

# 最終報告書

## 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンの マウスを用いる小核試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課化学物質安全対策室 委託

試験施設

財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

〒257-8523 神奈川県秦野市落合729-5

TEL 0463-82-475

## 目次

要約.....	5
材料と方法.....	6
1. 被験物質.....	6
2. 陰性対照物質.....	6
3. 陽性対照物質.....	6
4. 使用動物と飼育条件.....	7
5. 投与検体の調製.....	7
6. 投与方法.....	9
7. 試験操作、観察と解析.....	10
1) 毒性予備試験.....	10
2) 小核本試験.....	10
試験成績と考察.....	12
1. 毒性予備試験.....	12
2. 小核本試験.....	12
参考文献.....	14
Tables.....	15

## 要約

1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキササンが生体内において染色体異常誘発性を有するか否かを評価するため、ICR 系マウスを用いた強制経口投与による小核試験を実施した。まず、小核本試験における投与量を設定するための毒性予備試験を行い、その結果に基づき小核本試験を実施した。

毒性予備試験は、雌雄マウスを用いて、被験物質を250、500、1000 および2000 mg/kg/day の用量で、1日1回、24時間間隔で2日間連続強制経口投与した。その結果、1000 mg/kg/day 投与群では雄3例および雌1例が死亡し、2000 mg/kg/day 投与群では雌雄全例が死亡あるいは瀕死状態となった。

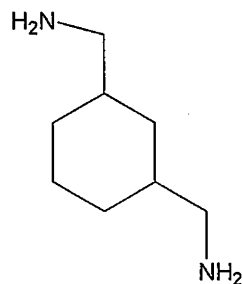
毒性予備試験の結果に基づき、小核本試験は陰性対照群(媒体)、被験物質投与群(125、250 および500 mg/kg/day)および陽性対照群(cyclophosphamide monohydrate)の計5群を設定し、雄マウスを用いて行った。陰性対照群および被験物質投与群は、1日1回、24時間間隔で2日間連続強制経口投与し、陽性対照群は50 mg/kgの用量で、単回強制経口投与した。いずれの投与群も、最終投与の約24時間後に骨髓塗抹標本を作製して小核の観察を行った。その結果、被験物質投与による小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。一方、陽性対照群の小核出現頻度は1%水準で有意な増加が認められ、本試験系の妥当性が確認された。なお、赤血球中に占める幼若赤血球の比率には、陰性対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキササンはマウス骨髓細胞において染色体異常誘発作用を示さないもの(陰性)と結論する。

## 材料と方法

### 1. 被験物質

1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(cis-, trans-混合物)[英名: 1,3-Bis(aminomethyl)cyclohexane (Mixture of cis-,trans-), 略称: 1,3-BAC、CAS No. 2579-20-6、分子式:  $C_8H_{18}N_2$ 、分子量: 142.24、含量: 100.1%、Appendix 1]は無色澄明の液体で、購入し(購入年月日 2009 年 9 月 25 日)、使用時まで冷蔵(実測値: 4~7°C)、遮光、窒素封入下で保管した。1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンの構造式を以下に示す。



被験物質の安定性については、投与開始前(2009 年 11 月 24 日)および投与期間終了後(2009 年 12 月 28 日)に、被験物質 1 滴を 2 枚の赤外分光用臭化カリウム窓板の間に挟み、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR-8300、島津製作所) を用いて  $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$  の範囲で赤外吸収スペクトルを測定し、スペクトルに変化がないことを確認した (Appendix 2)。

### 2. 陰性対照物質

被験物質の媒体および陰性対照物質として日局注射用水 (製造番号: A89AA1、光製薬) を用いた。日局注射用水 (購入年月日: 2008 年 10 月 30 日、使用期限: 2011 年 9 月) は、使用時まで室温で保管した。

### 3. 陽性対照物質

陽性対照物質として cyclophosphamide monohydrate (略称: CP、CAS No. 6055-19-2、純度: 98.0%、

ロット番号:068K1131、製造者:Sigma Chemical)を用いた。CP(購入年月日:2009年9月29日、使用期限:購入後5年)は、使用時まで冷蔵で保管した。

#### 4. 使用動物と飼育条件

日本チャールス・リバー厚木飼育センターから8週齢で購入したICR系マウス[CrIj:CD1(ICR)、SPF]を、入荷日を含む7日間、検疫と馴化を兼ねて飼育した。その間、毎日1回一般状態を観察し、入荷日および検疫終了日に体重を測定した。試験には、検疫期間中の体重が順調に増加し、一般状態に異常の認められなかった動物を9週齢で使用した。検疫期間中は油性フェルトペンにより尾に馴化番号を記し、試験番号、性別、馴化番号および入荷日を記載した動物カードを飼育ケージに付けて識別した。各試験に用いた動物の入荷日、匹数および入荷時体重範囲を下表に示す。余剰動物および毒性予備試験において生存した動物は、各試験の動物飼育終了時に炭酸ガス吸入により安楽死させた。

試験	入荷日	入荷動物数(使用数/余剰数)	入荷時体重範囲
毒性予備試験	2009年11月25日	雄 15 匹(12/3)	28.5~32.7 g
		雌 15 匹(12/3)	21.1~25.6 g
小核本試験	2009年12月16日	雄 30 匹(25/5)	28.4~35.6 g

動物は、全飼育期間を通じて、許容温度:21.0~25.0℃、許容湿度:40.0~75.0%、換気設定:約15回/時間、明暗サイクル:12時間(7時~19時)点灯、12時間(19時~7時)消灯に設定された飼育室内で、床敷としてペパークリーン(日本エスエルシー)を入れたTPX樹脂製ケージ(143W×293D×148H mm、日本チャールス・リバー)に個別に収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア)と水道水(秦野市水道局給水)を自由摂取させて飼育した。全飼育期間中における飼育室の温度および湿度の実測値はそれぞれ22.5~24.0℃および49.0~69.0%であり、いずれも許容範囲内であった。また、供給した飼料、飲料水および床敷の分析結果は、いずれも標準操作手順書に記載の許容範囲内であることを確認した。

動物の群分けは、検疫終了時の測定体重(平均±20%以内の動物を用いた)をもとに、体重別層化無作為抽出法により行った。群分け後の動物には、油性フェルトペンにより尾に動物番号を記し、群ごとに色の異なる動物カードに、試験番号、性別、群(投与量)および動物番号を記入して飼育ケージに付けて識別した。余剰動物は、検疫期間中の識別法を継続した。

#### 5. 投与検体の調製

被験物質は水に溶解することから、媒体として注射用水を用いた。秤量した被験物質に媒体を加えて溶解し、さらに媒体を加えて最高濃度の被験物質投与検体を調製後、以下同媒体で段階希釈して各濃度の投与検体を調製した。被験物質投与検体は、窒素封入して冷蔵(実測値:3~5℃)、遮光下で保管し、調製後3日以内に使用した。被験物質投与検体の調製濃度を以下に示す。

毒性予備試験: 25、50、100 および 200 mg/mL

小核本試験：12.5、25 および 50 mg/mL

なお、精製水を媒体とした 2 mg/mL および 200 mg/mL の被験物質投与検体については、冷蔵、遮光下における 8 日間の安定性が三菱化学安全科学研究所(現 三菱化学メディエンス)において確認されている(試験番号:B050280)。

小核本試験に用いた全ての被験物質投与検体について、秦野研究所でガスクロマトグラフ(GC)法を用いて含量測定を実施した。その結果、各投与検体中における被験物質の平均含量は 90.9~97.0% であり、各測定値のばらつきは 90.5~107%であった(Appendix 3)。これらの値は、試験計画書に記載した判定基準の範囲内(平均含量:調製濃度の 90.0~110%、各測定値のばらつき:平均値の 90.0%~110%)であった。分析法を以下に示す。

#### 1) 標準溶液の調製

被験物質 50.39 mg を精密に量り、日局注射用水(製造番号:A89AA1、光製薬)に溶かして 50 mL (1.007 mg/mL)とした。この液 1 mL を採り、アセトニトリル(和光純薬工業、HPLC 用)で 50 mL とし標準原液(20.14  $\mu$ g/mL)とした。さらに、この標準原液を以下の手順で希釈して標準溶液を調製した(各濃度 n=1 調製)。

標準溶液 10.07  $\mu$ g/mL:標準原液 5 mL に内標準(IS)溶液 1 mL を加えアセトニトリルで 10 mL とした。

標準溶液 5.035  $\mu$ g/mL:標準原液 2.5 mL に IS 溶液 1 mL を加えアセトニトリルで 10 mL とした。

標準溶液 2.014  $\mu$ g/mL:標準原液 1 mL に IS 溶液 1 mL を加えアセトニトリルで 10 mL とした。

#### 2) 内標準(IS)溶液の調製

ビフェニル(東京化成工業、東京化成特級) 2.03 mg を採り、アセトニトリルに溶かして 100 mL とした。

#### 3) 試料溶液の調製

試料溶液の調製は n=3 で行った。

被験物質投与検体(50 mg/mL)を 1 mL 採取し、アセトニトリルを加えて 50 mL とした。この液 1 mL を採り、アセトニトリルを加えて、100 mL とした(10  $\mu$ g/mL)。

被験物質投与検体(25 mg/mL)を 1 mL 採り、アセトニトリルを加えて 50 mL とした。この液 1 mL を採り、アセトニトリルを加えて 50 mL とした(10  $\mu$ g/mL)。

被験物質投与検体(12.5 mg/mL)を 1 mL 採り、アセトニトリルを加えて 50 mL とした。この液 1 mL を採り、アセトニトリルを加えて 25 mL とした(10  $\mu$ g/mL)。

各被験物質投与検体から得られた 10  $\mu$ g/mL の溶液 5 mL に、IS 溶液 1 mL をそれぞれ加え、アセトニトリルで 10 mL とし(50 mg/mL は 10000 倍希釈、25 mg/mL は 5000 倍希釈、12.5 mg/mL は 2500 倍希釈)、試料溶液(最終濃度は、いずれも 5  $\mu$ g/mL)とした。

#### 4) GC 測定条件

装置: 水素炎イオン化検出器(FID)付ガスクロマトグラフ(GC-17A、島津製作所)、オートインジェクタ(AOC-20i、島津製作所)、データ処理装置(C-R7A、島津製作所)

カラム: ZB-1(100% Methyl polysiloxane、0.53 mm i.d.×30 m、df=1.50  $\mu$ m、Phenomenex)

検出器: FID[水素 60 kPa、空気 50 kPa、メイクアップガス(ヘリウム)80 kPa]

キャリアガス：ヘリウム(25 kPa)

カラム温度：80°C→290°C(30°C/min)、1 min

注入口温度：300°C

検出器温度：320°C

注入量：1.0  $\mu$ L(スプリットレス注入、サンプリング時間 1分)

洗浄溶媒：アセトニトリル

システムの適合性

測定開始前に標準溶液(10.07  $\mu$ g/mL)を3回測定し、被験物質の保持時間およびISのピーク面積に対する被験物質のピーク面積比の変動係数(%)をそれぞれ確認した。判定基準は保持時間が $\pm 3\%$ 以内、ISに対する被験物質のピーク面積比が $\pm 5\%$ 以内とした。

#### 5) 検量線の作成および試料溶液中被験物質濃度の測定

本被験物質は cis-、trans- 混合物であることからクロマトグラム上には 2 本のピークが検出されるが、試料溶液中濃度の測定においては主ピークを対象とした。

標準溶液(2.014、5.035 および 10.07  $\mu$ g/mL)を上記 GC 測定条件で測定(各濃度 3 回)し、得られた IS に対する被験物質の主ピークの面積比と標準溶液の調製濃度を基に、最小二乗法により検量線を作成し、検量線回帰式を求めた。

同様に試料溶液(n=3)を測定(各 1 回)し、得られた IS に対する被験物質の主ピークの面積比を検量線回帰式に代入して試料溶液中濃度を算出した。

検量線の作成(検量線回帰式の算出を含む)および試料溶液中濃度の算出は、データ処理装置の定量計算機能を使用した。なお、試料溶液中濃度は有効数字 5 桁目を切り捨て、有効数字 4 桁目まで求め、その後の計算に用いた。

陽性対照物質の CP については、秤量後、日局生理食塩液(製造番号:K9A95、大塚製薬工場)に溶解して、5 mg/mL 溶液を調製して使用した。調製は用時に行った。

#### 6. 投与方法

陰性対照物質と被験物質の投与経路および投与回数は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に基づき強制経口投与とし、注射筒およびマウス用胃管を用いて 1 日 1 回、2 日間(24 時間間隔)連続して行った。陽性対照物質は、注射筒およびマウス用胃管を用いて単回強制経口投与した。投与は、いずれも 10 時～11 時の間に行った。投与容量は 10 mL/kg とし、初回投与の直前に測定した体重に基づいて個別に投与液量を算出した。初回投与時の体重範囲は、毒性予備試験では雄:32.5～37.4 g、雌:23.7～29.5 g、小核本試験では雄:31.3～37.8 g であった。

## 7. 試験操作、観察と解析

## 1) 毒性予備試験

## ①試験群の設定

毒性予備試験においては、雌雄のマウスを用いて 250、500、1000 および 2000 mg/kg/day の被験物質投与群を設け、各群とも雌雄各 3 匹の動物に投与した。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号	
			雄	雌
250 mg/kg/day 投与群	10	2	T1~T3	T13~T15
500 mg/kg/day 投与群	10	2	T4~T6	T16~T18
1000 mg/kg/day 投与群	10	2	T7~T9	T19~T21
2000 mg/kg/day 投与群	10	1*	T10~T12	T22~T24

\*初回投与後に全例が死亡あるいは瀕死状態となったため、投与回数は 1 回となった。

## ②一般状態の観察

動物の生死および一般状態の観察は、各投与の直後、約 6 時間後および 22~24 時間後に行った。

## 2) 小核本試験

## ①試験群の設定

毒性予備試験の結果に基づき、雄マウスを用いて 125、250 および 500 mg/kg/day の被験物質投与群に陰性対照群(媒体:10 mL/kg/day)および陽性対照群(CP:50 mg/kg)を加えた 5 群構成とし、各群 5 匹の動物に投与した。なお、陽性対照物質の CP は、ICR 系雄マウスに 50 mg/kg の用量を単回強制経口投与した場合、投与の 24 時間後に小核を有する幼若赤血球の出現頻度が有意に増加することが、秦野研究所で確認されている。

各群の投与容量、投与回数および動物番号を以下に示す。

群	投与容量 (mL/kg/day)	投与回数	動物番号
陰性対照群(日局注射用水)	10	2	1~5
125 mg/kg/day 投与群	10	2	6~10
250 mg/kg/day 投与群	10	2	11~15
500 mg/kg/day 投与群	10	2	16~20
陽性対照群(CP:50 mg/kg)	10	1	21~25



## ②一般状態の観察

動物の生死および一般状態の観察は、各投与の直後、約 6 時間後および 22～24 時間後に行った。

## ③骨髓塗抹標本の作製

骨髓塗抹標本の作製は、Hayashi らの報告<sup>1)</sup>に従って最終投与の約 24 時間後に行った。頸椎脱臼法によりマウスを安楽死させ、両側の大腿骨を摘出した後、その両端を切断して 0.6 mL のウシ胎児血清 (ロット番号: 378712、Invitrogen) で骨髓細胞を遠心管に洗い出し、 $200 \times g$  で 5 分間遠心分離した。上清を除いた後、遠心管に残った少量の血清で沈渣を再懸濁させ、骨髓細胞浮遊液を作製した。塗抹標本は各個体につき 3 枚作製し、自然乾燥後、メタノールで 5 分間固定した。各塗抹標本は、フロスト部分に試験番号、動物番号およびスライド番号を記入して識別し、メタノール固定後の塗抹標本には、コード番号表に従って、試験番号、コード番号およびスライド番号を記したラベルを貼付してコード化し、標本観察時まで室温で保管した。

## ④骨髓塗抹標本のアクリジンオレンジ(AO)蛍光染色および標本観察

ゼーレンゼンの 1/15 mol/L リン酸緩衝液に溶解した 40  $\mu\text{g/mL}$  の AO 溶液を標本観察の直前に骨髓塗抹標本に数滴滴下してカバーガラスをかけ、510 nm の吸収フィルターが装着されたブルー励起の蛍光顕微鏡下で、100 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズを用いて観察した。骨髓塗抹標本は、各個体について 2 名の観察者により 1 匹あたり 2000 個 (1 名あたり 1000 個) の幼若赤血球を観察し、そのうち小核を有する幼若赤血球の数を記録した。また、骨髓細胞 (赤血球) の増殖抑制の指標として、1 匹あたり 1000 個 (1 名あたり 500 個) の赤血球を観察して、幼若赤血球の数を記録した。

## ⑤統計解析

### A. 小核出現頻度

陰性対照群と陽性対照群の小核出現頻度 (平均値) が、背景データのばらつきの範囲 (平均値  $\pm 3 \times$  標準偏差) 内にあるか否かを調べた。なお、背景データは、秦野研究所で 2006 年度から 2008 年度に実施した小核試験の陰性対照値および陽性対照値とした。

小核出現頻度については、陰性対照群と各被験物質投与群および陽性対照群の間で、Fisher の正確確率検定法 (片側検定) を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して Bonferroni の補正<sup>2)</sup>を行い、有意水準は 5% および 1% とした。また、小核出現頻度の用量 (対数値) 依存性については、Cochran-Armitage の傾向検定<sup>3)</sup> (片側検定) を行い、有意水準は 5% および 1% とした。

### B. 赤血球中に占める幼若赤血球の比率

赤血球中に占める幼若赤血球の比率については、まず Bartlett 検定<sup>4)</sup>により陽性対照群を除く各群の分散の一様性について検定を行った。その結果、等分散であったことから、Dunnnett 検定<sup>5)</sup> (両側検定) を用いて陰性対照群と各被験物質投与群との平均値の差の検定を行った。陰性対照群と陽性対照群と

の比較については、F 検定<sup>4)</sup>により 2 群の分散の一様性について検定を行い、等分散であったことから Student の *t* 検定<sup>4)</sup> (両側検定)を行った。Bartlett 検定および F 検定の有意水準は 5%とし、Dunnett 検定および Student の *t* 検定の有意水準はいずれも 5%および 1%とした。

被験物質が骨髄細胞の増殖へ影響を及ぼすか否かは、幼若赤血球の比率に関する統計解析の結果を基に、用量反応性および陰性対照群の背景データ等を参考にして判断した。

## ⑥判定

被験物質が生体内において染色体異常誘発作用を示すか否かの判定は、統計解析の結果を基に、用量反応性および陰性対照群の背景データ、骨髄細胞増殖への影響等を参考にして総合的に行った。

## 試験成績と考察

### 1. 毒性予備試験

毒性予備試験における一般状態および死亡率を Table 1 に示す。500 mg/kg/day 投与群では雄の全例に自発運動低下が観察され、うち 1 例には立毛および流涙も併せて観察された。1000 mg/kg/day 投与群では初回投与の 22~24 時間後から自発運動の低下、立毛、よろめき歩行がみられ、2 回目の投与後には体表温低下、腹臥位姿勢、流涙等も併発し、雄の全例および雌の 1 例が死亡した。2000 mg/kg/day 投与群では初回投与の 6 時間後までに自発運動低下、横臥位姿勢、呼吸数の減少といった重篤な毒性症状を伴い雌雄各 1 例が死亡し、残りの動物も回復不可能な瀕死状態と判断したため、頸椎脱臼により安楽死させた。

以上の結果から、雌雄とも最大耐量は 500 mg/kg/day であり、1000 mg/kg 以上の投与群で毒性に明らかな性差は認められなかったことから、小核本試験では雄を用い、500 mg/kg/day を高用量に設定した。なお、500 mg/kg/day 投与群では雄のみに症状が観察されたが、被験物質の安全性評価に大きく影響を与える性差ではないと判断した。

### 2. 小核本試験

小核本試験における一般状態および死亡率を Table 2 に示す。500 mg/kg/day 投与群の 1 例に自発運動低下および立毛がみられたが、その他の動物に一般状態の変化は観察されず、死亡例はなかった。

小核出現頻度および赤血球中に占める幼若赤血球の比率を Table 3 に示す。陰性対照群および陽性対照群の小核出現頻度(平均値)は、いずれも秦野研究所の背景データ(Appendix 4)のばらつきの範囲(平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差)内であった。

被験物質投与群の小核出現頻度は、いずれの用量においても陰性対照群と比較して有意な増加は認められず、用量に依存して有意に増加する傾向もみられなかった。一方、CP を投与した陽性対照群では、1%水準で有意な小核出現頻度の増加が確認され、本試験系の妥当性が確認された。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、陰性対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められず、被験物質投与による骨髓細胞(赤血球)の増殖抑制作用はないと判断した。なお、CP を投与した陽性対照群では、赤血球中に占める幼若赤血球の比率の有意な増加が 5%水準で認められたが、背景データの範囲内であった。

本被験物質に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験[試験番号:B041799、三菱化学安全科学研究所(現 三菱化学メディエンス)]では陰性、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[試験番号:B041800、三菱化学安全科学研究所(現 三菱化学メディエンス)]では陽性の結果が報告されているが、今回行った試験条件下では、被験物質投与による小核誘発性は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下では、1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンはマウス骨髓細胞において染色体異常誘発作用を示さないもの(陰性)と結論する。

参考文献

- 1) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T.: In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat. Res.* 312: 293-304 (1994)
- 2) Margolin, B. H., Resnick, M. A., Rimpo, J. Y., Archer, P., Galloway, S. M., Bloom, A. D., Zeiger, E.: Statistical analyses for in vitro cytogenetic assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mutagen.* 8: 183-204 (1986)
- 3) Margolin, B. H., Risko, K. J.: In "Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens" Ashby, J. et al. eds., Cambridge Univ. Press (1988), vol.1. pp. 29-42
- 4) Snedecor, G. W., Cochran, W. G.: In "Statistical Methods" 7th ed., Iowa State University Press, Iowa (1980)
- 5) Dunnett, C. W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121 (1955)

Table 1 General condition and mortality in CD1(ICR) mice after double oral administrations of 1,3-BAC in the preliminary toxicity test

Sex	Dose (mg/kg/day)	Number of mice administered	General condition	Number of mice						Mortality
				Hours after the 1st administration			Hours after the 2nd administration			
				0	6	22-24	0	6	22-24	
Male	250	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3
	500	3	No abnormality	3	3	3	3	2	0	0 / 3
			Decrease in locomotor activity	0	0	0	0	1	3	
			Piloerection	0	0	0	0	1	1	
			Lacrimation	0	0	0	0	1	1	
	1000	3	No abnormality	3	3	1	1	0	0	3 / 3
			Decrease in locomotor activity	0	0	2	2	0	0	
			Piloerection	0	0	2	2	1	0	
			Staggering gait	0	0	1	1	0	0	
			Subnormal temperature	0	0	0	0	2	0	
Prone position			0	0	0	0	2	0		
Lacrimation			0	0	0	0	2	0		
Death			0	0	0	0	1	2		
2000	3	Decrease in locomotor activity	3	0	-	-	-	-	3 / 3	
		Side position	0	2	-	-	-	-		
		Decreased respiration	0	2	-	-	-	-		
		Subnormal temperature	0	2	-	-	-	-		
		Moribund condition	0	2	-	-	-	-		
Death	0	1	-	-	-	-				
250	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3	
500	3	No abnormality	3	3	3	3	3	3	0 / 3	
Female	1000	3	No abnormality	3	3	2	2	0	0	1 / 3
			Decrease in locomotor activity	0	0	1	0	2	1	
			Piloerection	0	0	1	1	0	1	
			Staggering gait	0	0	1	0	0	0	
			Subnormal temperature	0	0	0	1	0	1	
			Eyelid closure	0	0	0	1	0	0	
			Prone position	0	0	0	1	0	1	
			Lacrimation	0	0	0	0	2	1	
			Death	0	0	0	0	1	0	
			2000	3	No abnormality	1	0	-	-	
Decrease in locomotor activity	2	0			-	-	-	-		
Side position	0	2			-	-	-	-		
Decreased respiration	0	2			-	-	-	-		
Subnormal temperature	0	2			-	-	-	-		
Moribund condition	0	2			-	-	-	-		
Death	0	1			-	-	-	-		

1,3-BAC, 1,3-Bis(aminomethyl)cyclohexane (Mixture of cis-, trans-)

Table 2 General condition and mortality in male CD1(ICR) mice after double oral administrations of 1,3-BAC in the micronucleus test

Dose	Number of mice administered	General condition	Number of mice						Mortality	
			Hours after the 1st administration			Hours after the 2nd administration				
			0	6	22-24	0	6	22-24		
Negative control Water for injection JP 10 mL/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	0 / 5
1,3-BAC 125 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	0 / 5
1,3-BAC 250 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	0 / 5
1,3-BAC 500 mg/kg/day	5	No abnormality	5	5	4	4	4	5	0 / 5	
		Decrease in locomotor activity	0	0	1	1	1	0		
		Piloerection	0	0	1	1	1	0		
Positive control CP 50 mg/kg	5	No abnormality	5	5	5	-	-	-	0 / 5	

1,3-BAC, 1,3-Bis(aminomethyl)cyclohexane (Mixture of cis-, trans-)  
CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)

Table 3 Results of micronucleus test in male CD1(ICR) mice after double oral administrations of 1,3-BAC

Group	Animal No.	% of MNPCEs <sup>a</sup>	% of PCEs in ERYs <sup>b</sup>
Negative control Water for injection JP 10 mL/kg/day	1	0.15	60.6
	2	0.15	52.6
	3	0.10	54.9
	4	0.20	53.1
	5	0.05	51.4
	Total	13 / 10000	2726 / 5000
	Mean ± S.D. Min. - Max.	0.13 ± 0.06 0.05 - 0.20	54.5 ± 3.6 51.4 - 60.6
1,3-BAC 125 mg/kg/day	6	0.05	62.6
	7	0.15	57.7
	8	0.00	60.7
	9	0.30	59.3
	10	0.00	57.5
	Total	10 / 10000	2978 / 5000
	Mean ± S.D. Min. - Max.	0.10 ± 0.13 0.00 - 0.30	59.6 ± 2.1 57.5 - 62.6
1,3-BAC 250 mg/kg/day	11	0.10	55.8
	12	0.00	57.4
	13	0.10	56.3
	14	0.05	45.6
	15	0.00	63.6
	Total	5 / 10000	2787 / 5000
	Mean ± S.D. Min. - Max.	0.05 ± 0.05 0.00 - 0.10	55.7 ± 6.5 45.6 - 63.6
1,3-BAC 500 mg/kg/day	16	0.00	58.8
	17	0.15	36.5
	18	0.10	56.0
	19	0.10	50.8
	20	0.05	54.0
	Total	8 / 10000	2561 / 5000
	Mean ± S.D. Min. - Max.	0.08 ± 0.06 0.00 - 0.15	51.2 ± 8.7 36.5 - 58.8
Positive control CP 50 mg/kg	21	1.95	63.6
	22	2.95	60.0
	23	2.70	59.3
	24	2.30	62.4
	25	1.75	55.7
	Total	233 / 10000 **	3010 / 5000
	Mean ± S.D. Min. - Max.	2.33 ± 0.50 1.75 - 2.95	60.2 ± 3.1 # 55.7 - 63.6

a, % of micronucleated polychromatic erythrocytes in polychromatic erythrocytes observed

b, % of polychromatic erythrocytes in erythrocytes observed

1,3-BAC, 1,3-Bis(aminomethyl)cyclohexane (Mixture of cis-, trans-)

CP, Cyclophosphamide monohydrate (single oral administration)

\*\*, Significantly higher than the negative control at 1% level (Fisher's exact probability test)

#, Significantly different from the negative control at 5% level (Student's *t*-test)