N−(アミノエチル)エタノールアミン
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.　実験動物および飼育条件 …… 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） …… 6
　1.　方　法 …… 6
　2.　結　果 …… 7
小核本試験 …… 7
　1.　方　法 …… 7
　2.　結　果 …… 9
追加試験 …… 10
　1.　方　法 …… 10
　2.　結　果 …… 10
　3.　考　察 …… 11
結　論 …… 12
特記事項 …… 12
文　献 …… 13
　Tables 1～6

【要　　約】

被験物質 *N*-（アミノエチル）エタノールアミン（ＡＥＥＡ）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、強制経口投与による小核試験を実施した。毒性予備試験および小核予備試験を行い、投与量および標本作製時期を設定した後、小核本試験を実施し、また、雌については追加試験を実施し、陰性の結果を得た。

毒性予備試験を行った結果、ＡＥＥＡの雄および雌マウスにおける最大耐量は、いずれも 2000 mg/kg であった。

小核予備試験において、ＡＥＥＡの 2000 mg/kg を雄マウスに投与し、投与後24、48および72時間に骨髄の塗抹標本を作製した。小核出現頻度（小核を有する幼若赤血球の比率）は、24時間群と他の群との間に明瞭な差は認められなかった。また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率を指標とした骨髄細胞の増殖抑制も認められなかった。これらの結果から、小核本試験での最高用量を雄雌ともに 2000 mg/kg とし、標本作製時期を投与後24時間に決定した。

ＡＥＥＡの 500、1000 および 2000 mg/kg を雄および雌マウスにそれぞれ投与し、投与後24時間目に標本を作製した。小核出現頻度は、雄においては、いずれの被験物質投与群とも、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量依存性も認められなかった。一方、雌においては小核出現頻度はＡＥＥＡの用量に依存して増加し、2000 mg/kg 投与群において、溶媒対照群と比較して有意に増加した。また、その小核出現頻度は当研究室における溶媒対照群の背景データ値をわずかに上まわっていた。全赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、雄雌ともにＡＥＥＡのいずれの被験物質投与群においても、溶媒対照群との間に有意差は認められなかった。

ＡＥＥＡは、小核本試験において、雌のみにおいて用量に依存して小核の誘発が認められたので、その結果を確認するために、雌マウスを用いて小核本試験と同様の実験群を設定し、追加試験を実施した。その結果、小核出現頻度は、いずれのＡＥＥＡ投与群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量依存性も認められなかった。また、幼若赤血球の比率は、ＡＥＥＡ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。

以上の結果から、ＡＥＥＡは、本試験条件下で Crj:BDF₁ 雄および雌マウスの骨髄細胞において、染色体異常誘発作用あるいは紡錘体形成阻害作用を示さないと結論した。

【緒　　言】

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、*N*-(アミノエチル)エタノールアミンの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、次に小核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。さらに、雌マウスについては、小核本試験の結果、背景データの範囲をわずかに上まわっており、用量に依存した小核の増加が認められたので、その結果を確認するために追加試験を実施した。

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 毒性試験ガイドライン：474」に準拠し、「化学物質 GLP 基準」（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．実験動物および飼育条件

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:BDF$_1$（C57BL/6 と DBA/2 の近交系間 F$_1$）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（雌）	1994年10月19日	雌　36匹
毒性予備試験（雄）	1994年11月 2日	雄　36匹
小核予備試験	1994年11月 9日	雄　31匹
小核本試験	1994年11月30日	雄雌各31匹
追加試験（雌）	1995年 4月 5日	雌　31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（143×293×148 mm, CRJ）に1匹ずつ収容し、飼育室（設定温度：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。動物の群分けは自由群分け（無作為抽出）により行った。個体識別はフェルトペンによりマウスの尾に群と個体番号を記し、ケージには群ごとに色の異なるカードに、試験系識別番号、群および個体番号を記載して個体識別の補助とした。なお、投与経路および投与回数は「OECD 毒性試験ガイドライン：474」に準拠し、単回強制経口投与とした。

2．被験物質

名　　称　：　*N*-（アミノエチル）エタノールアミン（CAS. No. 111-41-1）

英名（略称）　：　*N*-(Aminoethyl)ethanolamine（ＡＥＥＡ）

製　造　元　：

ロット番号　：

純　　度　：　99.9%以上（不純物：不明）

物理化学的性質　：　性状；無色透明液体

分子量；104.16

分子式；$C_4H_{12}N_2O$

比　重；1.0304

融　点；－38℃

沸　点；243.7℃

保管条件：室温

提供先：

【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 *N*-（アミノエチル）エタノールアミン（ＡＥＥＡ）の投与量を決定するため、雄雌ともに各群5匹ずつからなる4群を設け、公差を 500 mg/kg とすることにより、投与量をそれぞれ 500、1000、1500 および 2000 mg/kg とした。

2）検体の調製および投与方法

検体の投与容量はマウスの体重 kg 当たり 10 ㎖ とした。投与検体はＡＥＥＡの所要量を正確に採取し、局方注射用蒸留水（小林製薬㈱、製造番号：A3A25）に溶解して最高用量の原液を調製した。それ以下の用量については、最高用量の調製液を上記の溶媒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。投与日は、雄は1994年11月14日、雌は同年10月31日に行った。投与時の体重範囲は、雄で25～28ｇ、雌で19～22ｇであった。

3）死亡率および一般状態の観察

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（雄：1994年11月14～17日、雌：同年10月31日～11月3日）。

2．結果

すべての投与群において毒性徴候および死亡例は認められなかった（Table 1、2）。したがって、ＡＥＥＡの強制経口投与による Crj:BDF$_1$ 雄および雌マウスの最大耐量は、本実験条件下で、雄雌ともに 2000 mg/kg であると判断し、小核予備試験に用いるＡＥＥＡの投与用量を 2000 mg/kg とすることとした。

【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

雄マウスにＡＥＥＡの 2000 mg/kg を投与し、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、小核本試験における適切な標本作製時期を決定することとした。

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。雄マウスへの投与は、1994年11月21日に行った。投与時の体重範囲は、25～29ｇであった。

3）標本の作製

小核の観察のための骨髄標本は、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頚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、骨髄細胞を 0.6 ㎖ 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。沈渣をピペッティング後、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３枚の標本）し、それぞれの骨髄標本に試験系識別番号および暗番号を記し、室温で一晩自然乾燥させた。乾燥した骨髄標本は５分間メタノールで固定し、標本観察時まで室温保存した。

4）骨髄標本のアクリジンオレンジ（A.O.）螢光染色および小核の観察

骨髄標本のアクリジンオレンジ（A.O.）螢光染色および小核の観察は、林らの方法[3, 4]に従って行った。0.04 mg/mℓ の A.O.溶液を上記のメタノールで固定済の骨髄標本上に数滴滴下し、カバーグラスをかけ、カバーグラス上から濾紙で余分な溶液を十分吸い取り、螢光顕微鏡下で観察した。

骨髄標本はそれぞれの個体について、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個の幼若赤血球（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500個観察し、そのなかの幼若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。

2．結　果

結果は Table 3 に示した。小核出現頻度に関しては、24時間群と他の群との間に明瞭な差は認められなかった。また、この用量では、幼若赤血球の比率を指標とした骨髄細胞の増殖抑制も認められなかった。以上の結果から、小核本試験における標本作製時期を、投与後24時間に決定した。また、ＡＥＥＡの 2000 mg/kg 投与により、いずれの時間群においても、骨髄細胞の増殖抑制も認められなかったことより、小核本試験に用いるＡＥＥＡの最高用量を雄雌ともに 2000 mg/kg と決定した。

【小 核 本 試 験】

1．方法

1）実験群の設定

毒性予備試験および小核予備試験の結果に基づき、小核本試験に用いる最高用量を雄雌ともに 2000 mg/kg とし、これをもとに公比2で減じ、中用量を 1000 mg/kg、低用量を 500 mg/kg に設定した。また、標本作製時期を投与後24時間に設定し、各群5匹ずつからなる5群を以下のように設けた。

i）溶媒対照群（局方注射用蒸留水）

ii）ＡＥＥＡ　500 mg/kg 群

iii）ＡＥＥＡ 1000 mg/kg 群

iv）ＡＥＥＡ 2000 mg/kg 群

v）陽性対照群（cyclophosphamide, ＣＰＡ：50 mg/kg）*

* 当研究室で、本用量のＣＰＡ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）検体の調製および投与方法

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（ＣＰＡ, Sigma Chemical Co.、ロット番号：73H0846）は、局方生理食塩液（㈱大塚製薬工場、製造番号：K3B88）に溶解して所定の濃度に調製し、10 mℓ/kg の容量で単回強制経口投与した。投与は、雄雌ともに1994年12月 7日に行った。投与時の体重範囲は、雄で23～27ｇ、雌で19～21ｇであった。

秦野研究所において、2.50 mg/mℓ 溶液は当研究所で実施した染色体異常試験（G-94-025）で調製したものについて、また 200 mg/mℓ 溶液は、当該試験で調製したものについて室温遮光条件下で調製後４時間までのＡＥＥＡの局方注射用蒸留水中での安定性を調べた。

その結果、調製４時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値（０時間）の平均値に対して、103および 99.3%であった。これらの値は、当研究所で規定している基準内（４時間後における平均含量が初期値の90.0%以上）であった（Appendix １、２）。

また、200 mg/mℓ、50.0 mg/mℓ 溶液について含量測定試験を行った。その結果、調製後の濃度は、いずれも当研究所で規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の90.0～110%）であった（Appendix 3）。

以上の結果から、ＡＥＥＡは局方注射用蒸留水中では安定であり、また調製検体中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

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、雄雌ともに投与後24時間（1994年12月 8日）とした。

4）有意差検定

それぞれの小核出現頻度について、Fisher の正確確率検定法[5]により、溶媒対照群と、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。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroni の補正[6]を行った。更に、小核出現頻度の用量（対数値）依存性について Cochran－Armitage の傾向検定[7]を５％水準で行った。小核出現頻度が陽性であるか否かの判定については、これらの検定結果とこれまでに当研究室で得られた、同系統を用いた溶媒対照群の背景データのばらつきの範囲を超えているかどうかについても検討し、これらを含めて総合的に判定することとした。

また、赤血球中に占める幼若赤血球の比率について、それぞれ溶媒対照群と、各検体投与群および陽性対照群との間で、ｔ検定を行った。検定にあたっては、多重性を考慮して、Bonferroni の補正を行った。

２．結果

雄および雌の小核本試験の結果をそれぞれ Table 4 および 5 に示す。雄および雌の溶媒対照群および陽性対照群の小核出現頻度は、それぞれ背景データのばらつきの範囲内（平均値±３×標準偏差）であり、ＣＰＡを 50 mg/kg 投与した陽性対照群での小核出現頻度は、溶媒対照群と比較して、雄雌ともに５％水準で有意な増加がみられた。

ＡＥＥＡ投与群の小核出現頻度は、雄については Fisher の正確確率検定法（Bonferroni の補正）による有意差検定の結果、いずれの投与群も溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。さらに、Cochran－Armitage の傾向検定の結果においても、ＡＥＥＡの用量に依存した有意な増加傾向は認められなかった。

一方、雌のＡＥＥＡ投与群の小核出現頻度は、Fisher の正確確率検定法（Bonferroni の補正）による有意差検定の結果、2000 mg/kg 投与群の値が、溶媒対照群より有意に高かった。また、Cochran－Armitage の傾向検定でもＡＥＥＡの用量に依存した増加傾向を示した。さらに、ＡＥＥＡの 2000 mg/kg 投与群における小核出現頻度は、当研究室でこれまでに得られた溶媒対照群の背景データのばらつきの範囲（1994年11月～1995年４月までの７試験において 0.01～0.27）をわずかに上まわった値であった。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、ＡＥＥＡおよび陽性対照群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。

【追　加　試　験】

小核本試験の雌において、溶媒対照群の背景データのばらつきの範囲をわずかに上まわり、ＡＥＥＡの用量に依存した小核出現頻度の増加が認められたので、その結果を確認するために、小核本試験と同様の実験群を設け、追加試験を実施した。

１．方法

１）検体の調製および投与方法

投与検体の調製および投与方法は小核本試験の場合と同様に行った。投与は1995年４月12日に行った。投与時の体重範囲は19～22ｇであった。

２）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、小核本試験の場合と同様に行った。標本の作製は1995年４月13日に行った。

３）有意差検定

有意差検定は、小核本試験の場合と同様に行った。

２．結果

雌の追加試験の結果を Table 6 に示す。溶媒対照群および陽性対照群の小核出現頻度は、それぞれ背景データのばらつきの範囲内（平均値±３×標準偏差）であり、ＣＰＡを 50 mg/kg 投与した陽性対照群での小核出現頻度は、溶媒対照群と比較して５％水準で有意な増加がみられた。

小核出現頻度は、Fisher の正確確率検定法（Bonferroni の補正）による有意差検定の結果、ＡＥＥＡのいずれの投与群も溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められなかった。さらに、Cochran－Armitage の傾向検定の結果においても、ＡＥＥＡの用量に依存した有意な増加傾向は認められなかった。

赤血球中に占める幼若赤血球の比率は、ＡＥＥＡおよび陽性対照群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。

3．考察

ＡＥＥＡの変異原性については、Zeiger[8]は細菌を用いる復帰突然変異試験を行い、*S.typhimurium* 1535 の代謝活性化法において、弱い陽性の結果を得ている。また、Fouremanら[9]もショウジョウバエの伴性劣性致死試験で疑陽性の結果を得ている。一方、Leung (1994)[10]は6種のアルキレンアミンについて、変異原性を多種の試験系を用いて調べ、ＡＥＥＡは復帰突然変異試験において、*S. typhimurium* の4菌株では代謝活性化法の有無に関わらず陰性、チャイニーズ・ハムスターの CHO細胞を用いる遺伝子突然変異試験および姉妹染色体交換試験においても代謝活性化法の有無に関わらず陰性、さらに生体内のラットの肝細胞の不定期 DNA 合成試験でも陰性の結果を得ている。このようにＡＥＥＡの変異原性は、あってもそれほど強くないものと推察される。

ＡＥＥＡの小核試験においては、雄では用量に依存した小核の誘発の増加は認められなかったが、雌では最高用量の 2000 mg/kg 投与群で溶媒対照群の背景データの範囲をわずかに上回り、用量依存性も認められた。雌における結果を確認するために同一用量での追加試験を行ったところ、用量に依存した小核の誘発は認められなかった。以上の結果と他の変異原性試験の結果と併せて考察すると、マウスの小核試験については雄雌ともに陰性と判断される。

【結　　論】

以上の結果から、本試験条件下では被験物質ＡＥＥＡは、雄マウスにおいて 2000 mg/kg 以下の投与により、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さなかった。一方、雌マウスにおいても、追加試験の結果を含めて、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さないものと結論された。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" vol. 4., Hollaender, A. ed, Plenum Press, New York, London (1976), pp. 76-78

3）Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. : An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. Mutation Res. 120 : 241-247 (1983)

4）林　真　：　「小核試験」，サイエンティスト社，東京　(1991), pp. 44-55.

5）吉村　功　編：「毒性・薬効データの統計解析」，サイエンティスト社，東京 (1987), pp. 76-78.

6）吉村　功、大橋靖雄　責任編集：「毒性試験講座14、毒性試験データの統計解析」地人書館，東京 (1992), pp. 18-222

7）吉村　功　編：「毒性・薬効データの統計解析」，サイエンティスト社，東京 (1987), pp. 67-69.

8）Zeiger, E., Anderson, B., Howorth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K. , Speck. W. : Salmonella mutagenicity tests; III. Results of the testing 255 chemicals. Environ. Mutagen. 9 (Suppl. 9) : 1-109 (1987)

9) Foureman, P., Mason, J.M., Valencia, R., Zimmerings, S. : Chemical mutagenesis testing in Drosophila IX. Results of 50 coded compounds tested for the National Toxicology Program. Environ. Mol. Mutagen. 23 : 51-63 (1994)

10) Leung, H-W. : Evaluation of the genotoxic potential of alkyleneamines Mutation Res. 320 : 31-43 (1994)

Table 1. Mortality of BDF_1 male mice after single administration of *N*-(aminoethyl)ethanolamine by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice injected	Number of mice died				Mortality
		Days after injection				
		0	1	2	3	
500	5	0	0	0	0	0 / 5
1000	5	0	0	0	0	0 / 5
1500	5	0	0	0	0	0 / 5
2000	5	0	0	0	0	0 / 5

Table 2. Mortality of BDF_1 female mice after single administration of *N*-(aminoethyl)ethanolamine by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice injected	Number of mice died				Mortality
		Days after injection				
		0	1	2	3	
500	5	0	0	0	0	0 / 5
1000	5	0	0	0	0	0 / 5
1500	5	0	0	0	0	0 / 5
2000	5	0	0	0	0	0 / 5

Table 3. Results of preliminary micronucleus test in BDF1 male mice after single administration of *N*-(aminoethyl) ethanolamine by gavage (2000 mg/kg)

Time after administration	Animal No.	a MNPCE / PCE	b PCE / ERY
24h	1	2 / 2000	340 / 500
	2	4 / 2000	329 / 500
	3	6 / 2000	314 / 500
	4	4 / 2000	301 / 500
	5	3 / 2000	334 / 500
	Total	19 / 10000	1618 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.19 ± 0.07)	(64.7 ± 3.2)
48h	6	2 / 2000	326 / 500
	7	2 / 2000	322 / 500
	8	2 / 2000	306 / 500
	9	2 / 2000	327 / 500
	10	4 / 2000	308 / 500
	Total	12 / 10000	1589 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.12 ± 0.04)	(63.6 ± 2.0)
72h	11	3 / 2000	296 / 500
	12	5 / 2000	328 / 500
	13	7 / 2000	338 / 500
	14	3 / 2000	315 / 500
	15	1 / 2000	330 / 500
	Total	19 / 10000	1607 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.19 ± 0.11)	(64.3 ± 3.3)

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

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

Table 4. Results of micronucleus test in BDF1 male mice after single administration of *N*-(aminoethyl) ethanolamine by gavage

Group	Animal No.	a MNPCE / PCE	b PCE / ERY
Solvent control D.W. 10 ml/kg	1	3 / 2000	242 / 500
	2	5 / 2000	315 / 500
	3	5 / 2000	287 / 500
	4	3 / 2000	263 / 500
	5	3 / 2000	280 / 500
	Total	19 / 10000	1387 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.19 ± 0.05)	(55.5 ± 5.5)
AEEA 500 mg/kg	6	1 / 2000	262 / 500
	7	6 / 2000	299 / 500
	8	4 / 2000	258 / 500
	9	3 / 2000	291 / 500
	10	5 / 2000	273 / 500
	Total	19 / 10000	1383 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.19 ± 0.10)	(55.3 ± 3.6)
AEEA 1000 mg/kg	11	2 / 2000	297 / 500
	12	3 / 2000	265 / 500
	13	3 / 2000	249 / 500
	14	2 / 2000	309 / 500
	15	1 / 2000	305 / 500
	Total	11 / 10000	1425 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.11 ± 0.04)	(57.0 ± 5.3)
AEEA 2000 mg/kg	16	2 / 2000	288 / 500
	17	5 / 2000	243 / 500
	18	2 / 2000	238 / 500
	19	5 / 2000	260 / 500
	20	9 / 2000	258 / 500
	Total	23 / 10000	1287 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.23 ± 0.14)	(51.5 ± 3.9)
Positive control CPA 50 mg/kg	21	33 / 2000	244 / 500
	22	37 / 2000	261 / 500
	23	41 / 2000	243 / 500
	24	47 / 2000	223 / 500
	25	24 / 2000	247 / 500
	Total	182 / 10000	1218 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(1.82 ± 0.43)***	(48.7 ± 2.7)

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

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

AEEA: *N*-(Aminoethyl) ethanolamine (purity was above 99.9% and impurity was unknown)

CPA: Cyclophosphamide

***: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level

Table 5. Results of micronucleus test in BDF_1 female mice after single administration of *N*-(aminoethyl) ethanolamine by gavage

Group	Animal No.	a MNPCE / PCE	b PCE / ERY
Solvent control D.W. 10 ml/kg	51	3 / 2000	298 / 500
	52	1 / 2000	279 / 500
	53	0 / 2000	287 / 500
	54	3 / 2000	305 / 500
	55	3 / 2000	300 / 500
	Total	10 / 10000	1469 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.10 ± 0.07)	(58.8 ± 2.1)
AEEA 500 mg/kg	56	0 / 2000	247 / 500
	57	2 / 2000	261 / 500
	58	7 / 2000	304 / 500
	59	3 / 2000	304 / 500
	60	1 / 2000	304 / 500
	Total	13 / 10000	1420 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.13 ± 0.14)	(56.8 ± 5.6)
AEEA 1000 mg/kg	61	3 / 2000	277 / 500
	62	2 / 2000	256 / 500
	63	1 / 2000	248 / 500
	64	6 / 2000	317 / 500
	65	1 / 2000	279 / 500
	Total	13 / 10000	1377 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.13 ± 0.10)	(55.1 ± 5.4)
AEEA 2000 mg/kg	66	5 / 2000	286 / 500
	67	4 / 2000	275 / 500
	68	5 / 2000	307 / 500
	69	8 / 2000	244 / 500
	70	6 / 2000	259 / 500
	Total	28 / 10000	1371 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.28 ± 0.08)**	(54.8 ± 4.9)
Positive control CPA 50 mg/kg	71	46 / 2000	263 / 500
	72	33 / 2000	228 / 500
	73	37 / 2000	255 / 500
	74	44 / 2000	289 / 500
	75	33 / 2000	287 / 500
	Total	193 / 10000	1322 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(1.93 ± 0.31)***	(52.9 ± 5.0)

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

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

AEEA: *N*-(Aminoethyl) ethanolamine (purity was above 99.9% and impurity was unknown)

CPA: Cyclophosphamide

** or ***: Data significantly different from the solvent control at 1 % or 0.1% level, respectively.

Table 6. Results of micronucleus test in BDF1 female mice after single administration of *N*-(aminoethyl) ethanolamine by gavage

Group	Animal No.	a MNPCE / PCE	b PCE / ERY
Solvent control D.W. 10 ml/kg	51	3 / 2000	275 / 500
	52	3 / 2000	277 / 500
	53	0 / 2000	287 / 500
	54	1 / 2000	335 / 500
	55	1 / 2000	316 / 500
	Total	8 / 10000	1490 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.08 ± 0.07)	(59.6 ± 5.3)
AEEA 500 mg/kg	56	5 / 2000	310 / 500
	57	1 / 2000	313 / 500
	58	5 / 2000	341 / 500
	59	1 / 2000	301 / 500
	60	5 / 2000	309 / 500
	Total	17 / 10000	1574 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.17 ± 0.11)	(63.0 ± 3.1)
AEEA 1000 mg/kg	61	4 / 2000	303 / 500
	62	3 / 2000	295 / 500
	63	3 / 2000	293 / 500
	64	4 / 2000	286 / 500
	65	2 / 2000	313 / 500
	Total	16 / 10000	1490 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.16 ± 0.04)	(59.6 ± 2.1)
AEEA 2000 mg/kg	66	1 / 2000	269 / 500
	67	1 / 2000	280 / 500
	68	6 / 2000	318 / 500
	69	3 / 2000	278 / 500
	70	5 / 2000	300 / 500
	Total	16 / 10000	1445 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(0.16 ± 0.11)	(57.8 ± 4.0)
Positive control CPA 50 mg/kg	71	29 / 2000	259 / 500
	72	32 / 2000	266 / 500
	73	24 / 2000	288 / 500
	74	22 / 2000	265 / 500
	75	23 / 2000	261 / 500
	Total	130 / 10000	1339 / 2500
	%(Mean±S.D.)	(1.30 ± 0.22)***	(53.6 ± 2.3)

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

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

AEEA: *N*-(Aminoethyl) ethanolamine (purity was above 99.9% and impurity was unknown)

CPA: Cyclophosphamide

***: Data significantly different from the solvent control at 0.1 % level