



3-146

9199419

食薬セ研第4-834号

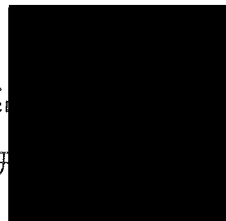
1993年 4月30日

N-モノ（またはジ）メチルフェニル-N'-モノ（またはジ）
メチルフェニル-p- フェニレンジアミンの
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

秦 野 研





食薬セ研第4-834号

試験委託者 : 厚生省生活衛生局

試験計画番号 : G-92-335

試験系識別番号 : MN-145

被験物質名 : (名称) N-モノ (またはジ) メチルフェニル-N'-モノ (またはジ) メチルフェニル-p- フェニレンジアミン
(ロット番号) AR8 (精工化学(株)製)

試験項目 : 小核試験

試験内容 : マウスを用いる小核試験

試験期間 : 1992年10月19日~1993年 4月30日

資料保管場所 : 秦野研究所資料保管室

試験施設 : 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
(所在地) (神奈川県秦野市落合729-5)

運営管理者 : 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長

993年 4月30日

試験責任者
(投与・標本観察)

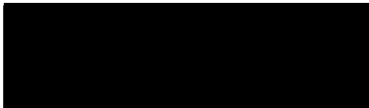
:



1993年4月30日

試験担当主任者
(報告書作成・
標本作製・標本
観察・統計処理)

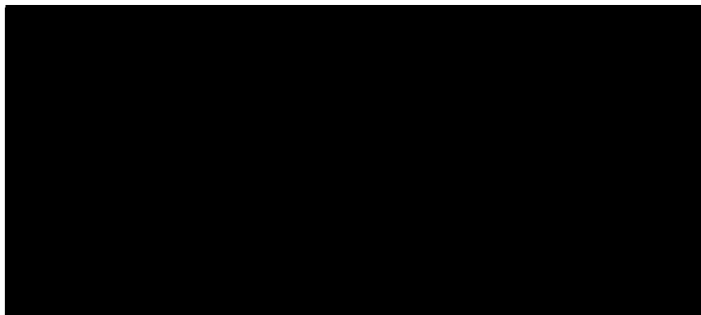
:



1993年4月30日

試験実施担当者

:



陳 述 書

試験の表題 : N-モノ (またはジ) メチルフェニル-N'-モノ (またはジ) メチルフェニル-p- フェニレンジアミンのマウスを用いる小核試験

試験計画番号 : G-92-335

上記の試験は、「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ものであります。

1993年 4月30日

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所 所長 (運営管理者)

氏 名



信頼性保証証明

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所信頼性保証部門は、試験計画番号 G-92-335 に関する試験の管理状況について次のとおり査察を行った。

査 察 日	査 察 項 目	運営管理者および試験責任者への報告日
1992年10月12日	試験計画書点検査察	1992年10月12日
1992年11月11日	動物入荷・検収査察	1992年11月11日
1992年11月24日	検体調製・含量試験・投与査察	1992年11月24日
1992年11月25日	解剖査察	1992年11月25日
1992年12月10日	標本観察査察	1992年12月10日
1993年 2月26日	報告書案点検査察	1993年 2月26日
1993年 4月30日	最終報告書点検査察	1993年 4月30日

この報告書は、試験に使用された方法および手順を正確に記述し、報告結果は、生データを正確に反映していることを証明する。

1993年 4月30日

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所 信頼性保証責任者



【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	5
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. 結果および考察	9
結 論	9
特記事項	10
文 献	11
Tables 1～6	
Appendixes 1～2	

【要 約】

被験物質 N-モノ（またはジ）メチルフェニル-N'-モノ（またはジ）メチルフェニル-p-フェニレンジアミン（DMPD）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

毒性予備試験を行った結果、DMPDの Crj:BDF₁ 雄および雌マウスにおける最大耐量は、2000 mg/kg 以上であった。そこで、小核予備試験および小核本試験におけるDMPDの高用量を、雄雌ともに OECD 化学品試験法ガイドラインで定められた投与量の上限の 2000 mg/kg とした。

2. 小核予備試験

DMPDの 2000 mg/kg を雄および雌マウスに投与し、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、24時間群と他の群との間に統計学的な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も、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）を雄雌ともに、投与後24時間と決定した。

3. 小核本試験

DMPD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時間目に骨髓の塗抹標本作製した。標本観察の結果、雄雌ともに小核出現頻度には、溶媒対照群と比較して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。赤血球中に占める網赤血球の比率は、雄雌ともにDMPD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。

4. 結論

以上の結果から、本試験条件下ではDMPDは、BDF₁雄および雌マウスの骨髓細胞にお

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ず、また骨髄細胞の増殖抑制作用も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 N-モノ（またはジ）メチルフェニル-N'-モノ（またはジ）メチルフェニル-p-フェニレンジアミンについて、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髓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。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、XXXXXXXXXX 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	1992年 9月30日	雄雌各 42 匹
小核予備試験	1992年11月 4日	〃 36 匹
小核本試験 (雄)	1992年11月11日	雄 42 匹
小核本試験 (雌)	1992年11月18日	雌 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(株)) 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、試験系識別番号、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) N-モノ (またはジ) メチルフェニル-N'-モノ (またはジ)
メチルフェニル-p- フェニレンジアミン)
(略 称) DMPD
(製 品 名) ノンフレックス DT
(ロ ッ ト 番 号) AR8 (精工化学(株)製)
(性 状) 褐色顆粒、融点80℃以上、沸点不明
(純 度) 75%以上
(提 供 者) (株)日本化学工業協会
(保 管 条 件) 冷暗所

【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DMPD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4群を設け、投与量をそれぞれ、750、1000、1500 および 2000 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 20 ml とした。最高用量の投与検体は被験物質DMPDの所要量を正確に採取し、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC Na、和光純薬工業(株)、ロット番号：WDP1183）水溶液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上記の溶媒で希釈して所定の濃度に調製した。なお、調製にあたっては純度換算は行わなかった。また、投与検体はすべて用時調製とした。

投与は単回強制経口投与とした。投与日は、雄雌ともに1992年10月13日、投与時体重範囲は雄で24～28 g、雌で19～23 g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（1992年10月13～16日）。

2. 結果

DMPDを投与した雄雌のすべての群において、明らかな毒性徴候は見られず、死亡例も認められなかった（Tables 1, 2）。したがって、DMPD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、ともに2000 mg/kg以上であると結論した。そのため、小核予備試験および小核本試験に用いるDMPDの高用量を、雄雌ともにOECD 化学品試験法ガイドラインで定められた投与量の上限である2000 mg/kgに決定した。また、これをもとにして公比2で減じ、中用量を1000 mg/kg、さらに低用量を500 mg/kgと決定した。

【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。DMPDの投与量は各群ともに高用量の2000 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1992年11月16日に行い、投与時体重範囲は、雄で25～29 g、雌で19～22 gであった。

3) 標本の作製

小核の観察のための標本を、Schmid^{1, 2)}の方法に従って作製した。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2枚の標本）し、室温で自然乾燥した。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〔リン酸緩衝液（pH 6.8）で5%に希釈したギムザ液（Merck, Art. 9204、ロット番号：11194708）で25分間〕を行った後、リン酸緩衝液（pH 6.8）、0.004%クエン酸水溶液および蒸留水で順次すすぎ、自然乾燥した。

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、自然乾燥後5分間メタノールで固定し、上記ギムザ液で25分間染色し、リン酸緩衝液（pH 6.8）および蒸留水で順次すすぎ、自然乾燥した。標本の作製は1992年11月17～19日に、染色は同年11月19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、Fisher の正確確率検定法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。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

雄および雌の小核予備試験の結果をそれぞれ Table 3 および 4 に示す。小核出現頻度は、雄雌ともに24時間群と他の群との間に統計学的な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、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DMPDの標本作製時期は、雄雌ともに投与後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。

- 1) 溶媒対照群 (0.5% CMC Na 水溶液)
- 2) DMPD 500 mg/kg 投与群
- 3) DMPD 1000 mg/kg 投与群
- 4) DMPD 2000 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 Co.、ロット番号 : 70H0948) は、局方生理食塩液 (株) 大塚製薬工場、製造番号 : K1E78) に溶解して所定の濃度に調製した。雄の投与は、1992年11月24日に行い、投与時体重範囲は24~29 gであった。雌の投与は、1992年12月1日に行い、投与時体重範囲は19~24 gであった。

なお、1992年12月24日に当研究所で調製検体の、室温遮光条件下における安定性試験を実施した。すなわち、D M P D を 0.5% C M C Na 水溶液に懸濁して 25 mg/ml 溶液 (投与容量をマウスの体重 kg 当たり 20 ml とした場合に 500 mg/kg に相当) および 100 mg/ml 溶液 (同 2000 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4時間後の含量を測定した。その結果、調製検体の調製4時間後の含量比は調製時のそれぞれ 96.5 および 99.2% であり、室温遮光条件下では、調製後4時間安定であることが確認された (Appendix 1)。

また、雄の小核本試験における、低用量群および高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それぞれ 105 および 113%、サンプル間のばらつきは平均値の 4 % 以内であった (Appendix 2)。これらの値は当研究所の基準 (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 (雄 : 1992年11月25日、雌 : 1992年12月2日) に行った。染色は、雄では、同年11月26日、雌では、同年12月3日に行った。

4) 有意差検定

雄雌それぞれの小核出現頻度について、Fisher の正確確率検定法により、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 の補正を行った。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⁾を5%水準で行った。また、赤血球中に占める網赤血球の割合について、雄雌につき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5%水準で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 5 および 6 に示す。雄および雌の溶媒対照群と陽性対照群の小核出現頻度は、それぞれの過去5年間の背景データのばらつきの範囲内（平均値 $\pm 3 \times$ 標準偏差）であった。Fisher の正確確率検定法（Bonferroni の補正）による有意差検定の結果、雄および雌マウスの小核出現頻度はDMPDのいずれの投与群においても、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なかった。更に、Cochran-Armitage の傾向検定の結果においても、DMPD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、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、DMPD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、本試験条件下では被験物質DMPDは、雄および雌マウスの骨髓細胞において、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ず、また骨髓細胞の増殖抑制作用も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) 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.
- 4) 同 pp. 67-69.

Table 1. Mortality of BDF₁ male mice after single administration of DMPD by gavage.

Dose (mg/kg)	Number of mice administered	Number of mice died				Mortality
		Days after administration				
		0	1	2	3	
750	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 BDF₁ female mice after single administration of DMPD by gavage

Dose (mg/kg)	Number of mice administered	Number of mice died				Mortality
		Days after administration				
		0	1	2	3	
750	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 DMPD (2000 mg/kg) by gavage

Time after administration	Animal	Number of		Number of	
	No.	a		b	
		RCT	ERY	MNPCE	PCE
24 hrs	1	615	/ 1000	3	/ 2000
	2	578	/ 1000	5	/ 2000
	3	617	/ 1000	1	/ 2000
	4	534	/ 1000	3	/ 2000
	5	620	/ 1000	8	/ 2000
	Total	2964	/ 5000	20	/ 10000
	%(Mean±S.D.)	(59.3 ± 3.7)		(0.20 ± 0.13)	
48 hrs	6	551	/ 1000	5	/ 2000
	7	482	/ 1000	4	/ 2000
	8	631	/ 1000	1	/ 2000
	9	642	/ 1000	3	/ 2000
	10	508	/ 1000	2	/ 2000
	Total	2814	/ 5000	15	/ 10000
	%(Mean±S.D.)	(56.3 ± 7.2)		(0.15 ± 0.08)	
72 hrs	11	465	/ 1000	6	/ 2000
	12	479	/ 1000	2	/ 2000
	13	529	/ 1000	0	/ 2000
	14	519	/ 1000	8	/ 2000
	15	597	/ 1000	4	/ 2000
	Total	2589	/ 5000	20	/ 10000
	%(Mean±S.D.)	(51.8 ± 5.2)		(0.20 ± 0.16)	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

Table 4. Results of preliminary micronucleus test in BDF₁ female mice after single administration of DMPD (2000 mg/kg) by gavage

Time after administration	Animal	Number of ^a		Number of ^b	
	No.	RCT	ERY	MNPCE	PCE
24 hrs	51	669	1000	3	2000
	52	677	1000	3	2000
	53	540	1000	1	2000
	54	611	1000	4	2000
	55	534	1000	4	2000
	Total	3031	5000	15	10000
	%(Mean±S.D.)	(60.6 ± 6.8)		(0.15 ± 0.06)	
48 hrs	56	560	1000	3	2000
	57	581	1000	1	2000
	58	516	1000	2	2000
	59	473	1000	1	2000
	60	646	1000	1	2000
	Total	2776	5000	8	10000
	%(Mean±S.D.)	(55.5 ± 6.6)		(0.08 ± 0.04)	
72 hrs	61	678	1000	0	2000
	62	584	1000	2	2000
	63	499	1000	2	2000
	64	485	1000	2	2000
	65	509	1000	4	2000
	Total	2755	5000	10	10000
	%(Mean±S.D.)	(55.1 ± 8.1)		(0.10 ± 0.07)	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

Table 5. Results of micronucleus test in BDF₁ male mice after single administration of DMPD by gavage

Group	Animal No.	a	b
		RCT / ERY	MNPCE / PCE
Solvent control 0.5 % CMC Na	1	628 / 1000	3 / 2000
	2	570 / 1000	4 / 2000
	3	501 / 1000	3 / 2000
	4	615 / 1000	4 / 2000
	5	571 / 1000	3 / 2000
	Total	2885 / 5000	17 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(57.7 ± 5.0)	(0.17 ± 0.03)
DMPD 500 mg/kg	6	446 / 1000	2 / 2000
	7	546 / 1000	2 / 2000
	8	642 / 1000	1 / 2000
	9	428 / 1000	2 / 2000
	10	530 / 1000	4 / 2000
	Total	2592 / 5000	11 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(51.8 ± 8.6)	(0.11 ± 0.05)
DMPD 1000 mg/kg	11	614 / 1000	3 / 2000
	12	563 / 1000	1 / 2000
	13	713 / 1000	2 / 2000
	14	382 / 1000	3 / 2000
	15	386 / 1000	5 / 2000
	Total	2658 / 5000	14 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(53.2 ± 14.5)	(0.14 ± 0.07)
DMPD 2000 mg/kg	16	615 / 1000	2 / 2000
	17	585 / 1000	3 / 2000
	18	698 / 1000	4 / 2000
	19	725 / 1000	3 / 2000
	20	639 / 1000	2 / 2000
	Total	3262 / 5000	14 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(65.2 ± 5.8)	(0.14 ± 0.04)
Positive control CPA 50 mg/kg	21	439 / 1000	45 / 2000
	22	536 / 1000	38 / 2000
	23	611 / 1000	41 / 2000
	24	505 / 1000	43 / 2000
	25	280 / 1000	31 / 2000
	Total	2371 / 5000	198 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(47.4 ± 12.5)	(1.98 ± 0.27) *

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

CPA: Cyclophosphamide

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

Table 6. Results of micronucleus test in BDF₁ female mice after single administration of DMPD by gavage

Group	Animal No.	a	b
		RCT / ERY	MNPCE / PCE
Solvent control 0.5 % CMC Na	51	654 / 1000	1 / 2000
	52	543 / 1000	1 / 2000
	53	754 / 1000	0 / 2000
	54	645 / 1000	2 / 2000
	55	616 / 1000	2 / 2000
	Total	3212 / 5000	6 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(64.2 ± 7.6)	(0.06 ± 0.04)
DMPD 500 mg/kg	56	618 / 1000	4 / 2000
	57	641 / 1000	4 / 2000
	58	498 / 1000	2 / 2000
	59	577 / 1000	2 / 2000
	60	337 / 1000	1 / 2000
	Total	2671 / 5000	13 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(53.4 ± 12.3)	(0.13 ± 0.07)
DMPD 1000 mg/kg	61	686 / 1000	4 / 2000
	62	787 / 1000	4 / 2000
	63	719 / 1000	3 / 2000
	64	502 / 1000	0 / 2000
	65	599 / 1000	4 / 2000
	Total	3293 / 5000	15 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(65.9 ± 11.1)	(0.15 ± 0.09)
DMPD 2000 mg/kg	66	640 / 1000	2 / 2000
	67	729 / 1000	0 / 2000
	68	789 / 1000	3 / 2000
	69	344 / 1000	2 / 2000
	70	567 / 1000	0 / 2000
	Total	3069 / 5000	7 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(61.4 ± 17.3)	(0.07 ± 0.07)
Positive control CPA 50 mg/kg	71	548 / 1000	19 / 2000
	72	485 / 1000	27 / 2000
	73	664 / 1000	24 / 2000
	74	449 / 1000	12 / 2000
	75	535 / 1000	37 / 2000
	Total	2681 / 5000	119 / 10000
	%(Mean±S.D.)	(53.6 ± 8.2)	(1.19 ± 0.47) *

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

CPA: Cyclophosphamide

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

Stability of the test article in the preparation

Test article : DMPD
Lot No. : AR8
Carrier : 0.5% CMC Na

Date of preparation: Dec. 24, 1992
Date of determination
A : Dec. 24, 1992
B : Dec. 24, 1992
Condition for storage :
ambient temp., shading

Indicated formulation (mg/ml)	A (0 hr)			B (4 hr)		
	Sample No.	Found-1 (mg/ml)	Content (%) ^{a)}	Sample No.	Found-2 (mg/ml)	Content (%) ^{b)}
25	1	26.74	107	4	25.38	96.3
"	2	26.26	105	5	25.39	96.4
"	3	26.07	104	6	25.48	96.7
	mean	26.35	105	mean		96.5
100	7	111.8	112	10	109.8	101
"	8	106.0	106	11	109.9	101
"	9	109.9	110	12	104.3	95.5
	mean	109.2	109	mean		99.2

^{a)} : Found-1/Indicated Formulation $\times$ 100

^{b)} : Found-2/mean Found-1 $\times$ 100

Investigator

Director, Chemistry Dept.

Appendix 2.

Content and uniformity of the test article in the preparation

Test article : DMPD

Lot No. : AR8

Date of preparation : Nov. 24, 1992

Carrier : 0.5% CMC Na

Date of determination : Nov. 24, 1992

Sample No.	Indicated Formulation (A) (mg/ml)	Found (B) (mg/ml)	B/A×100 (%)	Mean (%)
1	25	28.84	115	113
2	"	27.36	109	
3	"	28.43	114	
4	100	106.4	106	105
5	"	104.7	105	
6	"	105.3	105	

Investigator

Director, Chemistry Dept.

