

3-ニトロ
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
〔毒性予備試験- 1〕	5
1. 方 法	5
2. 結 果	6
〔毒性予備試験- 2〕	6
1. 方 法	6
2. 結 果	7
小核予備試験 (標本作製時期の決定)	8
1. 方 法	8
2. 結 果	10
小核本試験	10
1. 方 法	10
2. 結果および考察	12
結 論	13
特記事項	13
文 献	14

Tables 1 ~12

【要 約】

被験物質 3-ニトロベンゼナミン (NBA) 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

NBAの毒性予備試験を行った結果、NBAの Crj: BDF₁ 雄および雌マウスにおける最大耐量は、300 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NBAの高用量を雄雌ともに 300 mg/kg とした。

2. 小核予備試験

NBAの 300 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を作製した。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48および72時間群、雌では72時間群において最高値を示し、雌では72時間群の小核出現頻度が5%水準で有意に高かった。網赤血球の比率を指標とした骨髓細胞の増殖抑制は、雄雌ともに明らかではなかった。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72時間と決定した。

3. 小核本試験

NBAの 75、150 および 300 mg/kg を雄および雌マウスにそれぞれ投与し、投与後72時間目に骨髓の塗抹標本を作製した。標本観察の結果、雄ではNBAの 300 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、用量依存性も認められた。雌では、NBAの 300 mg/kg において、小核出現頻

度の有意な増加が認められたものの、用量依存性は明らかでなかった。赤血球中に占める網赤血球の比率は、雄雌ともにNBA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、NBAは、本試験条件下でBDF₁雄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すと結論した。しかし、雌マウスではこれらの作用を示す明らかな証拠は得られなかった。骨髓細胞の増殖抑制作用は、雌雄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-ニトロ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-1	1991年 9月11日	雄雌各 47 匹
毒性予備試験-2	1991年 9月25日	" 73 匹
小核予備試験	1991年10月16日	" 36 匹
小核本試験	1991年11月20日	" 36 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-ニトロベンゼナミン

(3-Nitrobenzenamine)

(CAS No.) 99-09-2

(別 名) m-Nitroaniline, 3-Nitroaniline, m-Nitrophenylamine

Fast Orange R Salt

(ロット番号)

(分子式) $C_6H_6N_2O_2$

(分子量) 138.14

(性状) 淡橙黄色結晶、水に難溶、エタノール、メタノールおよびエーテルに可溶、沸点 306℃、融点 112~114℃

(純度) 99.9%

(提供者)

(入手年月日) 1991年7月12日

(保管条件) 気密容器で遮光

【毒性予備試験（投与量の決定）】

〔毒性予備試験-1〕

1. 方法

1) 実験群の設定

小核試験に用いる被験物質 3-ニトロベンゼナミン (NBA) 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6群を設け、投与量をそれぞれ、0 (溶媒対照: 0.5% CMC Na水溶液 (和光純薬工業、ロット番号: PDG0642))、500、750、1000、1250 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 20 ml とした。最高用量の投与検体は被験物質 NBA の所要量を正確に採取し、0.5% CMC Na 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。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。投与は、雄雌ともに1991年9月25日に行い、投与時体重範囲は雄で24～29 g、雌で20～24 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9月25～28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

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、NBAを投与した雄雌のすべての群において、自発運動の低下、伏臥、振戦、よろめき歩行が見られ、1250 mg/kg以上の投与群では、横臥や呼吸促進も観察された。死亡例は、NBAを投与した全ての群で認められ、750 mg/kg以上の投与群では、ほとんどの個体が死亡した(Tables 1, 2)。死亡確認日は、500 mg/kg投与群では3日目、750 mg/kg以上の投与群では、1から3日目にわたっていた。生存個体においては、体重の減少も認められた(Tables 3, 4)。以上の結果からは、NBA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求められなかった。そこで、500 mg/kgを最高用量として再度毒性予備試験を実施することとした。

(毒性予備試験-2)

1. 方法

1) 実験群の設定

雄雌ともに各5匹ずつからなる7群を設け、投与量をそれぞれ、0（溶媒対照：0.5% CMC Na 水溶液）、50、100、200、300、400 および 500 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-1の場合と同様に行った。投与は、雄雌ともに1991年10月2日に行い、投与時体重範囲は、雄で23~28g、雌で19~23g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10月2~5日）。また、マウスの体重は投与時と3日目の試験終了時に測定した。

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、毒性予備試験-1の場合と同様に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、NBAを投与した群では、雄で100 mg/kg、雌で200 mg/kg以上の投与により自発運動の低下が認められ、用量の増加とともに、伏臥、よろめき歩行、振戦などの毒性徴候が現れた。死亡例は、雄雌ともに400 mg/kg以上の投与群で3日目に認められた（Tables 5, 6）。生存個体においては、雄で200 mg/kg、雌で300 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 7, 8）。以上の結果から、NBA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300 mg/kgであると結論した。

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NBAの高用量を、雄雌ともに最大耐量の 300 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 150 mg/kg、さらに低用量を 75 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。NBAの投与量は各群ともに高用量の 300 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10月28日に行い、投与時体重範囲は、雄で26～29 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^(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 0.5gとシュウ酸カリウム 1.6gを100ml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10月29～31日に、染色は同年11月1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 9 および 10 に示す。小核出現頻度は、雄雌ともに経時的に増加し、雄では48および72時間群、雌では72時間群に最高値を示した。有意差検定の結果、雄では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が、雌では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。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、雄雌ともに投与後72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、雄雌とも
に別の2匹にNBAの300 mg/kgを投与した。

- 1) 溶媒対照群 (0.5% CMC Na 水溶液)
- 2) NBA 75 mg/kg 投与群
- 3) NBA 150 mg/kg 投与群
- 4) NBA 300 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1991年12月2日に行い、投与時体重範囲は、雄で24~28 g、雌で19~22 gであった。

なお、1991年8月19~26日に当研究所で調製検体の、冷暗所密封条件下における安定性試験を実施した。すなわち、NBAを0.5% CMC Na水溶液に懸濁して0.2 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4 mg/kg に相当) および20 mg/ml 溶液 (同400 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、4日後および7日後の含量を測定した。その結果、両調製検体の調製4日後の平均含量比は調製時のそれぞれ106 および98.9%、7日後はそれぞれ107 および99.3% であり (Appendix 1)、上記の条件下では、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それぞれ103 および97.3%、サンプル間のばらつきは平均値の0.7% 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 \pm 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72時間 (1991

年12月5日)に、陽性対照群については、試験計画書の記載に従って投与後24時間(同年12月3日)に行った。染色は同年12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、NBA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、NBA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

雄では、NBAの300 mg/kg 投与群に1例の死亡が認められたために、予備個体を充当した。雌では死亡例は認められなかった。雄および雌の小核本試験の結果をそれぞれ Table 11 および 12 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、NBAの300 mg/kg 投与群の値が、溶媒対照群より5%水準で有意に高かった。更に、Cochran-Armitage の傾向検定の結果、NBAの用量に依存した、5%水準で有意な増加傾向が認められた。したがって、NBAは雄マウスの骨髄細胞に小核を誘発するものと考えられる。小核本試験の300mg/kg 投与群の小核出現頻度(0.80%)は、小核予備試験での値(0.25%)と比べるとかなり高く、個体ごとのばらつきも大きかった。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、NBAの300 mg/kg 投与群の値が、溶媒対照群より有意に高

かったが、傾向検定の結果は、NBAの用量に依存した有意な増加傾向を示さなかった。したがって、雌マウスの骨髓細胞における小核誘発性を示す明らかな証拠は得られなかった。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、雄ではNBAの75 mg/kg 投与群において、溶媒対照群に比べ5%水準で有意に低い値を示した。しかし、その値(47.0%)は、当研究所が過去5年間に51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(45.0 ~ 62.7%)を越えておらず、また150 mg/kg 以上の投与群で有意な低下が見られなかった。雌では、NBA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、NBAは、本試験条件下でBDF₁雄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すと結論した。しかし、雌マウスではこれらの作用を示す明らかな証拠は得られなかった。骨髓細胞の増殖抑制作用は、雌雄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-nitrobenzen-amine 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
500	5	0	0	0	2	2 / 5
750	5	0	4	0	1	5 / 5
1000	5	0	5	---	---	5 / 5
1250	5	0	3	1	1	5 / 5
1500	5	0	3	0	1	4 / 5

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

Dose (mg/kg)	Number of mice administered	Number of mice died			Mortality
		0	1	2	
0	5	0	0	0	0 / 5
500	5	0	0	0	3 / 5
750	5	0	1	1	3 / 5
1000	5	0	4	1	5 / 5
1250	5	0	1	0	4 / 5
1500	5	0	5	---	5 / 5

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

Dose (mg/kg)	Body weight (g)		
	^a Initial	^a Final	^a Gain
0	25.7 ± 1.0 (5)	26.1 ± 1.1 (5)	0.4 ± 0.4 (5)
500	26.9 ± 1.5 (5)	23.6 ± 3.3 (3)	-3.1 ± 1.5 (3)
750	26.1 ± 0.9 (5)	----- (0)	----- (0)
1000	25.5 ± 0.7 (5)	----- (0)	----- (0)
1250	27.4 ± 0.6 (5)	----- (0)	----- (0)
1500	26.4 ± 0.5 (5)	24.4 (1)	-2.2 (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 4. Body weight change of BDF1 female mice after single administration of 3-nitrobenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Body weight (g)		
	^a Initial	^a Final	^a Gain
0	22.0 ± 0.5 (5)	22.6 ± 0.6 (5)	0.5 ± 0.5 (5)
500	22.0 ± 0.8 (5)	17.6 ± 0.7 (2)	-5.0 ± 0.1 (2)
750	22.1 ± 1.3 (5)	----- (0)	----- (0)
1000	21.4 ± 1.1 (5)	----- (0)	----- (0)
1250	22.2 ± 1.0 (5)	21.9 (1)	-0.8 (1)
1500	21.7 ± 0.7 (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. Mortality of BDF1 male mice after single administration of 3-nitrobenzen-amine 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 / 5
50	5	0	0	0	0 / 5
100	5	0	0	0	0 / 5
200	5	0	0	0	0 / 5
300	5	0	0	0	0 / 5
400	5	0	0	2	2 / 5
500	5	0	0	2	2 / 5

Table 6. Mortality of BDF1 female mice after single administration of 3-nitrobenzen-amine 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
50	5	0	0	0	0	0 / 5
100	5	0	0	0	0	0 / 5
200	5	0	0	0	0	0 / 5
300	5	0	0	0	0	0 / 5
400	5	0	0	0	4	4 / 5
500	5	0	0	0	5	5 / 5

Table 7. Body weight change of BDF1 male mice after single administration of 3-nitrobenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Body weight (g)		
	^a Initial	^a Final	^a Gain
0	24.5 ± 1.1 (5)	24.8 ± 1.0 (5)	0.3 ± 0.5 (5)
50	24.8 ± 1.2 (5)	24.3 ± 1.1 (5)	-0.5 ± 0.4 (5)
100	25.4 ± 0.6 (5)	24.5 ± 0.7 (5)	-0.9 ± 0.8 (5)
200	25.3 ± 0.8 (5)	20.0 ± 0.7 (5)	-5.3 ± 1.2 (5)
300	25.7 ± 0.5 (5)	20.7 ± 0.5 (5)	-5.1 ± 0.5 (5)
400	26.3 ± 1.2 (5)	21.0 ± 0.7 (3)	-5.8 ± 0.5 (3)
500	25.4 ± 0.9 (5)	21.1 ± 0.4 (3)	-4.7 ± 0.4 (3)

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 8. Body weight change of BDF1 female mice after single administration of 3-nitrobenzenamine by gavage

Dose (mg/kg)	Body weight (g)		
	^a Initial	^a Final	^a Gain
0	20.6 ± 0.5 (5)	21.0 ± 0.7 (5)	0.4 ± 0.5 (5)
50	21.2 ± 1.1 (5)	20.7 ± 0.9 (5)	-0.4 ± 0.6 (5)
100	20.5 ± 1.1 (5)	20.4 ± 1.0 (5)	-0.1 ± 0.9 (5)
200	20.6 ± 0.9 (5)	20.0 ± 0.5 (5)	-0.6 ± 1.0 (5)
300	20.6 ± 0.7 (5)	16.9 ± 0.5 (5)	-3.7 ± 1.1 (5)
400	21.2 ± 0.5 (5)	17.2 (1)	-4.5 (1)
500	20.6 ± 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 9. Results of preliminary micronucleus test in BDF1 male mice after single administration of 3-nitrobenzenamine (300 mg/kg) by gavage

Time after administration	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
24 hrs	1	647 / 1000		1 / 2000	
	2	572 / 1000		3 / 2000	
	3	589 / 1000		5 / 2000	
	4	548 / 1000		5 / 2000	
	5	597 / 1000		1 / 2000	
	Total	2953 / 5000		15 / 10000 -	
	%(Mean±S.D.)	(59.1 ± 3.7)		(0.15 ± 0.10)	
48 hrs	6	589 / 1000		3 / 2000	
	7	564 / 1000		3 / 2000	
	8	619 / 1000		3 / 2000	
	9	624 / 1000		11 / 2000	
	10	552 / 1000		5 / 2000	
	Total	2948 / 5000		25 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(59.0 ± 3.2)		(0.25 ± 0.17)	
72 hrs	11	552 / 1000		5 / 2000	
	12	630 / 1000		4 / 2000	
	13	674 / 1000		10 / 2000	
	14	629 / 1000		4 / 2000	
	15	575 / 1000		2 / 2000	
	Total	3060 / 5000		25 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(61.2 ± 4.9)		(0.25 ± 0.15)	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

Table 10. Results of preliminary micronucleus test in BDF1 female mice after single administration of 3-nitrobenzenamine (300 mg/kg) by gavage

Time after administration	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
24 hrs	51	547 / 1000		2 / 2000	
	52	650 / 1000		2 / 2000	
	53	502 / 1000		0 / 2000	
	54	634 / 1000		2 / 2000	
	55	710 / 1000		4 / 2000	
	Total	3043 / 5000		10 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(60.9 ± 8.3)		(0.10 ± 0.07)	
48 hrs	56	624 / 1000		0 / 2000	
	57	605 / 1000		4 / 2000	
	58	658 / 1000		2 / 2000	
	59	684 / 1000		1 / 2000	
	60	562 / 1000		2 / 2000	
	Total	3133 / 5000		9 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(62.7 ± 4.7)		(0.09 ± 0.07)	
72 hrs	61	626 / 1000		2 / 2000	
	62	680 / 1000		11 / 2000	
	63	635 / 1000		2 / 2000	
	64	717 / 1000		8 / 2000	
	65	732 / 1000		3 / 2000	
	Total	3390 / 5000		26 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(67.8 ± 4.7)		(0.26 ± 0.20)*	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

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

Table 11. Results of micronucleus test in BDF1 male mice after single administration of 3-nitrobenzenamine by gavage

Group	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY	MNPCE / PCE		
Solvent control 0.5% CMC Na	1	541 / 1000	2 / 2000		
	2	601 / 1000	5 / 2000		
	3	576 / 1000	2 / 2000		
	4	539 / 1000	3 / 2000		
	5	554 / 1000	2 / 2000		
	Total	2811 / 5000	14 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(56.2 ± 2.6)	(0.14 ± 0.07)		
NBA 75 mg/kg	6	421 / 1000	2 / 2000		
	7	529 / 1000	4 / 2000		
	8	517 / 1000	2 / 2000		
	9	447 / 1000	3 / 2000		
	10	438 / 1000	1 / 2000		
	Total	2352 / 5000	12 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(47.0 ± 4.9) *	(0.12 ± 0.06)		
NBA 150 mg/kg	11	574 / 1000	6 / 2000		
	12	510 / 1000	5 / 2000		
	13	535 / 1000	3 / 2000		
	14	541 / 1000	4 / 2000		
	15	543 / 1000	6 / 2000		
	Total	2703 / 5000	24 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(54.1 ± 2.3)	(0.24 ± 0.07)		
NBA 300 mg/kg	16	592 / 1000	2 / 2000		
	17	576 / 1000	13 / 2000		
	18	597 / 1000	9 / 2000		
	19	520 / 1000	44 / 2000		
	20	551 / 1000	12 / 2000		
	Total	2836 / 5000	80 / 10000		
	%(Mean±S.D.)	(56.7 ± 3.2)	(0.80 ± 0.81) *		
Positive control CPA 50 mg/kg	21	452 / 1000	37 / 2000		
	22	355 / 1000	22 / 2000		
	23	384 / 1000	68 / 2000		
	24	322 / 1000	50 / 2000		
	25	383 / 1000	38 / 2000		
	Total	1896 / 5000	215 / 10000		
%(Mean±S.D.)	(37.9 ± 4.8) *	(2.15 ± 0.86) *			

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

NBA: 3-Nitrobenzenamine, CPA: Cyclophosphamide

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

Table 12. Results of micronucleus test in BDF1 female mice after single administration of 3-nitrobenzenamine by gavage

Group	Animal No.	a		b	
		RCT / ERY		MNPCE / PCE	
Solvent control 0.5% CMC Na	51	706 / 1000		2 / 2000	
	52	683 / 1000		2 / 2000	
	53	607 / 1000		2 / 2000	
	54	716 / 1000		5 / 2000	
	55	591 / 1000		2 / 2000	
	Total	3303 / 5000		13 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(66.1 ± 5.8)		(0.13 ± 0.07)	
NBA 75 mg/kg	56	667 / 1000		2 / 2000	
	57	648 / 1000		3 / 2000	
	58	497 / 1000		3 / 2000	
	59	694 / 1000		3 / 2000	
	60	729 / 1000		1 / 2000	
	Total	3235 / 5000		12 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(64.7 ± 8.9)		(0.12 ± 0.04)	
NBA 150 mg/kg	61	817 / 1000		2 / 2000	
	62	781 / 1000		0 / 2000	
	63	758 / 1000		2 / 2000	
	64	577 / 1000		1 / 2000	
	65	604 / 1000		1 / 2000	
	Total	3537 / 5000		6 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(70.7 ± 10.9)		(0.06 ± 0.04)	
NBA 300 mg/kg	66	723 / 1000		0 / 2000	
	67	830 / 1000		10 / 2000	
	68	506 / 1000		5 / 2000	
	69	606 / 1000		4 / 2000	
	70	707 / 1000		6 / 2000	
	Total	3372 / 5000		25 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(67.4 ± 12.3)		(0.25 ± 0.18)*	
Positive control CPA 50 mg/kg	71	468 / 1000		35 / 2000	
	72	495 / 1000		24 / 2000	
	73	525 / 1000		48 / 2000	
	74	507 / 1000		39 / 2000	
	75	485 / 1000		35 / 2000	
	Total	2480 / 5000		181 / 10000	
	%(Mean±S.D.)	(49.6 ± 2.2)*		(1.81 ± 0.43)*	

a: Number of reticulocytes / total number of erythrocytes observed

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

NBA: 3-Nitrobenzenamine, CPA: Cyclophosphamide

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