

3-メトキシベンゼナミン の
マウスを用いる
小核試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野 研 究 所

目 次

要 約	1
緒 言	3
実験材料	4
1. 実験動物と飼育条件	4
2. 被験物質	4
毒性予備試験（投与量の決定）	5
1. 方 法	5
2. 結 果	6
小核予備試験（標本作製時期の決定）	7
1. 方 法	7
2. 結 果	9
小核本試験	9
1. 方 法	9
2. 結果および考察	12
結 論	13
特記事項	13
文 献	14

Tables 1 ~ 8

【要 約】

被験物質 3-メトキシベンゼナミン (MBA) の生体内における細胞遺伝学的影響を評価するために、Crj: BDF₁ 雄および雌マウスを用いる強制経口投与による小核試験を実施した。結果は以下のように要約される。

1. 毒性予備試験

MBAの毒性予備試験を行った結果、Crj: BDF₁ 雄および雌マウスにおける最大耐量は、それぞれ 1000 mg/kg および 600 mg/kg であった。そこで、小核予備試験および小核本試験におけるMBAの高用量を雄は 1000 mg/kg とし、雌は 600 mg/kg とした。

2. 小核予備試験

MBAの 1000 mg/kg を雄に、600 mg/kg を雌に投与し、小核予備試験を実施したところ、雄マウスに死亡が認められた。そこで新たに雄マウスには 800 mg/kg を投与し、投与後24、48、72時間目に骨髓の塗抹標本作製した。標本観察の結果、小核出現頻度（小核を有する多染性赤血球の割合）は、雄では72時間群において最高値を示し、有意差検定の結果、24時間群に比べ、72時間群の小核出現頻度が5%水準で有意に高かった。一方、雌では小核出現頻度の経時的変化は明らかではなかった。網赤血球の比率を指標とした骨髓細胞の増殖抑制は、雄雌ともに認められなかった。これらの結果から、小核本試験での標本作製時期（投与から標本作製までの時間）を雄は投与後72時間、雌は投与後24時間に決定した。

3. 小核本試験

雄マウスにはMBAの 200、400 および 800 mg/kg を投与し、投与後72時間

目に骨髓の塗抹標本を作製し、一方、雌マウスにはMBAの150、300および600 mg/kg を投与し、投与後24時間目に骨髓の塗抹標本を作製した。標本観察の結果、雄はMBAの800 mg/kg 投与群における小核出現頻度が溶媒対照群と比較して有意に増加したが、雌においてはいずれの検体投与群とも有意な増加は観察されなかった。赤血球中に占める網赤血球の比率は、雄雌ともにMBAのいずれの投与群においても、顕著な低下を示さなかった。

4. 結論

以上の結果から、MBAは、本試験条件下で、BDF₁雄マウスにおいて800 mg/kg の投与により、骨髓細胞に、染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示すが、雌マウスでは600 mg/kg 以下の投与により、骨髓細胞にこれらの作用を示さないと結論した。また、骨髓細胞の増殖抑制作用は雄雌ともに示さないと結論した。

【緒 言】

高生産量既存化学物質で、現在十分な安全性資料のない3-メトキシベンゼナミンについて、OECDを中心として行われている国際協力による安全性点検事業の一環として、生体内における細胞遺伝学的影響を調べるために、雄および雌マウスを用いて骨髄細胞における小核試験を実施した。まず、小核本試験に用いる投与量を決定するために毒性予備試験を行って最大耐量を求め、次に本試験における標本作製時期を決定するために小核予備試験を行い、それらの結果に基づいて小核本試験を行った。本試験は「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：474に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【実験材料】

1. 実験動物と飼育条件

実験には、日本チャールス・リバー (CRJ) から購入した8週齢の Crj: BDF₁ (C57BL/6 と DBA/2 の近交系間F₁) 雄および雌マウスを、1週間以上予備飼育した後、異常の認められなかった動物を9~10週齢で試験に供した。入荷日とその匹数は以下の通りである。

試験	入荷日	入荷匹数
毒性予備試験	1991年11月27日	雄雌各 52 匹
小核予備試験	1991年12月4日	雄雌各 31 匹
小核本試験	1992年1月13日	雄雌各 42 匹

動物は、床敷としてホワイト・フレーク (CRJ) を入れた TPX樹脂製ケージ (143×293×148mm, CRJ) に1匹ずつ収容し、バリアーシステムの飼育室 (設定室温: 23±1℃、設定湿度: 55±5%、換気回数: 約15回/時間、明暗サイクル: 午前7時点灯、午後7時消灯) で、マウス繁殖用固型飼料 (NMF, オリエンタル酵母工業) と水道水を自由に摂取させて飼育した。動物の群分けは無作為抽出により行った。個体識別はマウスの尾にフェルトペンでマークし、ケージには群ごとに色の異なるカードに、群および動物番号を記載して個体識別の補助とした。

2. 被験物質

(名 称) 3-メトキシベンゼナミン

(3-Methoxybenzenamine)

(CAS No.) 536-90-3

(別 名) m-Anisidine, 3-Aminoanisole, 3-Methoxyaniline

(ロット番号)

(分子式) C₇H₉NO

(分 子 量) 123.17
(性 状) 淡黄色液体、水にやや難溶、酸およびアルコールに可溶
沸点 251℃、融点 -1～1℃
(比 重) 1.10
(純 度) 98%以上
(提 供 者)
(入 手 年 月 日) 1991年7月12日
(保 管 条 件) 室温遮光

【毒性予備試験（投与量の決定）】

1. 方法

1) 実験群の設定

小核試験に用いる被験物質3-メトキシベンゼナミン (MBA) の投与量を決定するため、雄雌ともに各5匹ずつからなる8群を設け、投与量をそれぞれ、0 (溶媒対照：(局) オリーブ油(和光純薬工業、ロット番号：LKH 5632))、100、200、400、600、800、1000 および 1500 mg/kg とした。

2) 検体の調製と投与方法

検体の投与容量はマウスの体重 kg 当たり 10 ml とした。最高用量の投与検体はMBAの所要量を正確に採取し、(局) オリーブ油に懸濁して調製した。それ以下の用量については、最高用量の調製液をオリーブ油で希釈して所定の濃度に調製した。また、投与検体はすべて用時調製とした。

投与は強制経口投与とした。投与は、雄雌ともに1991年12月4日に行い、投与

時体重範囲は雄で24~29 g、雌で19~22 gであった。

3) 死亡率、一般状態の観察および体重測定

投与当日を0日として4日間にわたり毎日一般状態を観察し、死亡の有無を調べた(1991年12月4~7日)。また、マウスの体重を投与時と3日目の観察終了時に測定した。

2. 結果

1) 死亡率、一般状態および体重推移

溶媒のみを投与した群では、雄雌ともに一般状態に変化は見られず、体重もわずかに増加した。一方、MBAを投与した群では、雄で600 mg/kg、雌で800 mg/kg以上の投与群で自発運動の低下が認められ、用量の増加とともに、伏臥、体表温低下などの毒性徴候が現れた。死亡例は、雄は1500 mg/kg投与群で認められ、雌では800 mg/kgおよび1500 mg/kg投与群で認められた(Table 1, 2)。生存個体においては、雄雌ともに600 mg/kg以上の投与群で明らかな体重の減少が認められた(Table 3, 4)。以上の結果から、MBAの単回強制経口投与によるBDF₁雄および雌マウスの最大耐量は、それぞれ1000および600 mg/kgであると結論された。

2) 小核試験に用いる投与量

小核予備試験および小核本試験に用いる被験物質MBAの高用量を、雄は1000 mg/kgとし、雌は600 mg/kgに決定した。また、これをもとにして、公比2で減じ、雄では中用量を500 mg/kg、さらに低用量を250 mg/kgとし、雌では中用量を300 mg/kg、さらに低用量を150 mg/kgにそれぞれ決定した。

【小核予備試験（標本作製時期の決定）】

1. 方法

1) 実験群の設定

本試験における適切な標本作製時期を決定するために、雄雌ともに各5匹ずつからなる3群（24時間群、48時間群、72時間群）を設けた。MBAの投与量は雄および雌マウスにおいて、それぞれ高用量の1000 mg/kg および600 mg/kg とした。しかし、MBAの1000 mg/kg を投与した雄マウスにおいて、15匹中2匹が投与後1日目に死亡したため、用量を800 mg/kg とする雄マウスの各5匹からなる3群（24時間群、48時間群、72時間群）を新たに設けた。

2) 検体の調製と投与方法

検体の調製と投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。投与は、雄は1991年12月17日に行い、雌は同年12月16日に行った。投与时体重範囲は、雄で24～29 g、雌で20～22 gであった。

3) 標本の作製

小核の観察のための標本を、Schmid の方法^{1, 2)}に従って作製した。すなわち、投与後所定の時間に頸椎脱臼法によりマウスを致死させて左右の大腿骨を摘出した。その両骨端を切断して、骨髓細胞を0.6 mlのウシ胎児血清（Hazleton, ロット番号:12103343）で洗い出し、遠沈管に集め、1000 rpm で5分間遠心分離して、上清を除いた。沈渣をピペティング後、細胞浮遊液の一部をスライドグラス上に塗抹（各個体につき2枚の標本）し、一夜、室温で風乾した。乾燥した骨髓標本は5分間メタノールで固定し、ギムザ染色（pH 6.8 のリン酸緩衝液で5%に希釈したギムザ液（Merck, Art.9204、ロット番号：86502722）で25分間）を行った

後、pH 6.8 のリン酸緩衝液、0.004%クエン酸水溶液および蒸留水で順次すすぎ、風乾した。

また、網赤血球 (reticulocytes) の観察のためにニューメチレンブルーによる超生体染色を行った。すなわち、上記操作で遠沈管に残った細胞浮遊液に同量のニューメチレンブルー液 (ニューメチレンブルー 0.5 g とシュウ酸カリウム 1.6 g を 100 ml の蒸留水に溶かしたもの) を加え約 3 分間染色した。次に、小核の標本作製の場合と同様にスライドガラス上に塗抹 (各個体につき 2 枚の標本) し、一夜風乾後メタノールで固定し、上記ギムザ液で 25 分間染色し、pH 6.8 のリン酸緩衝液および蒸留水で順次すすぎ、風乾した。標本の作製は雄マウスは 1991 年 12 月 18~20 日に、雌マウスは同年 12 月 17~19 日に、染色はともに同年 12 月 21 日に行った。

4) 小核の観察

作製したそれぞれの骨髄標本に暗番号を記し、雄雌それぞれについて、2 名の観察者によりブラインド法で観察した。1 個体あたり 2000 個の多染性赤血球 (polychromatic erythrocytes) を観察し、その中の小核を有するものの数を記録した。

また赤血球を 1 個体あたり 1000 個観察し、そのなかの網赤血球の比率を調べて、骨髄細胞の増殖抑制の指標とした。

5) 有意差検定

雄雌それぞれの小核出現頻度について、Kastenbaum and Bowman (1970) の表³⁾により、24 時間群と他の群との間で 5% 水準で有意差検定を行った。くり返し検定に伴う多重性は考慮しなかった。

2. 結果

雄および雌の小核予備試験の結果を、それぞれ Table 5 および 6 に示す。小核出現頻度は、雄では72時間群、雌では48時間群に最高値を示した。有意差検定の結果、雄では72時間群の小核出現頻度が、24時間群と比較して5%水準で有意に高かったが、雌では24時間群と他の時間群との間に有意差は認められなかった。網赤血球の比率を指標とした骨髓細胞の増殖抑制は、すべての時間群の雄雌ともに認められなかった。以上の結果から、小核本試験における標本作製時期は、雄は投与後72時間、雌は24時間に決定した。

【小核本試験】

1. 方法

1) 実験群の設定

毒性予備試験の結果に基づき、雄雌ともに各5匹ずつからなる5群を以下のように設けた。また、高用量群に死亡が見られた場合の予備個体として、雄および雌にMBAの800 mg/kg および 600 mg/kg をそれぞれ別の2匹に投与した。

雄

- 1) 溶媒対照群 (オリーブ油)
- 2) MBA 200 mg/kg 投与群
- 3) MBA 400 mg/kg 投与群
- 4) MBA 800 mg/kg 投与群
- 5) 陽性対照群 (cyclophosphamide, CPA : 50 mg/kg) *

雌

- 1) 溶媒対照群 (オリーブ油)
- 2) M B A 150 mg/kg 投与群
- 3) M B A 300 mg/kg 投与群
- 4) M B A 600 mg/kg 投与群
- 5) 陽性対照群 (cyclophosphamide, C P A : 50 mg/kg) *

* : 当研究室で、本用量の C P A の強制経口投与により小核が有意に誘発されることが認められている。

2) 検体の調製と投与方法

投与検体の調製および投与方法は毒性予備試験の場合と同様に行った。また、陽性対照物質 (C P A, Sigma Chemical、ロット番号 : 67F-0155) は、局方生理食塩液 (小林製薬工業、ロット番号 : 19A03) に溶解して所定の濃度に調製した。投与は、雄雌ともに1992年1月20日に行い、投与時体重範囲は、雄で24~28 g、雌で19~21 gであった。

なお、1992年2月14~21日に当研究所において、調製検体の室温における安定性試験を実施した。すなわち、M B Aを(局)オリーブ油に懸濁して 15 mg/ml 溶液 (投与容量をマウスの体重 kg 当たり 10 ml とした場合に 150 mg/kg に相当) および 80 mg/ml 溶液 (同 800 mg/kg に相当) を調製し、分析化学研究室で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、調製直後および7日後の含量を測定した。その結果、両調製検体の調製7日後の平均含量比は調製時のそれぞれ 99.5 および 109%であった (Appendix 1)。したがって、小核本試験で用いた濃度範囲における調製検体は、室温で調製後7日間安定であることが確認された。

また、小核本試験における、高用量群および低用量群の投与検体について、HPLCを用いて均一性・含量分析を行った。その結果、被験物質の平均含量は添加

量の 115~131%と高い値を示した (Appendix 2)。この結果に関しては、含量分析用に調製検体を採取する際、溶媒に用いたオリーブ油がピペットの周囲に付着し、洗い込みなどによって分析検体に混入し、その結果、分析値が高い値を示した可能性が考えられた。そこで再度、同様に検体を調製し、混入を避けて採取をし、含量分析試験を同年1月29日および2月6日に実施した。その結果、被験物質の平均含量は添加量の 98.6~109%の範囲にあり、サンプル間のばらつきは平均値の 6%以内であった (Appendixes 3、4)。これらの値は当研究所の標準操作手順書の基準 (懸濁液検体の平均含量は添加量の85%以上、検体測定値のばらつきは、それらの平均値±10%以内) を満たしていた。

3) 標本の作製方法および小核の観察

標本の作製および小核の観察は、小核予備試験の場合と同様に行った。ただし標本の作製時期は小核予備試験の結果に基づき、雄は投与後72時間 (1992年1月23日) に、雌は投与後24時間 (同年1月21日) に行った。陽性対照群については、試験計画書の記載に従って、雄雌ともに投与後24時間 (同年1月21日) に行った。染色は同年1月24日に行った。

4) 有意差検定

小核出現頻度について、Kastenbaum and Bowman の表により、雄雌につきそれぞれ溶媒対照群と、MBAの各検体投与群および陽性対照群との間で5%水準で有意差検定を行った。くり返し検定に伴う多重性は考慮しなかった。更に、小核出現頻度の用量 (対数值) 依存性について、Cochran-Armitage の傾向検定^{4, 5)}を5%水準で行った。

また、赤血球中に占める網赤血球の比率について、雄雌につきそれぞれ溶媒対照群と、MBAの各投与群および陽性対照群との間で5%水準でt検定を行った。

くり返し検定に伴う多重性は考慮しなかった。

2. 結果および考察

雄および雌の小核本試験の結果を、それぞれ Table 7 および 8 に示す。小核出現頻度は、雄については Kastenbaum and Bowman の表を用いた 5% 水準の有意差検定の結果、MBA の 800 mg/kg 投与群の値が、溶媒対照群より有意に高かったが、Cochran-Armitage の傾向検定の結果は、MBA の用量に依存した、有意な増加傾向を示さなかった。しかし、小核予備試験の 72 時間群と小核本試験の 800 mg/kg 投与群の値は、ともに当研究所が過去 5 年間に 52 回実施した、BDF₁ 雄マウスを用いた小核試験の溶媒対照群の値の変動範囲 (0.04~0.23%) をはるかに越えていた。さらに、これらの値については、Kastenbaum and Bowman の表による検定を 1% 水準で行った結果でも、ともに有意差が認められた。したがって、MBA はこの用量で、雄マウスの骨髓細胞において、小核を誘発するものと考えられる。雌の小核出現頻度については、Kastenbaum and Bowman の表を用いた検定および Cochran-Armitage の傾向検定を行った結果、いずれにおいても有意差は認められなかった。一方、CPA を 50 mg/kg 投与した陽性対照群での小核出現頻度は雄雌ともに 5% 水準で有意な増加がみられた。

赤血球中に占める網赤血球の比率は、雄雌ともに、MBA のいずれの投与群においても溶媒対照群との間に有意差は認められなかった。

【結 論】

以上の結果から、MBAは、本試験条件下で、BDF₁雄マウスにおいて 800 mg/kg の投与により、骨髄細胞に染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示すが、雌マウスでは 600 mg/kg 以下の投与により、骨髄細胞にこれらの作用を示さないと結論した。また、骨髄細胞の増殖抑制作用は雄雌ともに示さないと結論した。

【特 記 事 項】

全試験期間を通して、試験の信頼性に悪影響を及ぼす疑いのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱は認められなかった。

【文 献】

- 1) Schmid, W. : The micronucleus test. Mutation Res. 31 : 9-15
(1975)
- 2) Schmid, W. : The micronucleus test for cytogenetic analysis. in
"Chemical Mutagens" Hollaender, A. ed., Plenum Press, N.Y.-London
(1976), vol. 4. pp. 31-53.
- 3) Kastenbaum, M.A. and Bowman, K.O. : Tables for detecting the
statistical significance of mutation frequencies. Mutation Res.
9 : 527-549 (1970)
- 4) Cochran, W.G. : Some methods for strengthening the common χ^2
tests. Biometrics 10: 417-451 (1954)
- 5) Armitage, P. : Test for linear trends in proportions and frequen-
cies. Biometrics 11: 375-386 (1955)

Table 1. Mortality of BDF₁ male mice after single administration of 3-methoxybenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice administered	Number of mice died			Mortality	
		Days after administration				
		0	1	2	3	
0	5	0	0	0	0	0 / 5
100	5	0	0	0	0	0 / 5
200	5	0	0	0	0	0 / 5
400	5	0	0	0	0	0 / 5
600	5	0	0	0	0	0 / 5
800	5	0	0	0	0	0 / 5
1000	5	0	0	0	0	0 / 5
1500	5	0	4	1	---	5 / 5

Table 2. Mortality of BDF₁ female mice after single administration of 3-methoxybenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice administered	Number of mice died			Mortality	
		Days after administration				
		0	1	2		3
0	5	0	0	0	0	0 / 5
100	5	0	0	0	0	0 / 5
200	5	0	0	0	0	0 / 5
400	5	0	0	0	0	0 / 5
600	5	0	0	0	0	0 / 5
800	5	0	1	0	0	1 / 5
1000	5	0	0	0	0	0 / 5
1500	5	0	4	1	---	5 / 5

Table 3. Body weight change of BDF₁ male mice after single administration of 3-methoxybenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Body weight (g)		
	^a Initial	^a Final	^a Gain
0	25.7 ± 1.0 (5)	26.1 ± 1.0 (5)	0.4 ± 0.2 (5)
100	27.0 ± 1.3 (5)	27.1 ± 1.4 (5)	0.2 ± 0.5 (5)
200	26.1 ± 1.1 (5)	26.5 ± 1.3 (5)	0.4 ± 0.4 (5)
400	25.5 ± 0.8 (5)	25.8 ± 1.3 (5)	0.3 ± 0.6 (5)
600	25.6 ± 1.3 (5)	24.4 ± 2.4 (5)	-1.2 ± 1.7 (5)
800	25.6 ± 0.4 (5)	21.3 ± 0.6 (5)	-4.3 ± 0.4 (5)
1000	27.5 ± 0.9 (5)	21.9 ± 1.1 (5)	-5.6 ± 1.6 (5)
1500	26.0 ± 1.3 (5)	----- (0)	----- (0)

Gain: Increase in body weight during the observation period of 4 days

(): Numbers in parentheses indicate the number of mice weighed

a: Mean ± S.D.

Table 4. Body weight change of BDF₁ female mice after single administration of 3-methoxybenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Body weight (g)		
	^a Initial	^a Final	^a Gain
0	20.0 ± 1.0 (5)	20.5 ± 0.7 (5)	0.5 ± 0.8 (5)
100	20.4 ± 0.7 (5)	20.9 ± 0.9 (5)	0.4 ± 0.5 (5)
200	19.9 ± 0.3 (5)	20.5 ± 0.3 (5)	0.6 ± 0.4 (5)
400	20.5 ± 0.3 (5)	20.8 ± 0.5 (5)	0.3 ± 0.5 (5)
600	20.2 ± 0.6 (5)	19.6 ± 2.0 (5)	-0.6 ± 1.6 (5)
800	19.9 ± 0.6 (5)	17.2 ± 0.9 (4)	-2.7 ± 0.8 (4)
1000	19.8 ± 0.6 (5)	16.7 ± 1.4 (5)	-3.1 ± 1.5 (5)
1500	20.5 ± 0.8 (5)	----- (0)	----- (0)

Gain: Increase in body weight during the observation period of 4 days

(): Numbers in parentheses indicate the number of mice weighed

a: Mean ± S.D.

Table 5. Results of preliminary micronucleus test in BDF₁ male mice after single administration of 3-methoxybenzenamine (800 mg/kg) by gavage

Time after administration	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
24 hrs	1	527 / 1000		4 / 2000	
	2	477 / 1000		5 / 2000	
	3	430 / 1000		8 / 2000	
	4	458 / 1000		3 / 2000	
	5	490 / 1000		6 / 2000	
	Total	2382 / 5000		26 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(47.6 ± 3.6)		(0.26 ± 0.10)	
48 hrs	6	383 / 1000		10 / 2000	
	7	479 / 1000		8 / 2000	
	8	515 / 1000		1 / 2000	
	9	488 / 1000		3 / 2000	
	10	527 / 1000		4 / 2000	
	Total	2392 / 5000		26 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(47.8 ± 5.7)		(0.26 ± 0.19)	
72 hrs	11	597 / 1000		10 / 2000	
	12	465 / 1000		12 / 2000	
	13	472 / 1000		6 / 2000	
	14	609 / 1000		12 / 2000	
	15	587 / 1000		12 / 2000	
	Total	2730 / 5000		52 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(54.6 ± 7.1)		(0.52 ± 0.13)*	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

b: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

*: Data significantly different from 24-hour treatment group at 5 % level

Table 6. Results of preliminary micronucleus test in BDF₁ female mice after single administration of 3-methoxybenzenamine (600 mg/kg) by gavage

Time after administration	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
24 hrs	51	421 / 1000		4 / 2000	
	52	449 / 1000		4 / 2000	
	53	475 / 1000		3 / 2000	
	54	495 / 1000		1 / 2000	
	55	448 / 1000		3 / 2000	
	Total	2288 / 5000		15 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(45.8 ± 2.8)		(0.15 ± 0.06)	
48 hrs	56	558 / 1000		1 / 2000	
	57	503 / 1000		3 / 2000	
	58	526 / 1000		5 / 2000	
	59	493 / 1000		3 / 2000	
	60	489 / 1000		5 / 2000	
	Total	2569 / 5000		17 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(51.4 ± 2.9)		(0.17 ± 0.08)	
72 hrs	61	488 / 1000		1 / 2000	
	62	444 / 1000		1 / 2000	
	63	556 / 1000		2 / 2000	
	64	621 / 1000		1 / 2000	
	65	463 / 1000		2 / 2000	
	Total	2572 / 5000		7 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(51.4 ± 7.3)		(0.07 ± 0.03)	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

b: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

Table 7. Results of micronucleus test in BDF₁ male mice after single administration of 3-methoxybenzenamine by gavage

Group	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
Solvent control Olive oil	1	695 / 1000		6 / 2000	
	2	579 / 1000		7 / 2000	
	3	713 / 1000		6 / 2000	
	4	428 / 1000		2 / 2000	
	5	364 / 1000		2 / 2000	
	Total	2779 / 5000		23 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(55.6 ± 15.6)		(0.23 ± 0.12)	
MBA 200 mg/kg	6	586 / 1000		3 / 2000	
	7	652 / 1000		3 / 2000	
	8	443 / 1000		4 / 2000	
	9	572 / 1000		4 / 2000	
	10	483 / 1000		0 / 2000	
	Total	2736 / 5000		14 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(54.7 ± 8.4)		(0.14 ± 0.08)	
MBA 400 mg/kg	11	717 / 1000		3 / 2000	
	12	708 / 1000		0 / 2000	
	13	682 / 1000		1 / 2000	
	14	639 / 1000		3 / 2000	
	15	631 / 1000		2 / 2000	
	Total	3377 / 5000		9 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(67.5 ± 3.9)		(0.09 ± 0.07)	
MBA 800 mg/kg	16	591 / 1000		21 / 2000	
	17	612 / 1000		7 / 2000	
	18	402 / 1000		2 / 2000	
	19	503 / 1000		15 / 2000	
	20	511 / 1000		10 / 2000	
	Total	2619 / 5000		55 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(52.4 ± 8.3)		(0.55 ± 0.37)*	
Positive control CPA 50 mg/kg	21	223 / 1000		29 / 2000	
	22	316 / 1000		34 / 2000	
	23	608 / 1000		34 / 2000	
	24	483 / 1000		25 / 2000	
	25	412 / 1000		59 / 2000	
	Total	2042 / 5000		181 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(40.8 ± 14.9)		(1.81 ± 0.66)*	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

b: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

MBA: 3-Methoxy-benzenamine, CPA: Cyclophosphamide

*: Data significantly different from the solvent control at 5 % level

Table 8. Results of micronucleus test in BDF₁ female mice after single administration of 3-methoxybenzenamine by gavage

Group	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
Solvent control Olive oil	51	697 / 1000		6 / 2000	
	52	609 / 1000		2 / 2000	
	53	613 / 1000		3 / 2000	
	54	547 / 1000		5 / 2000	
	55	571 / 1000		1 / 2000	
	Total	3037 / 5000		17 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(60.7 ± 5.7)		(0.17 ± 0.10)	
MBA 150 mg/kg	56	624 / 1000		1 / 2000	
	57	581 / 1000		6 / 2000	
	58	641 / 1000		3 / 2000	
	59	616 / 1000		3 / 2000	
	60	685 / 1000		3 / 2000	
	Total	3147 / 5000		16 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(62.9 ± 3.8)		(0.16 ± 0.09)	
MBA 300 mg/kg	61	440 / 1000		3 / 2000	
	62	575 / 1000		5 / 2000	
	63	642 / 1000		1 / 2000	
	64	658 / 1000		4 / 2000	
	65	592 / 1000		3 / 2000	
	Total	2907 / 5000		16 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(58.1 ± 8.6)		(0.16 ± 0.07)	
MBA 600 mg/kg	66	473 / 1000		0 / 2000	
	67	662 / 1000		1 / 2000	
	68	529 / 1000		7 / 2000	
	69	502 / 1000		3 / 2000	
	70	483 / 1000		4 / 2000	
	Total	2649 / 5000		15 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(53.0 ± 7.7)		(0.15 ± 0.14)	
Positive control CPA 50 mg/kg	71	501 / 1000		41 / 2000	
	72	534 / 1000		40 / 2000	
	73	521 / 1000		23 / 2000	
	74	444 / 1000		19 / 2000	
	75	691 / 1000		14 / 2000	
	Total	2691 / 5000		137 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(53.8 ± 9.2)		(1.37 ± 0.62)*	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

b: Number of micronucleated polychromatic erythrocytes / total number of polychromatic erythrocytes observed

MBA: 3-Methoxy-benzenamine, CPA: Cyclophosphamide

*: Data significantly different from the solvent control at 5 % level