れ、室温保存した。
 投与液の保存場所 : 試験施設の被験物質保存室
 [実測範囲 21.7～24.3℃、2012 年 1 月 11 日(調製日)から投与終了日まで]
 投与液の使用期限 : 2 週間
 調製上の注意 : クリーンベンチを使用し、マスク、保護手袋および保護眼鏡を着用した。
 残余投与液の処置 : 焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

5. 試験方法

(1) 試験系

種・系統 : マウス、C57BL/6JJmsSlc
 微生物統御 : SPF
 生産業者 : 日本エスエルシー株式会社

微生物モニタリング : 動物生産業者よりデータを入手した。

動物選択理由 : マウスは毒性試験等で通常用いられている動物種であり、すでに実施された試験において使用されていることからこの系統を選定した。

発注動物数 : 卵巣摘出雌 72 匹

卵巣摘出時週齢 : 6 週齢

受入時週齢 : 7 週齢

出荷時体重基準 : 15～20 g

受入時体重範囲 : 14.2～17.9 g

投与開始時週齢 : 9 週齢

群数 : 11 群

各群動物数 : 6 匹

(2) 検疫および馴化

検疫方法 : 一般状態観察を 1 日 1 回観察し、体重を受入時、馴化 9 日および群分け時(投与開始前日)に測定した。

期間 : 馴化 17 日までの 16 日間

検疫および馴化期間中に、上切歯破折および後肢の跛行が各 1 匹で認められたが、他には異常は認められなかった。なお、上切歯の破折例は馴化 5 日には回復した。

(3) 群分け

検疫および馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定の結果を参考にし、動物の使用の適否を決定した。すなわち、跛行の認められた 1 匹を除いた全 71 匹を対象として、検疫および馴化期間終了日の体重に基づいて、投与開始前日に層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行い、試験に使用する 66 匹を選抜した。投与開始日に 1 匹の体重が群分け時よりも 2.6 g 減少していたため、群分けから外れた動物と交換して試験に使用した。これらの動物の体重範囲は、19.1～21.8 g であり、平均体重(20.57 g)の±20%以内であることを確認した。

跛行の動物、体重減少の動物ならびに選抜から外れた動物の計 6 匹は試験から除外し、標準操作手順書に従って安楽死させた。

(4) 動物およびケージの識別

動物 : 群分け前は生産業者の動物番号を、群分け後は新たな動物番号を油性フェルトペンで尾部に印を付け、個体識別を行った。

飼育ケージ : 群分け前はラベルに試験番号および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

群分け後はラベルに試験番号、試験群および動物番号を明記

し、各ケージの前面に標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

飼育室番号 : 301 号室
 温度・湿度 : $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測範囲 $19 \sim 23^{\circ}\text{C}$), $50 \pm 20\%$ (実測範囲 $48 \sim 54\%$)
 換気回数 : 10～15 回／時間
 照明時間 : 人工照明 12 時間 (8:00～20:00)

動物飼育室の温度および湿度を毎日監視し、異常が認められないことを確認した。

2) 飼育器材および飼育方法

ケージの種類 : ブラケット式金属製金網床ケージ (260W×380D×180H, mm)

1 ケージあたりの収容動物数

: 検疫および馴化期間中は 2 または 5 匹、群分け後は 3 匹とした。

ケージ交換 : 馴化期間中および群分け時に各 1 回実施した。

受皿交換 : 週 2 回実施した。

給餌器交換 : 馴化期間中および群分け時に各 1 回実施した。

自動給水装置の水抜き

: 週 1 回実施した。

室内の清掃 : 1 日 1 回実施した。

室内の消毒 : 塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を 1 週間単位で交互に使用する清拭消毒を 1 日 1 回実施した。

3) 飼料

種類・名称 : 固型飼料、CRF-1

ロット番号 : 111011

製造業者 : オリエンタル酵母工業株式会社

給餌方法 : 金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

汚染物質および微生物検査

: 試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロットの飼料について分析した。汚染物質の分析は Eurofins Analytics 社 (分析報告書: AR-11-JP-002889-01) が、微生物検査は飼料製造業者 (分析試験報告書: No. 11G03-148) がそれぞれ行った。分析データを飼料製造業者から入手した。分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも

許容値を超える値は認められなかった。

4) 飲料水

種類 : 札幌市水道水

給水方法 : 自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

汚染物質検査 : 試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2011 年 10 月 3 日および 2012 年 1 月 5 日に当該飼育室の配管の最末端から試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社(水質検査結果表 : No. A233146 および A234348)が行い、分析項目と許容値は株式会社 化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった。

(6) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

投与量 : 0 (対照群)、30、100、300 および 1000 mg/kg とした。

設定理由 : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester の 40、200 および 1000 mg/kg を雌性マウスに 7 日間反復皮下投与した予備試験(試験番号 : SR11136P)では、各投与群ともに一般状態、体重、剖検所見のいずれにも被験物質投与に関連した変化は認められなかった。このことから、卵巣摘出マウスにおける皮下投与子宮肥大試験のエストロゲン作用検出群としては、高用量を 1000 mg/kg とし、以下公比約 3 で除した 300、100 および 30 mg/kg をそれぞれ中高用量群、中低用量群および低用量群として設定し、対照物質のみを皮下投与する陰性対照群および EE 0.2 µg/kg を皮下投与する陽性対照群を加えた計 6 群を設けた。

抗エストロゲン作用検出群としては、上記と同様に 1000、300、100 および 30 mg/kg の被験物質(皮下投与)に加えて EE 0.6 µg/kg(皮下投与)を同時に投与する 4 群を設定し、対照物質(皮下投与)に加えて EE 0.6 µg/kg(皮下投与)を同時に投与する陰性対照群(EE 群)を加えた計 5 群を設けた。

試験群の構成

試験群	EE		被験物質		動物数(動物番号) 雌
	投与量 (μg/kg)	濃度 (μg/mL)	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	
＜エストロゲン作用検出群＞					
陰性対照群*1	－	－	0	0	6 (151～156)
低用量群	－	－	30	6	6 (251～256)
中低用量群	－	－	100	20	6 (351～356)
中高用量群	－	－	300	60	6 (451～456)
高用量群	－	－	1000	200	6 (551～556)
陽性対照群*2	0.2	0.4	－	－	6 (651～656)
＜抗エストロゲン作用検出群＞					
EE 群 *3	0.6	1.2	0	0	6 (161～166)
低用量+EE 群*4	0.6	1.2	30	6	6 (261～266)
中低用量+EE 群*4	0.6	1.2	100	20	6 (361～366)
中高用量+EE 群*4	0.6	1.2	300	60	6 (461～466)
高用量+EE 群*4	0.6	1.2	1000	200	6 (561～566)

*1：対照物質(日本薬局方オリブ油)を皮下投与した。

*2：EE を皮下投与した。

*3：対照物質(日本薬局方オリブ油)を皮下投与後、EE を皮下投与した。

*4：被験物質投与液を皮下投与後、EE を皮下投与した。

2) 投与

① 被験物質および対照物質

投与方法および投与経路

：背部肩甲骨の間を 70%エタノールで消毒後、ディスポーザブル注射針およびディスポーザブルシリンジを用いて背部に皮下投与した。

投与回数：1 日 1 回、7 日間連続投与した。

投与方法、投与経路および投与回数の選定理由

：「試験法ガイドライン」を参考とした。

投与時刻：13：09～14：57

投与容量：5 mL/kg とした。各個体の投与液量は投与日の体重に基づいて算出した。

② 比較対照物質

投与方法および投与経路

エストロゲン作用検出群

：背部肩甲骨の間を 70%エタノールで消毒後、ディスポーザブル注射針およびマイクロシリンジを用いて皮下投与した。

抗エストロゲン作用検出群

；対照物質(日本薬局方オリブ油)あるいは被験物質を皮下投与した後に、背部肩甲骨の間を 70%エタノールで消毒し、ディス

ポーザブル注射針およびマイクロシリンジを用いて皮下投与した。

投与回数 : 1日1回、7日間連続投与した。

投与方法、投与経路および投与回数の選定理由

: 「試験法ガイドライン」を参考とした。

投与時刻 : 13:37～15:19

投与容量 : 0.5 mL/kg とした。各個体の投与液量は投与日の体重に基づいて算出した。

(7) 観察、測定および検査項目

以下の項目について実施した。投与日数は投与開始日を投与1日として起算した。

1) 一般状態観察

例数 : 全例

期間 : 投与1日から投与7日の翌日の剖検日まで。

頻度 : 毎日の投与前(午前)、投与後(夕刻)の計2回。ただし、剖検日は午前中に1回。

観察方法 : 個々の動物の生死、外観、行動等について観察した。

2) 体重測定

例数 : 全例

測定日 : 投与1日から投与7日までの毎日の投与前ならびに剖検日の午前中に測定した。

測定方法 : 電子式上皿天秤を用いて測定し、0.1 g 単位で記録した。

3) 剖検

例数 : 全例

検査時期 : 最終投与の23～25時間後に実施した。

検査方法 : 体外表を観察し、エーテル麻酔下で放血により安楽死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。子宮については実体顕微鏡下で余分な脂肪を除去した。子宮および臍を10%中性緩衝ホルマリン液に固定・保存した。

4) 器官重量測定

例数 : 全例

検査時期 : 剖検時

測定方法 : 電子式上皿天秤を用いて子宮重量を0.1 mg 単位で測定した。
子宮重量は子宮内液を含んだ重量(wet weight)および子宮壁の一部を切開して子宮内液を除いた重量(blotted weight)について

て測定した。

あわせて、肝臓、腎臓、副腎重量を測定した。

相対重量の算出 : 以下の式から相対重量を算出した。

$$\text{相対重量 (10}^{-3}\text{)} = \frac{\text{絶対重量 (mg)}}{\text{剖検日体重 (g)}} \times 100$$

5) 病理組織学的検査

器官重量に被験物質投与に関連した変化が認められなかったため、病理組織学的検査は実施しなかった。

6. 統計学的方法

体重および器官重量の成績について平均値および標準偏差を算出し、Bartlett の検定法を行い、等分散性を解析した。等分散 ($p > 0.05$) の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散 ($p \leq 0.05$) の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合 ($p \leq 0.10$) は Dunnett の検定法を用いて陰性対照群あるいは EE 群との比較を行った。Kruskal-Wallis 法の解析の結果、有意差がみられた場合 ($p \leq 0.10$) は Steel の検定法を用い陰性対照群あるいは EE 群との比較を行った。

陰性対照群あるいは EE 群との比較検定については、有意水準を 5% とした。

成 績

1. 一般状態

一般状態の成績を Table 1 および 2、INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-2-5 に示す。

(1) エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも異常は認められなかった。

(2) 抗エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも異常は認められなかった。

2. 体重

体重の成績を Figure 1 および 2、Table 3 および 4、INDIVIDUAL DATA 2-1-1~2-2-5 に示す。

(1) エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも陰性対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(2) 抗エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも EE 群と比較して有意な差は認められなかった。

3. 剖検

剖検所見を Table 5 および 6、INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-2-5 に示す。

(1) エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも異常所見は認められなかった。

(2) 抗エストロゲン作用検出群

いずれの投与群でも異常所見は認められなかった。

4. 器官重量

器官の絶対および相対重量を Table 7 および 8、INDIVIDUAL DATA 4-1-1～4-2-5 に示す。

(1) エストロゲン作用検出群

30 および 100 mg/kg 群では、陰性対照群と比較して有意な差は認められなかった。

300 mg/kg 群では、肝臓の相対重量に統計学的に有意な高値が認められた。

1000 mg/kg 群では、肝臓の絶対および相対重量に統計学的に有意な高値が認められた。

陽性対照群では、子宮の wet weight ならびに blotted weight の絶対および相対重量に有意な高値が認められた。

(2) 抗エストロゲン作用検出群

30 mg/kg 群では、EE 群と比較して有意な差は認められなかった。

100 mg/kg 群では、肝臓の絶対および相対重量に統計学的に有意な高値が認められた。

300 mg/kg 群では、統計学的に有意な差は認められなかった。

1000 mg/kg 群では、肝臓および腎臓の絶対および相対重量に統計学的に有意な高値が認められた。

考 察

Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester の 30、100、300 および 1000 mg/kg を 1 群につき 6 匹の卵巢摘出雌性マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用の有無について検討した。さらに、Ethynyl Estradiol を併用投与した際の子宮重量の変化から、抗エストロゲン作用の有無についても検討した。

その結果、被験物質投与各群の一般状態、体重および剖検所見ではエストロゲン作用検出

群および抗エストロゲン作用検出群のいずれにも被験物質投与の影響は認められなかった。

器官重量では、被験物質投与各群の子宮重量に被験物質投与の影響はなく、本被験物質にエストロゲン作用はないと判断した。

他に、エストロゲン作用検出群の 1000 mg/kg 群で肝臓の絶対および相対重量に有意な高値が認められた。この変化は、絶対および相対重量の双方にみられ被験物質投与に関連して発現した毒性変化と考えられた。同様に、300 mg/kg 群でみられている肝臓の相対重量の有意な高値についても同様に被験物質投与に関連して発現した毒性変化と考えられた。

陽性対照群では、子宮重量の有意な高値が認められた。この変化は EE を投与したことによるエストロゲン作用の陽性反応と判断した。

抗エストロゲン作用検出群では、被験物質投与各群の子宮重量にはいずれも EE 群と比較して有意な差は認められなかった。したがって、本被験物質に抗エストロゲン作用は無いと判断した。

他に、1000 mg/kg 群で肝臓および腎臓の絶対および相対重量に有意な高値が認められた。この変化は、絶対および相対重量の双方にみられ被験物質投与に関連して発現した毒性変化と考えられた。100 mg/kg 群でも肝臓の絶対および相対重量に有意な高値が認められた。この有意差については、300 mg/kg 群に有意差がなく用量依存的な発現ではないが、エストロゲン作用検出群の 300 mg/kg 群と同程度の数値であることから、被験物質投与に関連して発現したものと推察された。

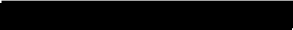
結 論

Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester の 30、100、300 および 1000 mg/kg を 1 群につき 6 匹の卵巣摘出雌性マウスに 7 日間反復皮下投与し、子宮重量の変化からエストロゲン作用の有無について検討した。さらに、Ethinyl Estradiol を併用投与した際の子宮重量の変化から、抗エストロゲン作用の有無についても検討した。

その結果、被験物質投与に関連した子宮重量の変化は認められず、本被験物質のエストロゲン作用および抗エストロゲン作用はいずれについても陰性と結論された。

他に、エストロゲン作用検出群の 300 および 1000 mg/kg 群で肝臓の重量増加、抗エストロゲン作用検出群の 100 mg/kg 以上の群で肝臓の重量増加または増加傾向、1000 mg/kg 群で腎臓の重量増加が認められ、いずれも被験物質投与による毒性変化と判断した。

参考資料

- 1)  製品安全データシート
- 2) 日化辞 Web : JST の有機化合物辞書 DB「日本化学物質辞書」検索サービス.

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験計画書では飼育ケージと給餌器の交換は群分け時のみの記載であった。馴化期間が 16 日間であり 2 週を超えることから、標準操作手順書で規定している交換頻度(1 回/2 週)の規定に従って、馴化期間の半ばにあたる馴化 9 日に飼育ケージ等の交換を行い、試験計画書から逸脱した。しかし、飼育ケージ等の交換頻度が増えることは飼育管理上衛生的にも好ましいものであり、試験の信頼性に対し悪影響を及ぼすものではないと判断した。

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

資料の保存

下記の資料を試験終了後 10 年間、株式会社 化合物安全性研究所 資料保存室に保存する。
その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

- ① 試験計画書
- ② 生データその他の記録文書
- ③ 最終報告書
- ④ 標本 : 固定器官・組織

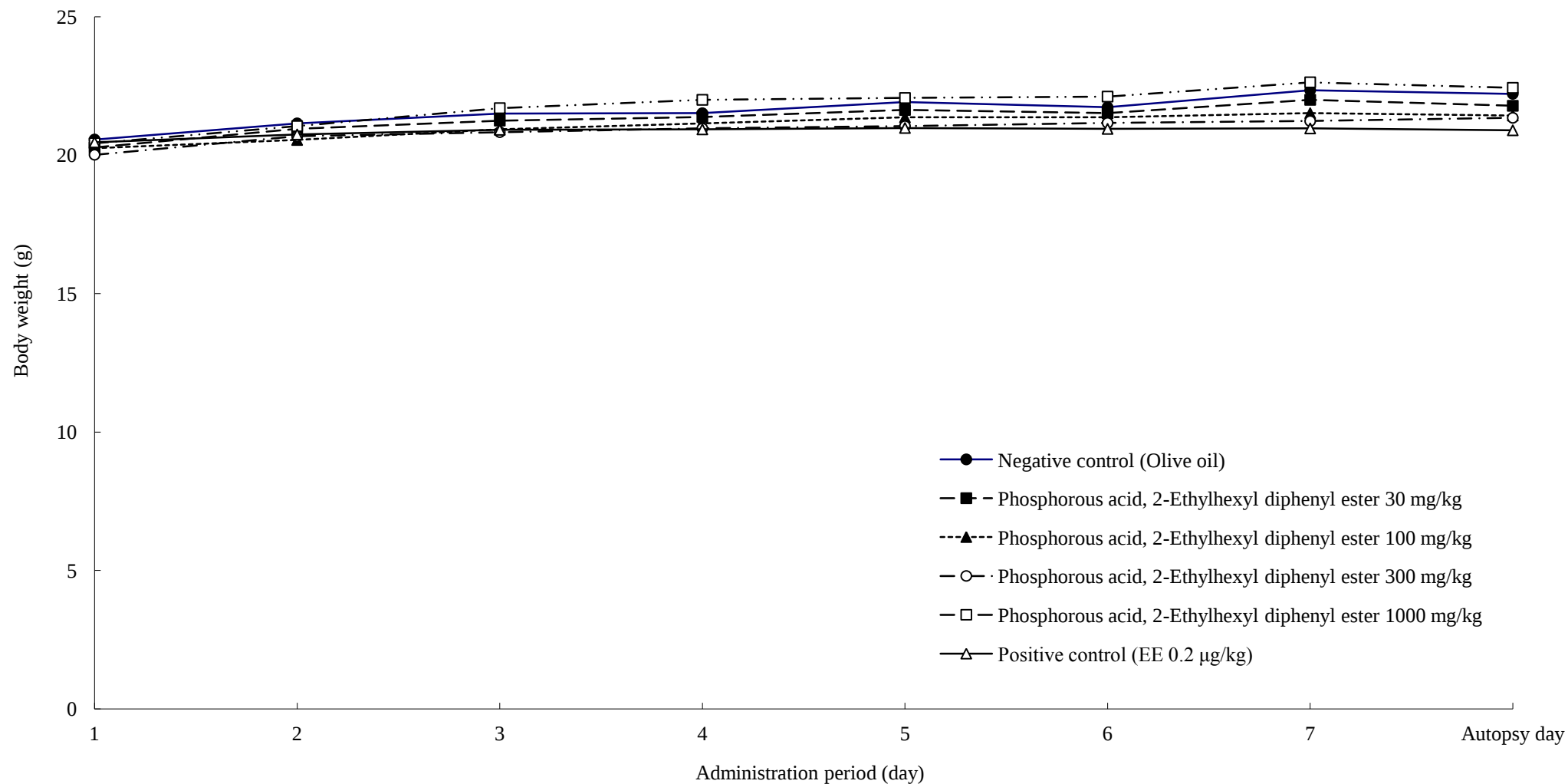
試験責任者の記名なつ印

試験施設 : 株式会社 化合物安全性研究所

試験責任者



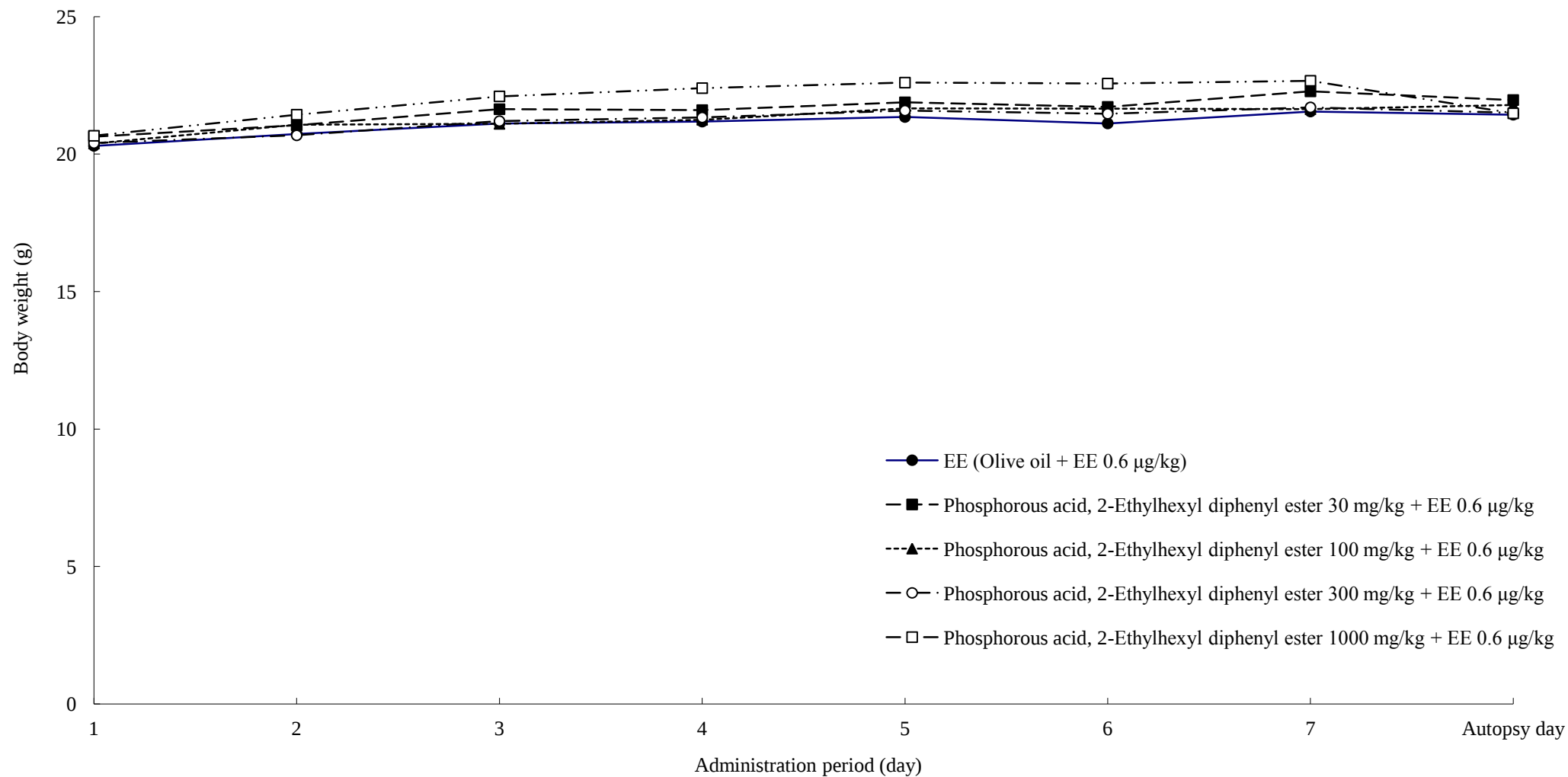
2012 年 2 月 17 日



EE: Ethynyl Estradiol.

Figure 1

Body weight of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)



EE: Ethynyl Estradiol.

Figure 2

Body weight of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Table 1

General appearance of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Group	Findings	Administration period (day)	Autopsy day
		1-7	
Negative control (Olive oil)	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Positive control (EE 0.2 µg/kg)	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6

Values are number of animals with findings.

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 2

General appearance of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Group	Findings	Administration period (day)	Autopsy day
		1-7	
EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	Number of animals examined	6	6
	No abnormal findings	6	6

Values are number of animals with findings.

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 3

Body weight of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Group	Number of animals		Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
			1	2	3	4	5	6	7	
Negative control (Olive oil)	6	MEAN	20.57	21.15	21.50	21.52	21.92	21.73	22.35	22.22
		S.D.	0.62	0.93	0.91	1.11	0.93	0.85	1.11	1.00
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg	6	MEAN	20.28	20.95	21.25	21.38	21.63	21.52	22.00	21.78
		S.D.	0.70	0.90	1.06	1.04	1.03	1.08	1.31	1.47
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg	6	MEAN	20.25	20.55	20.93	21.15	21.37	21.37	21.52	21.43
		S.D.	0.86	0.71	0.73	0.77	0.75	0.77	0.91	0.81
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg	6	MEAN	20.02	20.68	20.83	20.97	21.05	21.17	21.23	21.35
		S.D.	0.67	0.58	0.71	0.67	0.65	0.65	0.70	0.72
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg	6	MEAN	20.43	21.05	21.70	22.00	22.07	22.12	22.63	22.43
		S.D.	0.83	0.90	0.80	0.79	0.97	1.15	0.88	0.98
Positive control (EE 0.2 µg/kg)	6	MEAN	20.47	20.75	20.92	20.93	20.98	20.95	20.97	20.90
		S.D.	0.57	0.73	0.75	0.83	0.89	0.95	1.01	1.01

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 4

Body weight of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Group	Number of animals		Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
			1	2	3	4	5	6	7	
EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	6	MEAN	20.30	20.73	21.12	21.18	21.35	21.12	21.55	21.43
		S.D.	0.45	0.39	0.60	0.53	0.58	0.47	0.61	0.60
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	20.63	21.05	21.63	21.60	21.88	21.72	22.28	21.97
		S.D.	0.70	0.90	0.94	0.98	0.95	1.12	1.21	1.30
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	20.38	21.07	21.10	21.25	21.67	21.65	21.63	21.78
		S.D.	0.74	0.59	0.81	0.83	0.96	1.02	0.97	1.27
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	20.40	20.68	21.20	21.33	21.58	21.47	21.70	21.50
		S.D.	0.55	0.70	0.73	0.51	0.56	0.60	0.44	0.53
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	20.67	21.43	22.10	22.40	22.60	22.57	22.67	21.48
		S.D.	0.72	0.60	0.75	1.04	1.13	1.15	1.34	1.99

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 5

Autopsy findings of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Group	Negative control (Olive oil)	Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester				Positive control (EE 0.2 µg/kg)
		30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg	1000 mg/kg	
Number of animals examined	6	6	6	6	6	6
No abnormal findings	6	6	6	6	6	6

Values are number of animals with findings.

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 6

Autopsy findings of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Group	EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester			
		30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg
Number of animals examined	6	6	6	6	6
No abnormal findings	6	6	6	6	6

Values are number of animals with findings.

EE: Ethynyl Estradiol.

Table 7

Absolute and relative organ weights of ovariectomized female mice for detection of estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Group	Number of animals		Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
				mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
Negative control (Olive oil)	6	MEAN	22.22	15.70	70.813	13.70	61.822	1.050	4.730	253.7	1143.833	6.48	29.162
		S.D.	1.00	2.41	11.521	2.03	10.003	0.055	0.235	13.7	83.823	1.37	5.788
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg	6	MEAN	21.78	13.75	62.798	12.38	56.690	0.977	4.473	239.3	1098.023	6.88	31.425
		S.D.	1.47	2.59	8.779	1.84	5.986	0.107	0.245	20.1	35.926	1.76	6.586
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg	6	MEAN	21.43	14.87	69.407	13.37	62.338	1.003	4.685	239.5	1117.815	6.65	31.067
		S.D.	0.81	1.94	9.212	2.12	9.458	0.039	0.139	12.3	51.523	1.06	5.145
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg	6	MEAN	21.35	14.25	66.870	12.45	58.420	1.123	5.268 **	237.5	1114.152	6.85	32.108
		S.D.	0.72	1.69	8.727	2.00	9.900	0.054	0.361	14.2	87.593	0.73	3.457
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg	6	MEAN	22.43	13.87	61.763	12.52	55.725	1.283 **	5.727 **	266.3	1186.612	8.07	35.983
		S.D.	0.98	2.33	9.596	2.15	8.754	0.045	0.263	17.5	41.091	1.77	8.059
Positive control (EE 0.2 µg/kg)	6	MEAN	20.90	27.67 **	132.588 **	24.88 **	119.157 **	1.008	4.822	236.7	1131.780	6.95	33.235
		S.D.	1.01	3.23	16.395	4.08	19.295	0.083	0.282	15.4	30.867	1.37	6.097

EE: Ethynyl Estradiol.

**: Significantly different from the negative control (Olive oil) group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).

Table 8

Absolute and relative organ weights of ovariectomized female mice for detection of anti-estrogenic activity in subcutaneous uterotrophic bioassay of Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester (SR11136)

Group	Number of animals		Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
				mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)	6	MEAN	21.43	101.32	471.283	85.38	397.717	0.995	4.643	235.5	1098.897	7.20	33.612
		S.D.	0.60	26.17	112.882	17.16	74.940	0.069	0.300	8.3	30.732	1.08	5.088
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	21.97	96.67	441.842	84.68	387.533	1.057	4.803	248.0	1129.618	7.85	35.910
		S.D.	1.30	12.20	63.364	8.83	53.587	0.101	0.261	13.7	34.226	0.73	4.658
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	21.78	98.87	456.400	85.23	392.653	1.147 *	5.260 *	243.3	1118.298	7.62	35.118
		S.D.	1.27	23.73	113.745	17.72	82.717	0.107	0.303	10.0	32.657	0.74	4.500
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	21.50	88.22	410.317	77.12	358.955	1.102	5.120	248.0	1154.448	7.20	33.543
		S.D.	0.53	22.42	102.420	15.63	72.592	0.105	0.426	14.3	79.319	0.85	4.448
Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg	6	MEAN	21.48	80.40	371.068	71.65	331.338	1.283 **	6.002 **	272.8 **	1276.840 +	7.65	36.035
		S.D.	1.99	19.22	72.055	16.15	63.183	0.106	0.584	10.3	94.853	0.65	6.000

EE: Ethynyl Estradiol.

*: Significantly different from the EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg) group at $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).**: Significantly different from the EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg) group at $p \leq 0.01$ (Dunnett's test).+: Significantly different from the EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg) group at $p \leq 0.05$ (Steel's test).

Symbols and process for statistical analysis in INDIVIDUAL DATA

M/C: Values for Bartlett's test for homogeneity of variance,

$p \leq 0.05$ ----- > Kruskal-Wallis test

$p > 0.05$ ----- > One way analysis of variance

F : Values for one way analysis of variance,

$p \leq 0.10$ ----- > Dunnett's test

H : Values for Kruskal-Wallis test,

$p \leq 0.10$ ----- > Steel's test

† : Significant difference, $p \leq 0.10$

* : Significant difference, $p \leq 0.05$

** : Significant difference, $p \leq 0.01$

Dunnett's t : Values for Dunnett's test

Steel's t : Values for Steel's test

* : Significant difference, $p \leq 0.05$

** : Significant difference, $p \leq 0.01$

INDIVIDUAL DATA 1-1-1

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Negative control (Olive oil)

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
151	N	N
152	N	N
153	N	N
154	N	N
155	N	N
156	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-2

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
251	N	N
252	N	N
253	N	N
254	N	N
255	N	N
256	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-3

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
351	N	N
352	N	N
353	N	N
354	N	N
355	N	N
356	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-4

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
451	N	N
452	N	N
453	N	N
454	N	N
455	N	N
456	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-5

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
551	N	N
552	N	N
553	N	N
554	N	N
555	N	N
556	N	N

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-1-6

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Positive control (EE 0.2 µg/kg)

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
651	N	N
652	N	N
653	N	N
654	N	N
655	N	N
656	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-1

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
161	N	N
162	N	N
163	N	N
164	N	N
165	N	N
166	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-2

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
261	N	N
262	N	N
263	N	N
264	N	N
265	N	N
266	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-3

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
361	N	N
362	N	N
363	N	N
364	N	N
365	N	N
366	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-4

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
461	N	N
462	N	N
463	N	N
464	N	N
465	N	N
466	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 1-2-5

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

General appearance ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Administration period (day)	Autopsy day
	1-7	
561	N	N
562	N	N
563	N	N
564	N	N
565	N	N
566	N	N

EE: Ethynyl Estradiol.

N: No abnormal findings.

INDIVIDUAL DATA 2-1-1

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Negative control (Olive oil)

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
151	19.7	20.5	20.8	20.6	21.1	21.1	21.8	22.2
152	20.6	20.5	20.7	20.4	21.0	20.7	20.6	20.7
153	20.0	20.3	20.8	20.7	21.5	21.6	22.2	21.6
154	20.9	22.5	22.4	22.8	23.2	22.6	23.3	23.2
155	21.4	22.1	22.8	22.8	22.9	22.9	23.7	23.4
156	20.8	21.0	21.5	21.8	21.8	21.5	22.5	22.2
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	20.57	21.15	21.50	21.52	21.92	21.73	22.35	22.22
S.D.	0.62	0.93	0.91	1.11	0.93	0.85	1.11	1.00
S.E.	0.25	0.38	0.37	0.45	0.38	0.35	0.45	0.41
M/C	1.1941	1.4911	1.1402	1.7426	1.2781	2.0483	2.0581	2.9351
F	0.4483	0.4975	1.0743	1.2477	1.5518	1.2041	2.5317 †	1.8743

INDIVIDUAL DATA 2-1-2

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg

[illegible]

INDIVIDUAL DATA 2-1-3

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg

[illegible]

INDIVIDUAL DATA 2-1-4

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg

[illegible]

INDIVIDUAL DATA 2-1-5

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg

[illegible]

INDIVIDUAL DATA 2-1-6

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Positive control (EE 0.2 µg/kg)

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
651	20.4	20.9	21.2	21.2	21.4	21.5	21.5	21.5
652	19.4	19.5	19.5	19.5	19.6	19.3	19.2	19.1
653	20.9	21.5	21.5	21.5	21.9	22.0	21.9	21.9
654	20.4	20.7	21.1	21.1	20.8	21.0	21.2	20.8
655	20.9	21.4	21.5	21.8	21.8	21.4	21.6	21.5
656	20.8	20.5	20.7	20.5	20.4	20.5	20.4	20.6
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	20.47	20.75	20.92	20.93	20.98	20.95	20.97	20.90
S.D.	0.57	0.73	0.75	0.83	0.89	0.95	1.01	1.01
S.E.	0.23	0.30	0.31	0.34	0.36	0.39	0.41	0.41
Dunnett's t							2.3840	

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-1

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
161	19.9	20.3	20.6	20.8	21.1	21.3	21.6	21.2
162	19.9	20.6	20.8	20.9	21.2	21.2	21.6	21.4
163	20.2	20.7	20.7	20.7	20.8	20.7	20.8	20.8
164	20.2	20.4	20.9	21.0	20.9	20.4	20.9	20.9
165	20.5	21.1	21.6	21.7	21.8	21.5	22.1	22.1
166	21.1	21.3	22.1	22.0	22.3	21.6	22.3	22.2
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	20.30	20.73	21.12	21.18	21.35	21.12	21.55	21.43
S.D.	0.45	0.39	0.60	0.53	0.58	0.47	0.61	0.60
S.E.	0.18	0.16	0.24	0.22	0.24	0.19	0.25	0.24
M/C	1.4860	3.1119	0.9633	3.8216	3.4008	5.1183	6.8208	10.2650 *
F	0.3877	1.2724	1.8854	2.2787 †	1.8280	2.0512	1.4913	
H								1.1593

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-2

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
261	19.5	20.3	20.9	21.0	21.5	21.2	21.7	21.1
262	20.3	19.7	20.2	20.4	20.5	20.3	20.8	20.6
263	20.6	21.0	21.7	21.0	21.5	21.2	21.8	21.2
264	20.7	21.7	22.4	22.1	22.6	22.1	22.5	22.4
265	21.3	21.6	21.9	22.0	22.0	21.9	22.5	22.3
266	21.4	22.0	22.7	23.1	23.2	23.6	24.4	24.2
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	20.63	21.05	21.63	21.60	21.88	21.72	22.28	21.97
S.D.	0.70	0.90	0.94	0.98	0.95	1.12	1.21	1.30
S.E.	0.28	0.37	0.38	0.40	0.39	0.46	0.49	0.53
Dunnett's t				0.8911				

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-3

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
361	19.1	20.3	19.9	19.9	20.3	20.2	20.3	19.6
362	20.4	21.2	21.2	21.7	22.1	22.3	22.2	22.1
363	20.3	20.9	21.1	21.4	21.6	21.8	21.7	21.9
364	20.3	21.5	21.9	22.0	22.4	22.3	22.4	22.4
365	21.2	20.6	20.5	20.6	20.8	20.6	20.6	21.3
366	21.0	21.9	22.0	21.9	22.8	22.7	22.6	23.4
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	20.38	21.07	21.10	21.25	21.67	21.65	21.63	21.78
S.D.	0.74	0.59	0.81	0.83	0.96	1.02	0.97	1.27
S.E.	0.30	0.24	0.33	0.34	0.39	0.42	0.40	0.52
Dunnett's t				0.1426				

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-4

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
461	19.5	19.6	20.1	20.8	21.2	21.1	21.3	20.9
462	20.6	20.3	21.0	21.3	21.2	21.4	21.6	21.6
463	20.2	21.1	21.4	21.3	21.8	22.0	22.2	22.0
464	20.9	20.4	20.8	20.8	20.9	20.5	21.1	20.8
465	20.2	21.4	22.2	22.1	22.3	22.1	22.1	22.0
466	21.0	21.3	21.7	21.7	22.1	21.7	21.9	21.7
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	20.40	20.68	21.20	21.33	21.58	21.47	21.70	21.50
S.D.	0.55	0.70	0.73	0.51	0.56	0.60	0.44	0.53
S.E.	0.23	0.29	0.30	0.21	0.23	0.25	0.18	0.22
Dunnett's t				0.3208				

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 2-2-5

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Body weight ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight (g) on administration period (day)							Autopsy day
	1	2	3	4	5	6	7	
561	20.0	21.1	22.0	21.8	22.0	21.9	22.4	22.4
562	20.5	21.8	22.3	22.7	22.8	22.5	23.9	23.5
563	20.4	21.0	21.6	21.5	21.8	21.6	21.6	19.8
564	20.2	20.7	21.1	21.5	21.5	21.8	21.4	18.6
565	20.9	21.7	22.3	22.7	22.9	22.9	22.0	21.2
566	22.0	22.3	23.3	24.2	24.6	24.7	24.7	23.4
N	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	20.67	21.43	22.10	22.40	22.60	22.57	22.67	21.48
S.D.	0.72	0.60	0.75	1.04	1.13	1.15	1.34	1.99
S.E.	0.29	0.24	0.30	0.42	0.46	0.47	0.55	0.81
Dunnett's t				2.6021				

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-1-1

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Negative control (Olive oil)

Animal No.	Findings
151	No abnormal findings
152	No abnormal findings
153	No abnormal findings
154	No abnormal findings
155	No abnormal findings
156	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-2

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg

Animal No.	Findings
251	No abnormal findings
252	No abnormal findings
253	No abnormal findings
254	No abnormal findings
255	No abnormal findings
256	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-3

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg

Animal No.	Findings
351	No abnormal findings
352	No abnormal findings
353	No abnormal findings
354	No abnormal findings
355	No abnormal findings
356	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-4

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg

Animal No.	Findings
451	No abnormal findings
452	No abnormal findings
453	No abnormal findings
454	No abnormal findings
455	No abnormal findings
456	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-5

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg

Animal No.	Findings
551	No abnormal findings
552	No abnormal findings
553	No abnormal findings
554	No abnormal findings
555	No abnormal findings
556	No abnormal findings

INDIVIDUAL DATA 3-1-6

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Positive control (EE 0.2 µg/kg)

Animal No.	Findings
651	No abnormal findings
652	No abnormal findings
653	No abnormal findings
654	No abnormal findings
655	No abnormal findings
656	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-1

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

Animal No.	Findings
161	No abnormal findings
162	No abnormal findings
163	No abnormal findings
164	No abnormal findings
165	No abnormal findings
166	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-2

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Findings
261	No abnormal findings
262	No abnormal findings
263	No abnormal findings
264	No abnormal findings
265	No abnormal findings
266	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-3

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Findings
361	No abnormal findings
362	No abnormal findings
363	No abnormal findings
364	No abnormal findings
365	No abnormal findings
366	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-4

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Findings
461	No abnormal findings
462	No abnormal findings
463	No abnormal findings
464	No abnormal findings
465	No abnormal findings
466	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 3-2-5

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Autopsy findings ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Findings
561	No abnormal findings
562	No abnormal findings
563	No abnormal findings
564	No abnormal findings
565	No abnormal findings
566	No abnormal findings

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-1-1

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Negative control (Olive oil)

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
151	22.2	12.2	54.95	9.8	44.14	1.03	4.64	240	1081.08	7.1	31.98
152	20.7	16.3	78.74	14.8	71.50	1.06	5.12	268	1294.69	6.8	32.85
153	21.6	15.0	69.44	14.4	66.67	1.01	4.68	252	1166.67	5.2	24.07
154	23.2	15.0	64.66	13.2	56.90	1.09	4.70	255	1099.14	5.6	24.14
155	23.4	16.1	68.80	14.8	63.25	1.13	4.83	270	1153.85	8.8	37.61
156	22.2	19.6	88.29	15.2	68.47	0.98	4.41	237	1067.57	5.4	24.32
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	22.22	15.70	70.813	13.70	61.822	1.050	4.730	253.7	1143.833	6.48	29.162
S.D.	1.00	2.41	11.521	2.03	10.003	0.055	0.235	13.7	83.823	1.37	5.788
S.E.	0.41	0.98	4.704	0.83	4.084	0.022	0.096	5.6	34.220	0.56	2.363
M/C	2.9351	2.3258	3.2389	5.0733	7.5312	7.1338	3.9244	1.5073	8.8299	4.4575	3.3071
F	1.8743	30.3540 **	36.6216 **	23.4789 **	28.4457 **	17.0887 **	18.5630 **	3.4672 *	1.6225	0.9669	0.8776

INDIVIDUAL DATA 4-1-2

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
251	20.9	11.4	54.55	10.9	52.15	0.87	4.16	232	1110.05	6.9	33.01
252	19.7	10.3	52.28	9.9	50.25	0.83	4.21	209	1060.91	5.1	25.89
253	22.1	15.6	70.59	13.8	62.44	1.02	4.62	249	1126.70	6.9	31.22
254	23.4	13.9	59.40	12.1	51.71	1.11	4.74	247	1055.56	6.1	26.07
255	21.2	14.0	66.04	12.7	59.91	0.99	4.67	231	1089.62	6.1	28.77
256	23.4	17.3	73.93	14.9	63.68	1.04	4.44	268	1145.30	10.2	43.59
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	21.78	13.75	62.798	12.38	56.690	0.977	4.473	239.3	1098.023	6.88	31.425
S.D.	1.47	2.59	8.779	1.84	5.986	0.107	0.245	20.1	35.926	1.76	6.586
S.E.	0.60	1.06	3.584	0.75	2.444	0.043	0.100	8.2	14.667	0.72	2.689
Dunnett's t		1.3993	1.2571	0.9153	0.7834	1.8713	1.6928	1.5762			

INDIVIDUAL DATA 4-1-3

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
351	20.8	16.0	76.92	14.1	67.79	0.98	4.71	229	1100.96	7.1	34.13
352	20.9	12.4	59.33	10.4	49.76	1.03	4.93	221	1057.42	4.9	23.44
353	21.6	12.5	57.87	11.0	50.93	1.01	4.68	243	1125.00	7.6	35.19
354	20.8	16.8	80.77	14.9	71.63	0.94	4.52	244	1173.08	6.8	32.69
355	22.9	16.3	71.18	15.4	67.25	1.05	4.59	245	1069.87	5.9	25.76
356	21.6	15.2	70.37	14.4	66.67	1.01	4.68	255	1180.56	7.6	35.19
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	21.43	14.87	69.407	13.37	62.338	1.003	4.685	239.5	1117.815	6.65	31.067
S.D.	0.81	1.94	9.212	2.12	9.458	0.039	0.139	12.3	51.523	1.06	5.145
S.E.	0.33	0.79	3.761	0.87	3.861	0.016	0.057	5.0	21.034	0.43	2.100
Dunnett's t		0.5980	0.2206	0.2317	0.0789	1.1908	0.2968	1.5579			

INDIVIDUAL DATA 4-1-4

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
451	22.2	11.6	52.25	10.2	45.95	1.05	4.73	222	1000.00	6.2	27.93
452	20.9	12.8	61.24	10.7	51.20	1.11	5.31	264	1263.16	7.6	36.36
453	21.2	14.6	68.87	11.1	52.36	1.08	5.09	231	1089.62	6.0	28.30
454	21.2	16.0	75.47	14.8	69.81	1.14	5.38	235	1108.49	6.8	32.08
455	20.4	15.1	74.02	13.9	68.14	1.19	5.83	234	1147.06	6.7	32.84
456	22.2	15.4	69.37	14.0	63.06	1.17	5.27	239	1076.58	7.8	35.14
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	21.35	14.25	66.870	12.45	58.420	1.123	5.268	237.5	1114.152	6.85	32.108
S.D.	0.72	1.69	8.727	2.00	9.900	0.054	0.361	14.2	87.593	0.73	3.457
S.E.	0.29	0.69	3.563	0.82	4.042	0.022	0.147	5.8	35.760	0.30	1.411
Dunnett's t		1.0405	0.6185	0.8689	0.5193	1.8713	3.5505 **	1.7778			

INDIVIDUAL DATA 4-1-5

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
551	21.8	15.8	72.48	14.2	65.14	1.29	5.92	254	1165.14	11.1	50.92
552	23.3	16.0	68.67	14.4	61.80	1.30	5.58	284	1218.88	7.1	30.47
553	22.3	13.5	60.54	12.8	57.40	1.34	6.01	276	1237.67	7.6	34.08
554	22.8	10.5	46.05	9.6	42.11	1.22	5.35	258	1131.58	7.1	31.14
555	20.9	11.8	56.46	10.1	48.33	1.24	5.93	242	1157.89	6.3	30.14
556	23.5	15.6	66.38	14.0	59.57	1.31	5.57	284	1208.51	9.2	39.15
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	22.43	13.87	61.763	12.52	55.725	1.283	5.727	266.3	1186.612	8.07	35.983
S.D.	0.98	2.33	9.596	2.15	8.754	0.045	0.263	17.5	41.091	1.77	8.059
S.E.	0.40	0.95	3.917	0.88	3.574	0.018	0.108	7.1	16.775	0.72	3.290
Dunnett's t		1.3156	1.4195	0.8226	0.9307	5.9541 **	6.5734 **	1.3929			

INDIVIDUAL DATA 4-1-6

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JJmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of estrogenic activity ; Positive control (EE 0.2 µg/kg)

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
651	21.5	26.2	121.86	23.5	109.30	0.95	4.42	236	1097.67	9.4	43.72
652	19.1	29.7	155.50	26.9	140.84	0.89	4.66	210	1099.48	6.1	31.94
653	21.9	32.3	147.49	31.4	143.38	1.05	4.79	254	1159.82	5.9	26.94
654	20.8	26.6	127.88	21.7	104.33	1.03	4.95	232	1115.38	7.6	36.54
655	21.5	28.3	131.63	25.8	120.00	1.13	5.26	249	1158.14	6.8	31.63
656	20.6	22.9	111.17	20.0	97.09	1.00	4.85	239	1160.19	5.9	28.64
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	20.90	27.67	132.588	24.88	119.157	1.008	4.822	236.7	1131.780	6.95	33.235
S.D.	1.01	3.23	16.395	4.08	19.295	0.083	0.282	15.4	30.867	1.37	6.097
S.E.	0.41	1.32	6.693	1.67	7.877	0.034	0.115	6.3	12.602	0.56	2.489
Dunnett's t		8.5874 **	9.6891 **	7.7739 **	8.7530 **	1.0632	0.6046	1.8695			

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-1

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; EE (Olive oil + EE 0.6 µg/kg)

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
161	21.2	78.1	368.40	69.5	327.83	0.95	4.48	239	1127.36	6.9	32.55
162	21.4	72.1	336.92	63.5	296.73	0.88	4.11	231	1079.44	9.1	42.52
163	20.8	90.4	434.62	78.4	376.92	1.01	4.86	224	1076.92	6.3	30.29
164	20.9	110.3	527.75	97.8	467.94	1.02	4.88	235	1124.40	7.3	34.93
165	22.1	115.2	521.27	98.8	447.06	1.04	4.71	249	1126.70	6.1	27.60
166	22.2	141.8	638.74	104.3	469.82	1.07	4.82	235	1058.56	7.5	33.78
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	21.43	101.32	471.283	85.38	397.717	0.995	4.643	235.5	1098.897	7.20	33.612
S.D.	0.60	26.17	112.882	17.16	74.940	0.069	0.300	8.3	30.732	1.08	5.088
S.E.	0.24	10.68	46.084	7.00	30.594	0.028	0.122	3.4	12.546	0.44	2.077
M/C	10.2650 *	2.7363	2.4778	2.3850	0.9951	1.1154	4.3012	1.8618	10.7977 *	1.5221	0.6076
F		0.9871	1.0581	0.9636	0.9574	7.2693 **	10.8087 **	8.8181 **		0.7513	0.3544
H	1.1593								13.5355 **		

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-2

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 30 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
261	21.1	93.8	444.55	83.6	396.21	0.91	4.31	235	1113.74	9.2	43.60
262	20.6	100.9	489.81	94.3	457.77	1.03	5.00	234	1135.92	7.9	38.35
263	21.2	84.9	400.47	76.7	361.79	1.02	4.81	251	1183.96	7.3	34.43
264	22.4	111.9	499.55	87.0	388.39	1.08	4.82	257	1147.32	7.4	33.04
265	22.3	107.2	480.72	93.8	420.63	1.08	4.84	242	1085.20	8.0	35.87
266	24.2	81.3	335.95	72.7	300.41	1.22	5.04	269	1111.57	7.3	30.17
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	21.97	96.67	441.842	84.68	387.533	1.057	4.803	248.0	1129.618	7.85	35.910
S.D.	1.30	12.20	63.364	8.83	53.587	0.101	0.261	13.7	34.226	0.73	4.658
S.E.	0.53	4.98	25.868	3.60	21.877	0.041	0.106	5.6	13.973	0.30	1.901
Dunnett's t						1.0811	0.7048	1.8760			
Steel's t									1.4412		

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-3

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JmsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 100 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
361	19.6	87.5	446.43	71.6	365.31	1.07	5.46	230	1173.47	8.0	40.82
362	22.1	100.9	456.56	92.6	419.00	1.13	5.11	246	1113.12	6.8	30.77
363	21.9	103.9	474.43	93.5	426.94	1.10	5.02	249	1136.99	8.9	40.64
364	22.4	117.3	523.66	99.7	445.09	1.17	5.22	242	1080.36	7.3	32.59
365	21.3	125.1	587.32	98.4	461.97	1.06	4.98	235	1103.29	7.3	34.27
366	23.4	58.5	250.00	55.6	237.61	1.35	5.77	258	1102.56	7.4	31.62
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	21.78	98.87	456.400	85.23	392.653	1.147	5.260	243.3	1118.298	7.62	35.118
S.D.	1.27	23.73	113.745	17.72	82.717	0.107	0.303	10.0	32.657	0.74	4.500
S.E.	0.52	9.69	46.436	7.23	33.769	0.044	0.124	4.1	13.332	0.30	1.837
Dunnett's t						2.6589 *	2.7165 *	1.1756			
Steel's t									0.9608		

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-4

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 300 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
461	20.9	91.1	435.89	82.0	392.34	1.04	4.98	264	1263.16	7.4	35.41
462	21.6	74.0	342.59	67.9	314.35	1.16	5.37	265	1226.85	6.0	27.78
463	22.0	59.5	270.45	53.1	241.36	1.03	4.68	240	1090.91	7.8	35.45
464	20.8	77.8	374.04	73.4	352.88	1.02	4.90	241	1158.65	8.4	40.38
465	22.0	106.5	484.09	91.2	414.55	1.29	5.86	249	1131.82	6.9	31.36
466	21.7	120.4	554.84	95.1	438.25	1.07	4.93	229	1055.30	6.7	30.88
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	21.50	88.22	410.317	77.12	358.955	1.102	5.120	248.0	1154.448	7.20	33.543
S.D.	0.53	22.42	102.420	15.63	72.592	0.105	0.426	14.3	79.319	0.85	4.448
S.E.	0.22	9.15	41.813	6.38	29.636	0.043	0.174	5.8	32.382	0.35	1.816
Dunnett's t						1.8700	2.0998	1.8760			
Steel's t									1.4412		

EE: Ethynyl Estradiol.

INDIVIDUAL DATA 4-2-5

STUDY NO. SR11136 TITLE : Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester Uterotrophic bioassay (s.c.)

Absolute and relative organ weights ANIMAL : Mouse, C57BL/6JMsSlc SEX : Ovariectomized female

GROUP : Group for detection of anti-estrogenic activity ; Phosphorous acid, 2-Ethylhexyl diphenyl ester 1000 mg/kg + EE 0.6 µg/kg

Animal No.	Body weight g	Uterus (wet weight)		Uterus (blotted weight)		Liver		Kidney		Adrenal	
		mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %	g	%	mg	10 ⁻³ %	mg	10 ⁻³ %
561	22.4	93.8	418.75	82.4	367.86	1.30	5.80	278	1241.07	6.5	29.02
562	23.5	97.1	413.19	81.4	346.38	1.23	5.23	274	1165.96	7.5	31.91
563	19.8	83.6	422.22	77.6	391.92	1.12	5.66	263	1328.28	7.9	39.90
564	18.6	43.4	233.33	39.4	211.83	1.29	6.94	259	1392.47	8.4	45.16
565	21.2	81.0	382.08	74.1	349.53	1.32	6.23	287	1353.77	8.0	37.74
566	23.4	83.5	356.84	75.0	320.51	1.44	6.15	276	1179.49	7.6	32.48
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
MEAN	21.48	80.40	371.068	71.65	331.338	1.283	6.002	272.8	1276.840	7.65	36.035
S.D.	1.99	19.22	72.055	16.15	63.183	0.106	0.584	10.3	94.853	0.65	6.000
S.E.	0.81	7.85	29.416	6.59	25.794	0.043	0.239	4.2	38.724	0.26	2.449
Dunnett's t						5.0548 **	5.9836 **	5.6031 **			
Steel's t									2.8823 *		

EE: Ethynyl Estradiol.

検 査 成 績 書

2011年 9月14日

株式会社化合物安全性研究所 御中

亜りん酸2 エチルヘキシルジフェニル

規格／等級

Lot No.

数 量

25g

検査項目

検査成績

外観

無色透明の液体

判 定	合 格	検査責任者	
-----	-----	-------	--

成績書発行番号 3000002859

002/002

Certificate of analysis



Ethynyl Estradiol

19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17.alpha.-diol

Item number: [REDACTED]
Batch number: [REDACTED]
Purity Specification: 98%

Molecular Formula: C₂₀H₂₄O₂
CAS Number: 57-63-6

Formula Weight: 296.40
Expiry date: 8/17/2012

Tests	Specifications	Results
HPLC	Column: C ₁₈ , 5µ, 4.8 X 250 mm Mob. Phase: Methanol:Water:Acetic acid (70:30:0.1) Flow Rate: 1.00 ml/min Detector UV: 210 nm	Retention Time Actual: 6.50 min Purity: 98.5 %
Mass	Source Type: ESI M++	Expected: 295.4 Actual: 295.5
Melting Point	185 - 192 °C	185 - 189 °C
TLC	Mob. Phase: Hexane:Ethyl Acetate:Acetic Acid (70:30:1) Stationary Phase: Silica Gel Visualized With: Sulfuric Acid	R _f : 0.49 Purity %: 100.00
UV	λ max: 281 nm	λ max: 282 nm