



4-エトキシ
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	8
小核本試験	9
1. 方 法	9
2. 結果および考察	11
結 論	12
特記事項	13
文 献	13

Tables 1～8

【要 約】

被験物質 4-エトキシベンゼナミン (EBA) 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

EBAの毒性予備試験を行った結果、EBAのCrj: BDF₁雄および雌マウスにおける最大耐量は、それぞれ 600 mg/kg および 1000 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EBAの高用量を雄は 600 mg/kg とし、雌は 1000 mg/kg とした。

2. 小核予備試験

EBAの 600 mg/kg を雄に、また、1000 mg/kg を雌に投与し、投与後24、48 および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、雄および雌ともに24時間群において最高値を示した。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、雄および雌ともに投与後24時間に決定した。

3. 小核本試験

雄マウスにはEBAの150、300 および 600 mg/kg を、また、雌マウスにはEBAの250、500 および 1000 mg/kg を投与し、投与後24時間目に骨髓の塗抹標本作製した。標本観察の結果、小核出現頻度は、雄において、いずれの検体投与群とも溶媒対照群と比較し、統計学的に有意な増加は観察されなかった。一方、

雌においてはEBAの1000 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。赤血球中に占める網赤血球の比率は、雄雌ともにEBA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、EBAは、本試験条件下で、BDF₁雄マウスにおいて600 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す明らかな結果は得られなかった。しかし、雌マウスにおいて1000 mg/kgの投与により骨髄細胞に、これらの作用を示すことが結論された。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。

【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4-エ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。この試験は「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22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、群および個体番号を記載して個体識別の補助とした。

2. 被験物質

(名 称) 4-エトキシベンゼナミン
(4-Ethoxybenzenamine)

(CAS No.) 156-43-4

(別 名) p-Aminophenetol, p-Ethoxyaniline, p-Phenetidine

(ロット番号)

(分子式) C₈H₁₁NO

(分 子 量) 137.18
(性 状) 液体、水に難溶、アルコールに可溶、沸点 250℃、
融点 4℃
(比 重) 1.0652
(純 度) 98%以上
(提 供 者)
(入 手 年 月 日) 1991年7月17日
(保 管 条 件) 気密容器で遮光

【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4-エトキシベンゼナミン (EBA) 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被験物質EBAの所要量を精秤し、(局)オリ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(局)オリブ油で希釈して所定の濃度になるよう調製した。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23~29 g、雌で19~23 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、EBAを投与した群では、雄および雌とも、400 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、横臥、呼吸促迫および立毛などの毒性徴候が現れた。死亡例は、雄は800 および1500 mg/kg 投与群でみられ、雌では1500 mg/kg 群でのみみられた(Tables 1, 2)。生存個体においては、雄の800 mg/kg、雌の1000 mg/kg以上の投与群で明らかな体重の減少が認められた(Tables 3, 4)。以上の結果から、EBA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600 および1000 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EBAの高用量を、雄は600 mg/kgとし、雌は1000 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300 mg/kg、低用量を150 mg/kgとし、雌では中用量を500 mg/kg、低用量を250 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。EBA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600 mg/kgおよび1000 mg/kg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。投与は、雄雌ともに1991年12月16日に行った。投与时体重範囲は、雄で25～29 g、雌で20～23 gであった。

3) 標本の作製

小核の観察のための標本を、Schmidの方法に従って^{1, 2)}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グラス上に塗抹 (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 1991 年 12 月 17 ~ 19 日に、染色は同年 12 月 20 日に行った。

4) 小核の観察

作製したそれぞれの骨髓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、骨髓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、雄雌ともに 24 時間群において最高値を示した。しかし、Kastenbaum and Bowman の表は、片側検定なので 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。また、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。以上の結果から、小核本試験における標本作製時期は、雄および雌ともに投与後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EBAの600 mg/kg および1000 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) EBA 150 mg/kg 投与群
- 3) EBA 300 mg/kg 投与群
- 4) EBA 600 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) EBA 250 mg/kg 投与群
- 3) EBA 500 mg/kg 投与群
- 4) EBA 1000 mg/kg 投与群
- 5) 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 (CPA, 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2月3日に行い、投与時体重範囲は、雄で24~29g、雌で19~24gであった。

なお、1992年2月24~26日に当研究所で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、EBA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100 mg/ml 溶液 (同 1000 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2日後の含量を測定した。その結果、両調製検体の調製2日後の平均含量比は調製時のそれぞれ 96.6および 98.0%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2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・含量分析を同年2月3日に行った。その結果、被験物質の平均含量は添加量の 101~114%の範囲にあり、サンプル間のばらつきは平均値の10%以内であった (Appendix 2)。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、雄雌ともに投与後24時間(1992年2月4日)に行った。染色は同年2月6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、EBAの各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、EBA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 の表を用いた有意差検定の結果、EBAのいずれの投与群も溶媒対照群との間に有意な差は認められなかった。また、Cochran-Armitage の傾向検定の結果においても、EBAの用量に依存した有意な増加傾向を示さなかった。小核予備試験 (Table 5) においては、小核本試験と同じ 600 mg/kg の24時間群の値 (0.47%) は、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%) を明らかに越えていたが、本試験においては統計学的な有意差が認められなかった。したがって、EBAの雄マウスにおける小核誘発性につい

ては、明らかでなかった。

一方、雌の小核出現頻度は、Kastenbaum and Bowman の表を用いた有意差検定の結果、EBAの1000 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、EBAの用量に依存した増加傾向を示した。また、この小核出現頻度の値(0.58%)は、当研究所が過去5年間に14回実施した、BDF₁雌マウスを用いた小核試験の溶媒対照群の値の変動範囲(0.04~0.24%)を明らかに越えていた。さらに、小核予備試験の結果(Table 6)を考え合わせると、1000 mg/kg のEBAは雌マウスの骨髓細胞において小核を誘発すると考えられる。

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、EBAのいずれの投与群においても溶媒対照群との間に有意な差は認められなかった。

【結 論】

以上の結果から、EBAは、本試験条件下で、BDF₁雄マウスにおいて600 mg/kg以下の投与により、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明らかな結果は得られなかった。しかし、雌マウスにおいて1000 mg/kgの投与により骨髓細胞に、これらの作用を示すことが結論された。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。

【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 frequencies. Biometrics 11: 375-386 (1955)

Table 1. Mortality of BDF₁ male mice after single administration of 4-ethoxybenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice administered	Number of mice died			Mortality	
		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	1	0	1 / 5
1000	5	0	0	0	0	0 / 5
1500	5	2	2	1	0	5 / 5

Table 2. Mortality of BDF₁ female mice after single administration of 4-ethoxybenzenamine 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	0	0	4 / 5

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

Dose (mg/kg)	Body weight (g)		
	^a Initial	^a Final	^a Gain
0	27.2 ± 1.0 (5)	27.4 ± 1.3 (5)	0.2 ± 0.5 (5)
100	26.3 ± 0.7 (5)	26.4 ± 0.8 (5)	0.1 ± 0.4 (5)
200	26.9 ± 1.1 (5)	26.8 ± 1.2 (5)	-0.1 ± 0.1 (5)
400	26.0 ± 1.5 (5)	26.0 ± 1.5 (5)	0.0 ± 0.4 (5)
600	26.4 ± 1.4 (5)	26.4 ± 1.3 (5)	0.0 ± 0.6 (5)
800	26.0 ± 0.7 (5)	23.8 ± 0.5 (4)	-2.5 ± 0.9 (4)
1000	25.7 ± 2.2 (5)	22.2 ± 2.3 (5)	-3.5 ± 1.9 (5)
1500	25.5 ± 0.6 (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 4-ethoxybenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Body weight (g)		
	^a Initial	^a Final	^a Gain
0	20.7 ± 0.8 (5)	20.8 ± 1.1 (5)	0.1 ± 0.6 (5)
100	20.5 ± 0.8 (5)	20.2 ± 0.7 (5)	-0.3 ± 0.4 (5)
200	20.4 ± 0.4 (5)	20.5 ± 0.8 (5)	0.0 ± 0.4 (5)
400	20.5 ± 0.6 (5)	20.7 ± 1.1 (5)	0.1 ± 0.6 (5)
600	20.6 ± 0.9 (5)	20.5 ± 1.1 (5)	0.0 ± 0.5 (5)
800	21.0 ± 1.1 (5)	20.4 ± 1.1 (5)	-0.6 ± 0.7 (5)
1000	21.2 ± 1.2 (5)	18.9 ± 1.9 (5)	-2.4 ± 2.0 (5)
1500	20.2 ± 0.8 (5)	15.9 (1)	-4.6 (1)

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 4-ethoxybenzenamine (600 mg/kg) by gavage

Time after administration	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
24 hrs	1	588 / 1000		14 / 2000	
	2	573 / 1000		5 / 2000	
	3	649 / 1000		4 / 2000	
	4	615 / 1000		8 / 2000	
	5	599 / 1000		16 / 2000	
	Total		3024 / 5000		47 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(60.5 ± 2.9)		(0.47 ± 0.27)	
48 hrs	6	653 / 1000		5 / 2000	
	7	501 / 1000		2 / 2000	
	8	521 / 1000		7 / 2000	
	9	651 / 1000		3 / 2000	
	10	616 / 1000		5 / 2000	
	Total		2942 / 5000		22 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(58.8 ± 7.3)		(0.22 ± 0.10)	
72 hrs	11	623 / 1000		4 / 2000	
	12	549 / 1000		1 / 2000	
	13	579 / 1000		1 / 2000	
	14	632 / 1000		2 / 2000	
	15	670 / 1000		5 / 2000	
	Total		3053 / 5000		13 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(61.1 ± 4.7)		(0.13 ± 0.09)	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

Table 6. Results of preliminary micronucleus test in BDF₁ female mice after single administration of 4-ethoxybenzenamine (1000 mg/kg) by gavage

Time after administration	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
24 hrs	51	538 / 1000		4 / 2000	
	52	525 / 1000		14 / 2000	
	53	467 / 1000		8 / 2000	
	54	422 / 1000		10 / 2000	
	55	562 / 1000		12 / 2000	
	Total	2514 / 5000		48 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(50.3 ± 5.7)		(0.48 ± 0.19)	
48 hrs	56	590 / 1000		8 / 2000	
	57	552 / 1000		12 / 2000	
	58	586 / 1000		9 / 2000	
	59	623 / 1000		4 / 2000	
	60	482 / 1000		7 / 2000	
	Total	2833 / 5000		40 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(56.7 ± 5.4)		(0.40 ± 0.15)	
72 hrs	61	621 / 1000		1 / 2000	
	62	612 / 1000		2 / 2000	
	63	358 / 1000		5 / 2000	
	64	669 / 1000		2 / 2000	
	65	616 / 1000		4 / 2000	
	Total	2876 / 5000		14 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(57.5 ± 12.4)		(0.14 ± 0.08)	

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 4-ethoxybenzenamine by gavage

Group	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY	MNPCE / PCE		
Solvent control Olive oil	1	386 / 1000	5 / 2000		
	2	551 / 1000	3 / 2000		
	3	478 / 1000	4 / 2000		
	4	587 / 1000	2 / 2000		
	5	536 / 1000	3 / 2000		
	Total	2538 / 5000	17 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(50.8 ± 7.9)	(0.17 ± 0.06)		
EBA 150 mg/kg	6	539 / 1000	4 / 2000		
	7	556 / 1000	5 / 2000		
	8	480 / 1000	2 / 2000		
	9	585 / 1000	6 / 2000		
	10	523 / 1000	4 / 2000		
	Total	2683 / 5000	21 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(53.7 ± 3.9)	(0.21 ± 0.07)		
EBA 300 mg/kg	11	505 / 1000	2 / 2000		
	12	552 / 1000	1 / 2000		
	13	564 / 1000	7 / 2000		
	14	601 / 1000	6 / 2000		
	15	557 / 1000	4 / 2000		
	Total	2779 / 5000	20 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(55.6 ± 3.4)	(0.20 ± 0.13)		
EBA 600 mg/kg	16	605 / 1000	3 / 2000		
	17	443 / 1000	0 / 2000		
	18	512 / 1000	3 / 2000		
	19	553 / 1000	6 / 2000		
	20	495 / 1000	9 / 2000		
	Total	2608 / 5000	21 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(52.2 ± 6.1)	(0.21 ± 0.17)		
Positive control CPA 50 mg/kg	21	369 / 1000	40 / 2000		
	22	356 / 1000	30 / 2000		
	23	460 / 1000	44 / 2000		
	24	485 / 1000	48 / 2000		
	25	419 / 1000	41 / 2000		
	Total	2089 / 5000	203 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(41.8 ± 5.6)	(2.03 ± 0.33)*		

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

EBA: 4-Ethoxy-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 4-ethoxybenzenamine by gavage

Group	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
Solvent control Olive oil	51	578 / 1000		3 / 2000	
	52	614 / 1000		1 / 2000	
	53	657 / 1000		3 / 2000	
	54	705 / 1000		4 / 2000	
	55	673 / 1000		3 / 2000	
	Total	3227 / 5000		14 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(64.5 ± 5.0)		(0.14 ± 0.05)	
EBA 250 mg/kg	56	574 / 1000		6 / 2000	
	57	557 / 1000		2 / 2000	
	58	645 / 1000		5 / 2000	
	59	656 / 1000		1 / 2000	
	60	633 / 1000		3 / 2000	
	Total	3065 / 5000		17 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(61.3 ± 4.5)		(0.17 ± 0.10)	
EBA 500 mg/kg	61	690 / 1000		3 / 2000	
	62	575 / 1000		5 / 2000	
	63	593 / 1000		4 / 2000	
	64	651 / 1000		4 / 2000	
	65	650 / 1000		5 / 2000	
	Total	3159 / 5000		21 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(63.2 ± 4.7)		(0.21 ± 0.04)	
EBA 1000 mg/kg	66	669 / 1000		8 / 2000	
	67	583 / 1000		10 / 2000	
	68	669 / 1000		12 / 2000	
	69	664 / 1000		15 / 2000	
	70	724 / 1000		13 / 2000	
	Total	3309 / 5000		58 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(66.2 ± 5.0)		(0.58 ± 0.14) *	
Positive control CPA 50 mg/kg	71	493 / 1000		26 / 2000	
	72	611 / 1000		39 / 2000	
	73	470 / 1000		45 / 2000	
	74	708 / 1000		49 / 2000	
	75	616 / 1000		62 / 2000	
	Total	2898 / 5000		221 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(58.0 ± 9.8)		(2.21 ± 0.66) *	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

EBA: 4-Ethoxy-benzenamine, CPA: Cyclophosphamide

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