

(3) ニテンピラム原体のウサギにおける催奇形性試験

(資料 8-3)

試験機関：Pharmaco LSR Ltd.

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検体：ニテンピラム原体

検体純度：

供試動物：ニュージーランドホワイト系妊娠ウサギ（妊娠 0 日の体重 3.65～5.34 kg）、  
入荷時約 18～26 週齢、1 群 15～20 匹

投与期間：妊娠 6 日から 19 日までの 14 日間

投与方法：検体を逆浸透膜処理水に溶解し、25、80 および 250 mg/kg/日の投与量で妊娠 6 日<sup>\*)</sup> から妊娠 19 日までの 14 日間、毎日 1 回経口投与した。投与液量は最新の個体別体重をもとに 5 ml/kg の割合で投与した。なお、対照群には逆浸透膜処理水のみを同様に投与した。

\*)：授精日を妊娠 0 日とした。

[投与量設定根拠]

観察・検査項目：

母動物；試験期間を通じ、死亡、流産および一般症状の観察ならびに体重測定を毎日行い、観察された全ての投与に対する反応徴候はタイプ、程度、発現時期および期間の詳細とともに記録した。また、飼料摂取量を各動物について記録した（妊娠 1～5、6～12、13～19、20～23 および 24～28 日）。妊娠 29 日にペントバルビタールナトリウムの静脈内注射により屠殺し、疾病の形跡または投与に対する有害反応について肉眼的に検査した。卵巣と子宮を検査し、黄体数、着床数、吸収胚数（早期または後期に分類）、各子宮角における生存および死亡胎児数と分布を記録した。

生存胎児；胎児の個体別体重および個体別胎盤重量を測定し、各胎児および胎盤の外表異常を検査した。全ての胎児はペントバルビタールナトリウムの皮下注射により屠殺し、頸部、胸腔および腹腔を解剖して内部を検査し、性別を記録した。

申請者注 1：投与量設定根拠について

報告書中には詳細な記載がなかったが、この試験に先立つ予備試験が実施されていたことから、申請者が追記した。

各腹の1/3の胎児は断頭し、頭部はブアン液中で固定した後フリーハンド連続切片を検査した。胴体と残りの胎児は工業用変性アルコール中で固定した後Dawsonのアリザリン染色法の変法を用いて処理し、骨格を検査した。

結 果：概要を次頁の表に示した。

母動物；250 mg/kg 群で投与期間中に排便減少を認めた動物数が増加し、投与開始後の初期に顕著な体重減少とその後の持続的な低い体重推移を示したが、投与期間終了後に回復した。80 mg/kg 群の体重は投与期間終了後に対照群と比較してわずかに低値を示したが、統計学的な差はなく、通常ウサギでみられるばらつきを反映したものと考えられた。25 mg/kg 群の体重は試験期間を通じて対照群と差はなかった。

飼料摂取量は、80 および 250 mg/kg 群で投与期間中減少したが、250 mg/kg 群では投与期間終了後に飼料摂取量の増加がみられ、体重の動向と合致した。80 mg/kg 群では対照群と比較して統計学的な差はみられなかった。25 mg/kg 群の飼料摂取量には検体投与による影響は認められなかった。

試験期間中に4匹(25 mg/kg 群：2匹、80 および 250 mg/kg 群：各1匹)が流産したが、その発現頻度から検体投与に関連したものではないと考えられた。妊娠29日の最終剖検では、検体投与に関連すると考えられる肉眼的変化は認められなかった。

帝王切開所見では250 mg/kg 群で胎盤重量の増加が認められた(対照群：5.0 g、250 mg/kg 群：5.8 g)。しかしながら、250 mg/kg 群の値は背景値(5.0~6.0 g、平均：5.7 g)に近似しており、一方、対照群の値は背景値の範囲の下限を示したことから、検体投与による影響を反映したものではないと考えられた。

生存胎児；子宮内での胎児の生存、成長および発育に検体投与の影響は認められなかった。

仙椎前椎骨数の増加および骨盤非対称が250 mg/kg 群の胎児に観察された。仙椎前椎骨数の増加については、対照群と比較して統計学的な差はないが、発現頻度が高値(対照群：15.7%、250mg/kg 群：32.4%)であり、また背景値(18.8~26.7%)も上回っていた。また、骨盤非対称の発現頻度も対照群と比較してわずかに増加した(対照群：4.5%、250 mg/kg 群：7.8%、背景値：2.6~8.1%)。その他の骨格形態の有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、ニテンピラム原体を妊娠ウサギの器官形成期に250 mg/kg 経口投与すると、体重減少、飼料摂取量減少および排便量の減少等、母動物に対する毒性を生じた。胎児では、統計学的有意性はみられないものの、仙椎前椎骨数の増加および骨盤非対称の発現頻度の増加が認められた。25 および 80 mg/kg では母動物の状態または子宮内での胎

児の生存率、発育および発生に対する有意な影響は認められなかった。したがって、ニテ  
ンピラム原体の母動物および胎児に対する無毒性量はどちらも 80 mg/kg/日であった。ま  
た、最高用量の 250 mg/kg/日においても催奇形性を示さなかった。

結果の概要

投与群 (mg/kg/日)		0	25	80	250	
1 群当たり動物数		20	15	19	15	
妊娠動物数		18	14	16	15	
母動物	死亡数	1	0	1	0	
	流産数	0	2	1	1	
	一般状態： 排便の減少	妊娠 1-6 日	0	0	0	0
		妊娠 7-20 日	4	4	5	10
		妊娠 21-29 日	8	10	5	9
	体重 変化 (kg)	妊娠 0-6 日	0.01±0.08	0.02±0.05	0.01±0.08	0.04±0.09
		妊娠 6-8 日	-0.01±0.05	0.02±0.04	-0.02±0.05	↓↓-0.07±0.04
		妊娠 6-10 日	0.00±0.07	0.00±0.04	0.01±0.07	↓↓-0.08±0.05
		妊娠 6-12 日	-0.01±0.10	0.02±0.05	0.01±0.08	↓-0.10±0.05
		妊娠 6-14 日	0.04±0.13	0.08±0.07	0.02±0.10	↓↓-0.09±0.09
		妊娠 6-16 日	0.08±0.15	0.10±0.10	0.05±0.12	↓↓-0.07±0.11
		妊娠 6-18 日	0.08±0.17	0.10±0.12	0.06±0.15	↓-0.08±0.10
		妊娠 6-20 日	0.10±0.19	0.08±0.15	0.05±0.18	↓-0.04±0.12
		妊娠 6-24 日	0.13±0.23	0.09±0.19	0.09±0.20	0.03±0.14
		妊娠 6-28 日	0.18±0.25	0.12±0.20	0.14±0.27	0.11±0.17
飼料 摂取量 (g/rabbit/ 日)	妊娠 1-5 日	137±29	142±24	147±19	151±30	
	妊娠 6-12 日	124±43	136±29	113±27	↓↓75±34	
	妊娠 13-19 日	115±57	117±44	87±55	↓76±32	
	妊娠 20-23 日	106±52	93±41	96±53	141±43	
	妊娠 24-28 日	89±41	82±33	89±32	↑125±44	
肉眼的病理検査		-		検体投与に起因した異常は認められなかった		

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

- : 対照群

体重変化、飼料摂取量は一元配置型分散分析および/または t 検定により対照群との有意差を検定した (↑↓: p < 0.05, ↑↑↓: p < 0.01, ↑↑↓↓: p < 0.001)

結果の概要 (つづき)

		投与群 (mg/kg/日)	0	25	80	250
母動物	着床所見	検査親動物数	17	14	15	15
		平均黄体数	10.9±1.8	10.8±2.1	10.4±2.1	10.2±1.9
		平均着床数	10.1±1.7	9.7±2.4	9.1±2.1	8.4±2.4
		平均生存胎児数	8.3±1.2	8.3±2.1	8.4±2.2	7.3±2.2
		平均吸収胚数	1.8±1.3	1.3±1.2	0.7±0.8	1.1±1.1
		群平均着床前死亡率 (%)	8.6	10.8	12.4	17.5
		群平均着床後死亡率 (%)	17.5	13.8	7.9	13.6
胎児		平均胎盤重量 (g)	5.0±0.3	5.3±0.3	5.4±0.4	5.8±0.3
		平均胎児重量 (g)	37.4±1.7	36.7±2.0	38.5±1.7	39.5±1.5
	剖検	検査胎児 (腹) 数	141 (17)	100 (12)	117 (14)	102 (14)
		眼球中心混濁	0.7 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
		口蓋小斑点黒色	0.0 (0)	1.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
		口蓋裂	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	6.3 (1)
		片側性前肢屈曲	0.0 (0)	0.0 (0)	1.4 (1)	0.9 (1)
		1 指欠損	0.0 (0)	0.0 (0)	1.4 (1)	0.0 (0)
		心臓付近の大動脈/肺動脈肥厚	0.7 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)
		胆嚢変形	6.0 (6)	4.5 (3)	7.2 (5)	2.1 (2)
		胃内ガス貯留	0.8 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
		両側性腎臓の空洞化	0.0 (0)	0.8 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
		片側性腎臓の空洞化	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)
		小型胎児 (32.0 g 未満)	20.5 (10)	21.0 (8)	14.7 (5)	18.9 (6)
		胎盤の一部退色	0.0 (0)	0.0 (0)	1.8 (1)	0.0 (0)
		胎盤周囲血液塊	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.4 (1)
		クリーム状沈殿物を伴う羊水白色	2.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)

胎児観察の数値は腹単位の発現頻度の平均値を表し、カッコ内の数値はその所見が発現した胎児を有する腹数を示す

対照群との有意差検定 (↑ ↓: p < 0.01)

一元配置型分散分析および/または t 検定: 胎児重量、胎盤重量、同腹児数

Mann-Whitney の U 検定: 黄体数、着床数、吸収胚数、着床前死亡率、着床後死亡率、胎児観察

群平均着床前死亡率 (%) = ((総黄体数 - 総着床数) / 総黄体数) × 100

群平均着床後死亡率 (%) = ((総着床数 - 総生存胎児数) / 総着床数) × 100

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	25	80	250
胎児 骨格 検査	頭蓋骨検査胎児 (腹) 数	95 (17)	67 (12)	79 (14)	67 (14)
	大泉門-狭小、縫合線のみのわずかな大きさ	0.0 (0)	2.9 (2)	1.4 (1)	4.2 (2)
	大泉門-小	46.4 (14)	58.4 (10)	55.4 (10)	43.9 (12)
	大泉門-中	52.6 (15)	38.8 (8)	39.0 (9)	51.9 (12)
	大泉門-大	1.0 (1)	0.0 (0)	4.2 (2)	0.0 (0)
	大泉門非対称または不整列	4.8 (3)	0.0 (0)	2.4 (1)	0.0 (0)
	小泉門増大	5.3 (3)	4.0 (2)	7.1 (2)	0.0 (0)
	頭頂間骨裂溝	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.4 (1)
	頭頂骨不連続未骨化部位	0.0 (0)	0.0 (0)	1.2 (1)	0.0 (0)
	頭頂骨裂溝	0.0 (0)	0.0 (0)	2.6 (2)	0.0 (0)
	前頭縫合の不均一骨化	2.6 (2)	4.7 (3)	2.6 (2)	1.4 (1)
	前頭骨-鼻骨接合部の前頭縫合増大	0.0 (0)	0.0 (0)	1.2 (1)	0.0 (0)
	涙嚢窩増大	1.2 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
	口蓋裂	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	5.7 (1)
	舌骨体不完全骨化または未骨化	22.8 (12)	23.8 (7)	32.6 (8)	26.2 (9)
	舌骨角内側屈曲、舌弓扁平	1.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
	第1頸椎体不完全骨化	0.0 (0)	0.0 (0)	4.0 (2)	1.0 (1)
	胸骨分節検査胎児 (腹) 数	141 (17)	100 (12)	117 (14)	102 (14)
	第1胸骨分節不完全骨化	32.3 (15)	39.9 (12)	31.7 (12)	26.7 (11)
	第2胸骨分節不完全骨化	5.8 (6)	13.9 (7)	8.4 (3)	4.1 (4)
	第3胸骨分節不完全骨化	3.2 (2)	0.0 (0)	2.0 (2)	0.0 (0)
	第4胸骨分節不完全骨化	2.5 (1)	1.2 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
	第5胸骨分節不完全骨化	0.0 (0)	0.0 (0)	1.4 (1)	0.0 (0)
1つ以上の胸骨分節配列異常	1.5 (2)	1.2 (1)	1.4 (2)	0.8 (1)	

胎児観察の数値は腹単位の発現頻度の平均値を表し、カッコ内の数値はその所見が発現した胎児を有する腹数を示す

胎児観察は Mann-Whitney の U 検定を用いて有意差を検定した

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	25	80	250
胎 児 骨 格 検 査	2つ以上の胸骨分節癒合	0.0 (0)	1.2 (1)	2.2 (2)	1.8 (2)
	第5と剣状突起間の胸骨分節過剰	0.0 (0)	0.0 (0)	0.7 (1)	1.0 (1)
	1つの胸骨分節二分骨化	0.8 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
	剣状突起分岐	0.7 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
	剣状突起異常な幅	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)
	肋骨検査胎児 (腹) 数	141 (17)	100 (12)	117 (14)	102 (14)
	肋骨 12/12	75.4 (16)	85.3 (11)	75.3 (14)	68.9 (13)
	肋骨 12/13	4.5 (6)	3.5 (2)	3.0 (3)	4.5 (4)
	肋骨 13/13	20.0 (9)	11.2 (4)	21.7 (9)	25.8 (9)
	13肋骨短小	7.3 (6)	3.5 (2)	9.6 (6)	4.9 (5)
	13肋骨浮遊	3.4 (5)	0.8 (1)	2.6 (3)	4.0 (3)
	13肋骨痕跡	1.3 (2)	3.1 (2)	0.0 (0)	1.2 (1)
	13肋骨痕跡浮遊	0.6 (1)	0.0 (0)	3.3 (4)	0.8 (1)
	肋軟骨接合部の1つ以上の肋骨の肥厚	8.2 (7)	8.3 (3)	5.8 (6)	20.1 (7)
	第5から第9肋骨の末端の肥厚および短小	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	7.1 (1)
	胸郭および脊柱の異常 <sup>a</sup>	0.0 (0)	1.2 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
	胸郭および脊柱の異常 <sup>b</sup>	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.8 (1)
	椎骨、四肢・肢帯骨検査胎児 (腹) 数	141 (17)	100 (12)	117 (14)	102 (14)
	第4胸椎体二分骨化	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.8 (1)
	仙椎肋骨不完全骨化または非対称	3.8 (4)	4.3 (4)	2.5 (2)	7.8 (4)
第16尾椎配列異常、尾端屈曲	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	

胎児観察の数値は腹単位の発現頻度の平均値を表し、カッコ内の数値はその所見が発現した胎児を有する腹数を示す

胎児観察は Mann-Whitney の U 検定を用いて有意差を検定した

a: 右第10および第11肋骨の1/2以上の癒合、第11胸椎の欠損

b: 13/14肋骨、14肋骨短小、左第1、2と第8、9および右第9、10肋骨癒合、左第2胸椎の半椎弓および半椎体欠損、第9胸椎の半椎弓小型、胸椎体二分骨化、第6胸椎体裂

結果の概要 (つづき)

投与群 (mg/kg/日)		0	25	80	250	
胎児	骨格検査	尾椎不完全骨化、16骨化未満	0.0 (0)	2.2 (2)	2.6 (2)	3.3 (2)
		仙椎前椎骨数 26	84.3 (17)	83.2 (12)	88.3 (14)	67.6 (13)
		仙椎前椎骨数 27	15.7 (10)	16.8 (6)	11.7 (7)	32.4 (9)
		四肢長骨先端不完全骨化	60.9 (16)	74.0 (12)	57.8 (14)	58.0 (13)
		肘頭突起骨化	0.7 (1)	0.0 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)
		片側または両側の中心骨不完全骨化または未骨化	8.5 (4)	8.6 (7)	7.9 (5)	2.3 (2)
		中手骨または指骨不完全骨化または未骨化	13.9 (8)	11.5 (5)	12.6 (6)	11.2 (5)
		半肢症*	0.0 (0)	0.0 (0)	1.4 (1)	0.0 (0)
		片側または両側の恥骨不完全骨化または未骨化	9.3 (5)	10.9 (6)	6.7 (4)	3.3 (2)
		骨盤非対称、異なる仙椎に付随した腸骨	4.5 (5)	5.5 (4)	0.0 (0)	7.8 (4)
	二重骨盤、両仙椎に付随した腸骨	4.5 (4)	5.6 (5)	3.2 (3)	2.3 (2)	
	頭部断面連続切片検査	頭部断面検査胎児 (腹) 数	46 (17)	33 (12)	38 (14)	35 (14)
		切歯萌出	76.5 (16)	87.5 (12)	62.5 (10)	88.1 (13)
		下顎切歯のみ萌出	13.7 (6)	8.3 (3)	22.6 (5)	0.0 (0)
切歯不萌出		9.8 (2)	4.2 (1)	14.9 (4)	11.9 (2)	
舌形態異常 ; 口蓋裂		0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	7.1 (1)	
片側性軽度網膜皺壁		3.9 (2)	6.9 (3)	0.0 (0)	4.8 (2)	
両側性軽度網膜皺壁		3.9 (2)	2.8 (1)	0.0 (0)	2.4 (1)	
片側性軽度小眼球症		0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	2.4 (1)	
延髄以外の脳領域の嚢胞性拡張		7.8 (3)	22.9 (6)	2.4 (1)	0.0 (0)	
延髄嚢胞性拡張		7.8 (3)	14.6 (4)	0.0 (0)	0.0 (0)	
副鼻腔 / 鼻咽頭血液貯留	2.9 (1)	2.1 (1)	3.6 (1)	0.0 (0)		
蝸牛血液貯留	10.8 (5)	22.9 (4)	8.3 (2)	8.3 (3)		

太枠内は検体投与の影響であることを示す。

胎児観察の数値は腹単位の発現頻度の平均値を表し、カッコ内の数値はその所見が発現した胎児を有する腹数を示す

胎児の観察は Mann-Whitney の U 検定を用いて有意差を検定した

a : 右橈骨欠損、第 1 および 2 指骨欠損、右屈曲



## 9. 変異原性

### (1) ニテンピラム原体の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 9-1)

試験機関：(財)化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1990年

検体：ニテンピラム原体

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体を蒸留水に溶解し、試験は2連制とし、プレート法により用量設定試験および本試験を各1回実施した。

用量設定根拠；

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず全ての検体処理群で、復帰突然変異コロニー数が濃度に依存して溶媒対照群の 2 倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム原体は本試験条件下で、代謝活性化の有無にかかわらず復帰変異誘発性を有しないと判断された。

用量設定試験

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

本試験

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (蒸留水)	0	-	109	7	44	19	6	
ニテンピラム 原体	313	-	101	7	42	26	9	
	625	-	94	8	41	16	6	
	1250	-	87	5	30	16	7	
	2500	-	103	7	39	15	4	
	5000	-	102	9	39	20	7	
溶媒対照 (蒸留水)	0	+	104	7	49	26	8	
ニテンピラム 原体	313	+	121	6	45	23	10	
	625	+	106	9	54	28	10	
	1250	+	106	8	49	21	12	
	2500	+	101	7	55	26	6	
	5000	+	117	6	52	28	9	
陽 性 対 照	AF-2	0.01	-	457	/	334	/	/
		0.1	-	/	/	/	487	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	387	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1096
	2AA	0.5	+	/	/	/	267	/
		1	+	1582	/	/	/	/
		2	+	/	491	/	/	200
20		+	/	/	1274	/	/	

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

2AA: 2-アミノアントラセン

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

(2) ニテンピラム原体のチャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL) を用いた *in vitro* 染色体異常試験

(資料 9-2)

試験機関：(財) 化学品検査協会  
[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検体：ニテンピラム原体

検体純度：

試験方法：チャイニーズハムスター肺由来培養細胞 (CHL 細胞) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で染色体異常誘発性を検定した。検体は純水に溶解し、S9 mix 存在下では 6 時間、非存在下では 24 時間および 48 時間、細胞を処理した。観察は 1 濃度あたり 200 個の分裂中期像について行った。

用量設定根拠：

試験結果：次頁の表に示した。

S9 mix の有無にかかわらず、いずれの濃度においても、溶媒対照群と比較して染色体異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加は認められなかった。倍数体細胞も、いずれの試験条件下でも増加しなかった。

一方、陽性対照として用いたマイトマイシン C (S9 mix 非存在下) およびシクロホスファミド (S9 mix 存在下) では、染色体異常を有する細胞の出現頻度に有意な増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム原体は本試験条件下では、代謝活性化系の有無にかかわらず染色体異常誘発性を有しないと判断された。

試験結果 (代謝活性化法によらない場合)

処理	処理時間 (h)	処理濃度 (µg/mL)	観察細胞数	倍数体数		染色体構造異常細胞の出現数と出現頻度 (%) *								
				出現数と出現頻度 (%) *	判定	ギャップ	染色分体型		染色体型		その他	合計		判定
							切断	交換	切断	交換		-g	+g	
溶媒対照 (純水)	24	0	200	0 (0.0)	-	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	-
	48	0	200	1 (0.5)	-	1 (0.5)	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	3 (1.5)	4 (2.0)	-
ニテンピラム原体	24	675	200	2 (1.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
		1350	200	1 (0.5)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
		2700	200	2 (1.0)	-	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	-
	48	675	200	1 (0.5)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
		1350	200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
		2700	200	1 (0.5)	-	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	-
陽性対照 (MMC)	24	0.05	200	1 (0.5)	-	6 (3.0)	47 (23.5)	91 (45.5)	7 (3.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	112 (56.0)	117 (58.5)	+
	48	0.05	200	1 (0.5)	-	10 (5.0)	41 (20.5)	84 (42.0)	3 (1.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	103 (51.5)	106 (53.0)	+

\*: 異常をもつ細胞の出現頻度%を ( ) に示す。ギャップ (g) には染色分体型と染色体型の両者を含める。合計で、(-g) にはギャップのみをもつ異常細胞を除いた総数と (%) を、(+g) にはギャップのみをもつ異常細胞を含む総数と (%) を示す。

1個の細胞中に数個の異常を持つ場合でも、1個の異常細胞として計算する。例えば、1個の細胞中に切断が2、交換が2ある場合には、異常細胞としては1、切断をもつ細胞としても1、交換をもつ細胞としても1として計算する。

その他: 断片化など (細粉化は除く)

MMC: マイトマイシンC

試験結果 (代謝活性化法による場合)

処理	S9 mix 有 無	処理濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	観察 細胞数	倍数体数		染色体構造異常細胞の出現数と出現頻度 (%) *								判定
				出現数と 出現頻度 (%) *	判定	ギャップ	染色分体型		染色体型		その他	合計		
							切断	交換	切断	交換		-g	+g	
溶媒対 照 (純水)	-	0	200	0 (0.0)	-	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	-
	+	0	200	1 (0.5)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
ニテン ピラム 原体	-	675	200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
		1350	200	1 (0.5)	-	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
		2700	200	1 (0.5)	-	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	-
	+	675	200	0 (0.0)	-	2 (1.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	4 (2.0)	-
		1350	200	1 (0.5)	-	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	-
		2700	200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	-
陽性対 照 (CP)	-	10	200	0 (0.0)	-	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	-
	+	10	200	1 (0.5)	-	6 (3.0)	31 (15.5)	63 (31.5)	4 (2.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	82 (41.0)	86 (43.0)	+

S9 濃度 (5%)、検体処理時間 (6 h)、検体処理後の細胞回復時間 (18 h)

\*: 異常をもつ細胞の出現頻度%を ( ) に示す。ギャップ (g) には染色分体型と染色体型の両者を含める。合計で、(-g) にはギャップのみをもつ異常細胞を除いた総数と (%) を、(+g) にはギャップのみをもつ異常細胞を含む総数と (%) を示す。

1 個の細胞中に数個の異常を持つ場合でも、1 個の異常細胞として計算する。例えば、1 個の細胞中に切断が 2、交換が 2 ある場合には、異常細胞としては 1、切断をもつ細胞としても 1、交換をもつ細胞としても 1 として計算する。

その他: 断片化など (細粉化は除く)

CP: シクロホスファミド

(3) ニテンピラム原体の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 9-3)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検体：ニテンピラム原体

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>、H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>、M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体を蒸留水に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム原体は本試験条件下で、代謝活性化の有無にかかわらず DNA 損傷の誘発性を有しないと判断された。

本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (蒸留水)	0	0	0	0	0
ニテンピラム原体	625	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0
	10000	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	6.0	6.5		
陽性 対照	AF-2	0.001	3.0	0	
	2AA	5			4.5 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン



(4) ニテンピラム原体のマウスを用いた小核試験

(資料 9-4)

試験機関: Microbiological Associates, Inc.

[GLP 対応]

報告書作成年: 1993 年

検 体: ニテンピラム原体

検体純度:

供試動物: ICR 系マウス (6~8 週齢、体重; 雄 28.4~36.4g、雌 22.0~28.5g)

1 群雌雄各 5 匹

試験方法: 検体を脱イオン水に溶解し、腹腔内単回投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。

溶媒対照群および検体投与群には、投与 24、48 及び 72 時間後に動物を屠殺し、各動物から大腿骨の骨髄を採取してスライドガラス上にメタノールで固定後、メイグリュンワルドーギムザ染色し骨髄標本を作製した。

陽性対照群はシクロホスファミド (CP) の脱イオン水溶液を同様に投与し、24 時間後に動物を屠殺し、検体投与群と同様に検査した。

各標本について、1000 個の多染性赤血球を観察して全多染性赤血球中の小核を有する細胞の出現頻度を調べた。また、骨髄細胞に対する毒性を調べるため、全赤血球 1000 個に対する多染性赤血球の比率を算出した。

投与量設定根拠:

試験結果: 骨髄標本の観察結果を次頁の表に示した。

いずれの検体投与群においても死亡例は認められなかったが、一般症状として、500mg/kg 群の雌において嗜眠が認められた。

いずれの検体投与群においても、溶媒対照群と比較して全赤血球に占める多染性赤血球の割合に差は認められなかった。

また、いずれの標本採取時間においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度に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。

一方、陽性対照の CP 投与群では小核を有する多染性赤血球の出現頻度に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

以上の結果より、本試験条件下において、ニテンピラム原体はマウス骨髄多染性赤血球に小核を誘発せず、陰性と判断された。

採取時間	薬物	投与量 (mg/kg)	性	観察動物数	MNPCE/PCE (%) (平均値±SD)	PCE/全赤血球 (平均値)	
24時間	陰性対照 (脱イオン水)	20 mL/kg	雄	5	0.2±0.45	0.58	
			雌	5	0.4±0.55	0.61	
	ニテンピラム原体	125	雄	5	0.2±0.45	0.54	
			雌	5	0.2±0.45	0.59	
		250	雄	5	0.4±0.55	0.48	
			雌	5	0.4±0.55	0.60	
		500	雄	5	0.0±0.00	0.52	
			雌	5	0.2±0.45	0.55	
	陽性対照 (シクロホスファミド)	30	雄	5	14.6±12.42 ↑	0.58	
			雌	5	11.0±4.47 ↑	0.58	
48時間	陰性対照 (脱イオン水)	20 mL/kg	雄	5	1.4±0.89	0.52	
			雌	5	1.4±1.14	0.56	
	ニテンピラム原体	125	雄	5	0.4±0.55	0.47	
			雌	5	1.4±0.89	0.56	
		250	雄	5	1.2±0.84	0.53	
			雌	5	0.6±0.89	0.58	
		500	雄	5	0.4±0.89	0.48	
			雌	5	1.6±0.89	0.54	
	72時間	陰性対照 (脱イオン水)	20 mL/kg	雄	5	0.6±0.89	0.52
				雌	5	1.0±1.00	0.31
ニテンピラム原体		125	雄	5	1.6±2.19	0.58	
			雌	5	1.4±1.52	0.50	
		250	雄	5	0.8±1.30	0.60	
			雌	5	0.8±0.84	0.53	
		500	雄	5	1.2±1.30	0.46	
			雌	5	1.4±1.14	0.46	

Kastenbaum-Bowman による統計検定 ↑ : p < 0.05

PCE : 多染性赤血球

MNPCE : 小核を有する多染性赤血球

## 10. 生体機能への影響に関する試験

### (1) ニテンピラム原体の一般薬理試験

(資料 10)

試験機関：(株) 臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1991 年

検体：ニテンピラム原体

検体純度：

#### 一般症状に及ぼす影響

##### マウスの一般症状に及ぼす影響

供試動物：ICR 系雄マウス、5 週齢、体重 24.1~28.3 g、1 群 9 匹

投与方法：検体を蒸留水に溶解して 100、300 および 1000 mg/kg の用量で経口投与し、投与前および投与 15、30、60、120 および 180 分後に Irwin の多次元観察法に準じて一般症状を観察した。対照群には蒸留水を投与し、同様に観察を行なった。

結果：検体の 100 mg/kg 群では影響はみられなかった。300 mg/kg 群では、投与 15 分後よりグルーミング回数の減少、やや弛緩した体姿勢および四肢筋の緊張低下ならびに体温の下降傾向が観察された。120 分後にはグルーミング回数の減少を除く全ての症状が消失し、180 分後には全て回復した。1000 mg/kg 群では投与 15 分後までに 1 匹が死亡し、投与 15 分後より受動性の低下、グルーミング回数の減少、疼痛反応の低下、反応性の低下、やや弛緩状態の体姿勢、歩行異常、握力の低下、四肢筋の緊張度の低下、呼吸数の増加および体温の下降が認められ、1 匹で痙攣が観察された。投与 30 分後からはほとんどがえり試験 (Somersault test) の着地失敗、散瞳およびチアノーゼがみられ、3 匹に痙攣の発現が認められた。60 分後には新たに触反応の低下も観察され、120 分後までに 4 匹が死亡した。生存動物では 120 分後にはグルーミング回数の減少を除く全ての症状が消失し、180 分後には全て回復した。

##### ウサギの一般症状に及ぼす影響

供試動物：日本白色種雄ウサギ、体重 2.15~2.50 kg、1 群 3 匹

投与方法：検体を蒸留水に溶解して 300、1000 および 3000 mg/kg の用量で経口投与し、投与前および投与 30、60、120、180、240 および 300 分後の一般症状をイヌの一般症状観察法に準じた方法で観察した。対照群には蒸留水を投与し、同様に観察を行なった。

結果：検体 300 mg/kg 群では影響はみられなかった。1000 mg/kg 群では投与 30 分後より呼吸数の増加、60 分後より自発運動の低下、120 分後には有意な体温

下降が認められたが、240分後には全て回復した。3000 mg/kg 群では、投与30分後に1匹が間代性痙攣を起こし、この動物では歩行失調、四肢筋ならびに体緊張度の低下、角膜反射の遅延、皮膚反射の消失、跳び反応 (Hop response) の抑制、呼吸数の減少、散瞳およびチアノーゼが観察され、33分後に死亡した。他の2匹のうち1匹では投与30分後より呼吸数の増加、60分後には自発運動の低下、間代性痙攣および流涎も観察され、115分後に死亡した。残りの1匹は投与60および120分後に自発運動の低下がみられ、240分後にはこの症状は消失したが、300分後に間代性痙攣、四肢筋ならびに体緊張度の低下および呼吸数の減少がみられ、24時間後には死亡した。

#### 中枢神経系に対する作用

##### 筋弛緩作用および運動協調性に及ぼす影響

供試動物：ICR系雄マウス、5週齢、体重25.2~30.6 g (斜板法)、22.9~28.8 g (ロータロッド法)、1群11~14匹 (斜板法)、1群12匹 (ロータロッド法)

##### 投与方法：

斜板法；30度に傾斜したスリガラス板上にマウスを乗せ、10秒間以上落下しなかった動物を選抜し(1群11~14匹)、検体を蒸留水に溶解して100、300および1000 mg/kgの用量で経口投与し、投与15、30、60、120および180分後に上記条件のスリガラス板上に再び乗せ、10秒以内に落下する動物数を観察した。

ロータロッド法；1分間に14回転する直径3 cmの回転棒上にマウスを乗せ、1分間以上落下しなかった動物を選抜し(1群12匹)、斜板法と同じ用量の検体を経口投与し、投与15、30、60、120および180分後に、上記条件の回転棒に乗せ、1分以内に落下する動物数を観察した。

いずれの評価法も陰性対照群には蒸留水、陽性対照群にはジアゼパム10 mg/kgを投与し、同様に測定した。

##### 結 果：

斜板法；検体の100および300 mg/kg 群では落下動物数の有意な増加は認められなかった。1000 mg/kg 群では投与30から60分後に5例の死亡が認められ、投与15から120分後にかけて、痙攣の発現に伴う落下動物数の有意な増加が認められた。一方、ジアゼパム投与群では投与15から180分後にかけて、落下動物数の有意な増加が認められた(検定法：Fisherの直接確率検定、 $p < 0.05$ , 0.01)。

ロータロッド法；検体の100および300 mg/kg 群では落下動物数の有意な増加は認められなかった。1000 mg/kg 群では投与30から120分後に5例の死亡が認められ、投与15から60分後にかけて、痙攣の発現に伴う落下動物数の有意な増加が認められた。一方、ジアゼパム投与群では投与15から180分後にかけて、落下動物数の有意な増加が認められた(検定法：Fisherの直接確率検定、

$p < 0.05, 0.01$ 。

#### ペントバルビタール睡眠に及ぼす影響

供試動物：ICR系雄マウス、5週齢、体重24.2～29.2 g、1群10匹

投与方法：検体を蒸留水に溶解して30、100、300および1000 mg/kg 経口投与し60分後にペントバルビタール50 mg/kgを腹腔内投与して正向反射の消失から回復までの時間を測定した。溶媒対照群には蒸留水を、陽性対照群には蒸留水に溶解したクロルプロマジン10 mg/kgを経口投与し、同様に測定した。

結果：全検体投与群とも陰性対照群と比較してペントバルビタール投与による睡眠時間に有意差はなかったが、検体の1000 mg/kg群では10例中4例に痙攣が発現し、睡眠時間は測定出来なかった。一方、陽性対照群では有意な睡眠延長作用（溶媒対照群に比べて4.4倍）が認められた（検定法：Studentのt検定あるいはWelchの検定、 $p < 0.01$ ）。

#### 呼吸、循環器系に対する作用

##### ウサギの呼吸、血圧、心拍数および心電図に及ぼす影響

供試動物：日本白色種雄ウサギ、体重2.50～2.95 kg、1群4匹、

投与方法：ウレタン1.2 g/kgの皮下投与による麻酔下でウサギを背位に固定し、呼吸は気管カニューレに装着したサーミスタ式呼吸ピックアップにより、心電図は四肢第II誘導法により、血圧は右大腿動脈圧を圧カトランスデューサーを介して、心拍数は血圧の脈波を瞬時タコメーターを用いて、いずれもポリグラフ上に記録した。検体を生理食塩液に溶解して30および300 mg/kgの用量で2 mL/kgを30分間隔で2回静脈内投与した。溶媒対照群には生理食塩液を2 mL/kgを30分間隔で2回静脈内投与した。いずれも投与120分後まで観察した。

結果：検体の30 mg/kg群では、呼吸、血圧および心電図に影響はなかったが、心拍数については投与10分および30分後に溶媒対照群と比較して有意な増加が認められたが、投与前値との間には差が認められず、経時的な変化ではないことから検体投与による影響ではないと考えられた。300 mg/kg群では、投与直後に一過性の血圧下降がみられたが、5分後には回復した。また、投与60分後に溶媒対照群と比較して有意な収縮期血圧および拡張期血圧の上昇が認められ、さらに90分後には呼吸数の有意な減少もみられたが、心拍数には影響は認められなかった。なお、1匹の動物で投与60分以降徐々に血圧が下降し、120分後に死亡した。300 mg/kg群で認められた収縮期血圧および拡張期血圧の上昇、呼吸数の減少については、投与前値との間には差が認められず、経時的な変化ではないことから検体投与による影響ではないと考

えられた<sup>申請者注</sup>(検定法: Student の t 検定あるいは Welch の検定、 $p < 0.05$ )。

#### 自律神経系に対する作用

##### 摘出回腸に及ぼす影響

##### モルモットの摘出回腸に対する作用

供試動物: Hartley 系雄モルモット、11~12 週齢、体重 530~591 g、1 群 4 匹

方 法: モルモットを放血致死後直ちに回腸を摘出し、混合ガス ( $O_2$  95% +  $CO_2$  5%) を通気した Tyrode 液槽に懸垂した。被験物質は  $1 \times 10^{-5}$ ~ $1 \times 10^{-3}$  g/mL の濃度を用いた。回腸の収縮は等張性トランスデューサーを介して記録計に記録した。検体単独の作用と共にアセチルコリン (ACh) およびヒスタミン (His) ( $3 \times 10^{-8}$ ~ $1 \times 10^{-4}$  M) による収縮に及ぼす検体の影響についても検討した。

結 果: 検体の  $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-4}$  および  $1 \times 10^{-3}$  g/mL のいずれの濃度においてもモルモット摘出回腸に対する直接作用はみられなかった。ACh および His による回腸の収縮反応に対して、検体の  $1 \times 10^{-5}$  および  $1 \times 10^{-4}$  g/mL に影響はみられなかったが、 $1 \times 10^{-3}$  g/mL の適用において、ACh の  $1 \times 10^{-7}$  および  $3 \times 10^{-7}$  M による収縮が溶媒対照群と比較して、それぞれ 85 および 41% 抑制される傾向が認められた。また、His の  $3 \times 10^{-7}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  M による収縮が溶媒対照群と比較して、それぞれ 97~16% の抑制を示し、有意差が認められた (検定法: Student の t 検定あるいは Welch の検定、 $p < 0.05$ , 0.01)。

#### 消化器系に対する作用

##### マウスの腸管輸送能に及ぼす影響

供試動物: ICR 系雄マウス、5 週齢、体重 23.9~28.9 g、1 群 10 匹

方 法: 検体を蒸留水に溶解して 100、300 および 1000 mg/kg の用量でマウスに経口投与し、投与 60 分後に 10% アラビアゴム液に懸濁させた 5% 炭素末懸濁液を 0.2 mL 経口投与した。炭素末投与 20 分後に動物をクロロホルム麻酔下で安楽死させ、胃幽门部から炭素末到達先端までの腸管の長さを測定し、小腸全長に対する炭素末の移動率を求めた。溶媒対照群には蒸留水、陽性対照群にはアトロピンの 100 mg/kg をそれぞれ投与した。

結 果: 検体の 100 mg/kg 群には溶媒対照群と比較して腸管輸送能に差はみられなかった。300 および 1000 mg/kg 群では、溶媒対照群と比較して腸管輸送能がそれぞれ 30% および 53% 抑制され、有意差が認められた。陽性対照群では、溶媒

申請者注: 300 mg/kg 群において認められた呼吸数の有意な減少について

報告書中では 300 mg/kg 群において認められた呼吸数の有意な減少は検体投与による影響ではないと判断していたが、同群では投与 60 分以降に対照群あるいは投与前値と比較して呼吸数の減少傾向が認められていることに加え、予備試験において 1000 mg/kg の投与量で呼吸数の減少が認められていることから、本試験で認められた呼吸数の減少は検体投与による影響と判断した。

対照群と比較して 53%の有意な腸管輸送能の抑制が認められた (検定法: Student の t 検定あるいは Welch の検定、 $p < 0.05, 0.01$ )。

#### 骨格筋に対する作用

##### ラット坐骨神経-腓腹筋標本に及ぼす影響

供試動物: Wister/ST 系雄ラット、7~9 週齢、体重 234~285 g、1 群 4~5 匹

方 法: 動物をウレタン 1 g/kg の皮下投与により麻酔し、左側坐骨神経-腓腹筋標本を作製した。切断した坐骨神経の末梢側に刺激電極を設置し、デジタルステイミュレーターを用いて電気刺激 (0.2 Hz、1 msec) を加え、誘発された腓腹筋のれん縮を FD ピックアップを介してポリグラフ上に記録した。

検体は生理食塩液に溶解し、30 分間隔で 100 および 1000 mg/kg の用量で 5 mL/kg を 30 分間隔で 2 回静脈内投与した。溶媒対照群には生理食塩液 5 mL/kg を 30 分間隔で 2 回静脈内投与した。最終投与 120 分後に陽性対照である d-ツボクラリンの 75  $\mu$ g/kg を静脈内投与した。

結 果: 検体の 100 mg/kg 群では、腓腹筋の収縮に影響はみられなかった。1000 mg/kg 群では、腓腹筋の収縮は溶媒対照群に比較して有意に増大した (投与 5~60 分後、投与前値の 25~18%)。また、5 匹中 3 匹の動物に痙攣がみられ、そのうち 2 匹の動物は投与後 30~110 分に死亡した。d-ツボクラリン投与では明らかな腓腹筋収縮の抑制が認められた (検定法: Student の t 検定あるいは Welch の検定、 $p < 0.05, 0.01$ )。

#### 血液に対する作用

##### 血液凝固に及ぼす影響

供試動物: Wister/ST 系雄ラット、7~9 週齢、体重 198~237 g、1 群 9 または 10 匹

投与方法: 検体を蒸留水に溶解して 100、300 および 1000 mg/kg の用量でラットに経口投与した。対照群には蒸留水を経口投与した。いずれも投与 60 分後に腹大動脈より採血し、3.8%クエン酸ナトリウム溶液を血液 9 容に対して 1 容の割合で添加し、3000 回転/分で 10 分間遠心分離して得た血漿について、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間およびフィブリノーゲン量を Amelung-Coagulometer で測定した。

結 果: 全検体投与群の血液凝固能は溶媒対照群に比較して差がみられなかった。

以上の試験結果より、ニテンピラム原体はペントバルビタール睡眠への作用、摘出回腸に対する直接作用および血液に対する作用は持たないが、マウスで 300 mg/kg 以上、ウサギで 1000 mg/kg 以上の投与によって四肢筋の緊張低下や体温下降その他にみられる中枢抑制的な作用の傾向を示した。ウサギを用いた検討では、300 mg/kg 投与で血圧の下降および呼吸数の減少を来し、末梢循環および呼吸器に対する作用を有することが示唆された。

さらに高用量の投与では、マウスあるいはウサギで毒性作用による生体機能の失調や痙攣を引き起こした。また 1000 mg/kg 投与によりラットの骨格筋の収縮を増大させることが示された。その他に、ヒスタミンおよびアセチルコリンによる回腸の収縮反応ならびに腸管輸送能を抑制した。



ニテンピラム原体の「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系 一般症状	マウス	経口 (蒸留水)	100、300、 1000	雄 9	300	100	300 mg/kg : グルーミング回数減少、やや弛緩状態の体姿勢、四肢筋緊張度の低下、体温下降傾向 1000 mg/kg : 受動性の低下、グルーミング回数減少、触反応低下、疼痛反応低下、反応性低下、痙攣、やや弛緩状態の体姿勢、歩行異常、とんぼがえり試験での着地失敗、握力低下、四肢筋緊張度の低下、呼吸数増加、チアノーゼ、体温下降、散瞳 9 匹中 5 匹の死亡
	ウサギ	経口 (蒸留水)	300、1000、 3000	雄 3	1000	300	1000 mg/kg : 自発運動低下、呼吸数増加、体温下降 3000 mg/kg : 自発運動低下、四肢筋緊張度の低下、体緊張度の低下、歩行失調、角膜反射の遅延、皮膚反射の消失、跳び反応の抑制、間代性痙攣、流涎、散瞳、呼吸数増加又は減少、チアノーゼ、全例死亡

ニテンピラム原体の「生体の機能に及ぼす影響に関する試験」の総括表 (続き)

試験項目	動物種	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	作用量 (mg/kg)	無作用量 (mg/kg)	結果の概要	
中枢神経系	筋弛緩作用 (斜板法)	マウス	経口 (蒸留水)	100、300、 1000	雄 11 ~14	1000	300	1000 mg/kg : 落下例の増加
	運動協調性 (Rota-rod 法)	マウス	経口 (蒸留水)	100、300、 1000	雄 12	1000	300	1000 mg/kg : 落下例の増加
	ペントバルビタール睡眠	マウス	経口 (蒸留水)	30、100、 300、1000	雄 10 <sup>1)</sup>	>1000	1000	影響なし
呼吸・循環器系	呼吸数・ 血圧・ 心拍数・ 心電図	ウサギ (麻醉下)	静脈内 (生理食塩液)	30、300	雄 4	300	30	300 mg/kg : 一過性の血圧下降、 呼吸数減少 4 匹中 1 匹の死亡
自律神経系	摘出回腸	モルモット	<i>in vitro</i> (直接作用)	$1 \times 10^{-5}$ ~ $1 \times 10^{-3}$ g/mL	雄 4	> $1 \times 10^{-3}$ g/mL	$1 \times 10^{-3}$ g/mL	作用なし
			(抗 Ach <sup>2)</sup> および 抗 His <sup>3)</sup> 作用)	$1 \times 10^{-5}$ ~ $1 \times 10^{-3}$ g/mL	雄 4	$1 \times 10^{-3}$ g/mL	$1 \times 10^{-4}$ g/mL	抗 Ach : $1 \times 10^{-3}$ g/mL で Ach 収縮の抑制傾向 抗 His : $1 \times 10^{-3}$ g/mL で His 収縮の抑制
消化器系	腸管輸送能	マウス	経口 (蒸留水)	100、300、 1000	雄 10	300	100	300 mg/kg 以上で腸 管輸送能の抑制
骨格筋	坐骨神経- 腓腹筋 標本	ラット (麻醉下)	静脈内 (生理食塩液)	100、1000	雄 4~5	1000	100	1000 mg/kg : 収縮の増大
血液	血液凝固	ラット	経口 (蒸留水)	100、300、 1000	雄 9~10	>1000	1000	影響なし

1) 1000 mg/kg 群では 10 例中 4 例に痙攣が発現し、睡眠時間は測定出来なかった

2) acetylcholine      3) histamine

B. 原体混在物および代謝物を用いた試験成績

<原体混在物>

(1) ニテンピラム原体混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 混1)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1990年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

供試動物：Wistar/KY系ラット、6週齢、体重：雄149～169g、雌120～140g、

1群雌雄各10匹

観察期間：14日間

試験方法：対照群および5濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率からProbit法によりLD<sub>50</sub>値を求めた。

投与方法：検体を粉碎した後、0.5%メチルセルロース水溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は20mL/kgとした。対照群には0.5%メチルセルロース水溶液のみを同様に投与した。投与前は約17時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を14日間（投与日は投与後10分、20分、30分および以後6時間まで1時間毎、投与後1日以降は1日1回）、観察した。体重は投与前、投与後3、7、10および14日ならびに死亡発見時に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、800、1040、1350、1760、2280
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1182 (1039~1336) 雌 1426 (1254~1629)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 30 分より開始、 投与後 2 時間に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 1 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 800 (全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 800

中毒症状としては流涎、自発運動の低下、振戦および痙攣が観察された。

体重について検体投与による影響は認められなかった。

剖検では、雌雄とも死亡動物に肺のうっ血および出血、腺胃の糜爛が認められ、雄ではさらに腺胃の出血ならびに胸腺の点状出血が認められた。生存動物に異常は認められなかった。

(2) ニテンピラム原体混在物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 混2)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は2連制とし、プレート法により用量設定試験および本試験を各1回実施した。

用量設定根拠；

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が用量に依存して溶媒対照群の2倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム原体混在物 は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

本試験

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	87	7	32	14	5	
	313	-	80	6	38	17	5	
	625	-	80	9	33	20	4	
	1250	-	77	9	31	17	4	
	2500	-	85	10	37	18	5	
	5000	-	80	7	39	20	5	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	82	6	58	23	9	
	313	+	90	7	47	24	6	
	625	+	85	7	44	22	10	
	1250	+	88	8	57	20	7	
	2500	+	82	6	61	21	7	
	5000	+	83	7	49	17	13	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	369	/	263	/	/
		0.1	-	/	/	/	382	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	243	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1391
	2AA	0.5	+	/	/	/	287	/
		1	+	1389	/	/	/	/
		2	+	/	394	/	/	212
20		+	/	/	1104	/	/	

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン $\cdot$ 2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

(3) ニテンピラム原体混在物 の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 混3)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>, H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>, M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム原体混在物 は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。



本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0
	187.5	0	0	0	0
	375	0	0	0	0
	750	0	0	0	0
	1500	0	0	0	0
	3000	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	5.5	5.5		
陽性対照	AF-2	0.001	4.0	0	
	2AA	5			4.0 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

(4) ニテンピラム原体混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 混4)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1994年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

供試動物：Sprague-Dawley 系ラット、7 週齢、体重：雄 207.2～230.3 g 雌 154.0～176.4 g、  
1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

試験方法：対照群および5濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率から雄はMoving Averages  
法により、雌はLitchfield and Wilcoxon 法によりLD<sub>50</sub> 値を求めた<sup>1)</sup>。

投与方法：検体を0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し、ネラトン  
カテーテルを用いて強制経口投与した。投与液量は10 mL/kg とした。対照群に  
は0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液のみを同様に投与した。  
投与前一晚絶食させ、投与後も3～4 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を14 日間（投与日は投与後6 時間まで頻回、以降1  
日1 回以上）、観察した。体重は投与前、投与後1、3、7 および14 日に測定し  
た。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を  
行った。

申請者注1：LD<sub>50</sub> 値の算出法について

本試験では雌雄で異なるLD<sub>50</sub> 値算出法を用いている。報告書に記載は無いが、この理  
由として、雄では2890mg/kg 群でのみ死亡が認められており、その死亡率も60%であ  
ることから、通常用いられるLitchfield and Wilcoxon 法では精度の高いLD<sub>50</sub> 値を算  
出することが出来ないため、より精度高く算出することの出来るMoving Averages 法  
を用いていると考えられた。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、346、588、1000、1700、2890
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 2645 (1603~4366) 雌 2231 (1120~4445)
死亡開始時間 および終了時間	投与後1時間より開始、 投与後1日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後15分より発現、 投与後3日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 346 (全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 1700 雌 588

中毒症状としては、自発運動の低下、はいずり姿勢、呼吸数減少、眼瞼下垂、蒼白、強直性・間代性痙攣、鼻口周囲の汚れ、振戦、挙尾反応、立毛、流涎、異常発声、異常歩行、体温低下、横臥、吐血および肛門周囲の汚れが観察された。

体重について、投与後1日に588および1000 mg/kg群で増加抑制が、1700および2890 mg/kg群で減少が認められた。

剖検では、雌雄とも死亡動物に鼻口周囲の汚れが認められ、雄ではさらに肺の暗赤色化が認められた。生存動物に異常は認められなかった。

(5) ニテンピラム原体混在物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 混5)

試験機関：(財)化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1994年

検体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は溶媒対照を3連制、被験物質と陽性対照を2連制とし、プレインキュベーション法により用量設定試験および本試験を各1回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が用量に依存して溶媒対照群の2倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム原体混在物 は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験 (表中の数値：溶媒対照は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

本試験 (表中の数値：溶媒対照は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	98	8	38	16	17	
	313	-	105	9	40	16	15	
	625	-	103	8	58	16	16	
	1250	-	104	5	47	18	11	
	2500	-	111	12	45	15	15	
	5000	-	102	7	42	17	16	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	98	9	49	26	15	
	313	+	102	11	60	28	24	
	625	+	112	15	64	23	19	
	1250	+	106	9	63	28	20	
	2500	+	96	12	60	24	21	
	5000	+	106	9	58	19	14	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	282	/	439	/	/
		0.1	-	/	/	/	490	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	225	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1553
	2AA	0.5	+	/	/	/	189	/
		1	+	546	/	/	/	/
		2	+	/	162	/	/	88
10		+	/	/	426	/	/	

/ : 実施しなかった。  
統計処理は実施しなかった。

陽性対照

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
- NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム
- ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン $\cdot$ 2HCl
- 2AA : 2-アミノアントラセン

(6) ニテンピラム原体混在物 の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 混6)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1994 年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>、H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>、M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。

試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム原体混在物 は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0
	200	0	0	0	0
	400	0	0	0	0
	800	0	0	0	0
	1600	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	4.0	3.5		
陽性対照	AF-2	0.001	3.0		
	2AA	5		2.5	0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン



(7) ニテンピラム原体混在物 のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 混7)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1990年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

供試動物：Wistar/KY 系ラット、6 週齢、体重：雄 156～179 g、雌 120～143 g、  
1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

試験方法：対照群および 5 濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率から Probit 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を精製水に溶解し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。対照群には精製水のみを同様に投与した。投与前は約 17 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間（投与日は投与後 10 分、20 分、30 分および以後 6 時間まで 1 時間毎、投与後 1 日以降は 1 日 1 回）、観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日ならびに死亡発見時に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、300、400、520、680、900
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 534 (470～607) 雌 480 (418～547)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 10 分より開始、 投与後 1 時間に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 24 時間に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 300 (全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 300

中毒症状としては、流涎、自発運動の低下、歩行異常、振戦、痙攣、腹臥、鎮静が観察された。

520 mg/kg 群雄で投与後3日に軽度の体重増加抑制が認められた。

剖検では、雌雄とも死亡動物に肺のうっ血、前胃の浮腫および出血、腺胃、十二指腸および小腸の出血が認められ、雄ではさらに前胃の出血が、雌では胸腺の点状出血が認められた。生存動物に異常は認められなかった。

(8) ニテンピラム原体混在物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 混8)

試験機関：(財)化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1990年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体は蒸留水に溶解し、試験は2連制とし、プレート法により用量設定試験および本試験を各1回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が用量に依存して溶媒対照群の2倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム原体混在物 は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

本試験

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (蒸留水)	0	-	88	6	32	18	9	
	313	-	92	7	35	19	6	
	625	-	97	6	36	19	8	
	1250	-	87	9	32	22	7	
	2500	-	91	10	31	20	2	
	5000	-	99	6	33	17	6	
溶媒対照 (蒸留水)	0	+	103	13	52	25	12	
	313	+	91	8	42	25	9	
	625	+	90	7	44	21	9	
	1250	+	87	8	53	21	7	
	2500	+	89	7	51	24	9	
	5000	+	109	9	48	26	8	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	390	/	259	/	/
		0.1	-	/	/	/	429	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	236	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1307
	2AA	0.5	+	/	/	/	328	/
		1	+	1236	/	/	/	/
		2	+	/	406	/	/	144
20		+	/	/	1151	/	/	

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

(9) ニテンピラム原体混在物 の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 混9)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>、H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>、M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体を蒸留水に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、H17 株および M45 株ともに 4000 µg/ディスク以上の用量で生育阻止帯が認められたが、それぞれの最小生育阻止濃度 (MIC) を求めた結果、DNA 損傷度 (MIC<sup>rec+</sup>/MIC<sup>rec-</sup>) の値は S9 mix 非存在下では 2000/2100、S9 mix 存在下では 2200/2200 であり、陽性判定基準値である 2 未満であった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム原体混在物 は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

本試験

物質名	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (蒸留水)	0	0	0	0	0
	2000	0	0	0	0
	4000	2.0	2.0	2.0	1.5
	6000	4.5	3.5	5.0	4.0
	8000	5.0	4.5	6.0	5.5
	10000	6.0	5.0	7.0	6.0
陰性対照 (KM)	10	5.5	5.5		
陽性対照	AF-2	0.001	3.0	0	
	2AA	5			4.5 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

(10) ニテンピラム原体混在物のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 混10)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP対応]

報告書作成年：1990年

検体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

供試動物：Wistar/KY系ラット、6週齢、体重：雄164～173g、雌133～140g、  
1群雌雄各5匹

観察期間：14日間

試験方法：対照群および5濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率からProbit法によりLD<sub>50</sub>値を求めた。

投与方法：検体を精製水で50% (W/V)の濃度に溶解し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した(投与液量：3950mg/kg群は7.9mL/kg、5000mg/kg群は10mL/kg、6300mg/kg群は12.6mL/kg、7950mg/kg群は15.9mL/kg、10000mg/kg群は20mL/kg)。対照群には精製水のみ投与液量20mL/kgで投与した。投与前約17時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を14日間(投与日は投与後10分、20分、30分および以後6時間まで1時間毎、投与後1日以降は1日1回)、観察した。体重は投与前、投与後3、7、10および14日に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。



試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、3950、5000、6300、7950、10000
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 6548 (5338~7985) 雌 5610 (4715~6673)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 2 時間より開始、 投与後 24 時間に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 2 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 3950 雌 < 3950 (雌は全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 3950

中毒症状としては、自発運動の低下、鎮静、振戦、痙攣、流涎および流涙が観察された。

投与後 3 日に 3950mg/kg 群の雌雄と 6300mg/kg 群の雄で軽度な体重増加抑制が認められたが、7 日後には回復した。

剖検では、死亡動物に肺のうっ血、斑状出血および点状出血、腺胃の糜爛および点状出血が認められた。生存動物に異常は認められなかった。

(11) ニテンピラム原体混在物 の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 混11)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体は蒸留水に溶解し、試験は溶媒対照を 3 連制、被験物質と陽性対照を 2 連制とし、プレインキュベーション法により用量設定試験および本試験を各 1 回実施した。

用量設定根拠；

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が用量に依存して溶媒対照群の 2 倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム原体混在物 は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験 (表中の数値：溶媒対照は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

本試験 (表中の数値：溶媒対照は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (蒸留水)	0	-	106	7	49	20	6	
	313	-	101	10	43	30	6	
	625	-	100	8	48	27	6	
	1250	-	126	8	46	30	5	
	2500	-	106	10	59	35	5	
	5000	-	106	7	47	38	7	
溶媒対照 (蒸留水)	0	+	103	12	65	24	10	
	313	+	115	9	63	27	7	
	625	+	111	14	65	25	9	
	1250	+	110	10	62	23	8	
	2500	+	129	9	71	23	10	
	5000	+	127	10	58	30	7	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	765	/	888	/	/
		0.1	-	/	/	/	321	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	155	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	651
	2AA	0.5	+	/	/	/	86	/
		1	+	568	/	/	/	/
		2	+	/	82	/	/	56
10		+	/	/	449	/	/	

/ : 実施しなかった。  
統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

(12) ニテンピラム原体混在物 の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 混 1 2)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検 体：ニテンピラム原体混在物

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>, H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>, M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体を蒸留水に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム原体混在物 は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

本試験結果

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (蒸留水)	0	0	0	0	0
	625	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0
	10000	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	5.0	4.5		
陽性 対照	AF-2	0.001	7.0		
	2AA	5		4.0	0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

<代謝物>

(1) ニテンピラム代謝物 CPCF のラットにおける急性経口毒性試験

(資料代1)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1992年

検 体：ニテンピラム代謝物 CPCF

検体純度：

供試動物：Wistar/ST 系ラット、6 週齢、体重：雄 150～172 g、雌 124～144 g、  
1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

試験方法：対照群および 5 濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率から Probit 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体をコーンオイルに溶解し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。対照群にはコーンオイルのみを同様に投与した。投与前約 17 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間（投与日は投与後 10 分、20 分、30 分および以後 6 時間まで 1 時間毎、投与後 1 日以降は 1 日 1 回）観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日ならびに死亡発見時に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、1500、2000、2600、3400、4500
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 2543 (2255～2856) 雌 2666 (2374～3005)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 5 時間より開始、 投与後 4 日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 6 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 1500 (全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 1500

中毒症状としては、流涎、自発運動の低下、振戦、よろめき歩行、痙攣、鎮静および下痢が観察された。

体重について、投与後3日に検体投与前群で増加抑制あるいは減少が認められ、以後増加に転じたが、観察期間終了時には対照群に比べて低値であった。

剖検では、雌雄とも死亡動物に腺胃の出血および糜爛、前胃の潰瘍および肥厚、脾臓の萎縮ならびに肺の出血が認められた。生存動物では、前胃の肥厚（2000 mg/kg 群雄2例）ならびに前胃と横隔膜および肝臓の癒着（3400 mg/kg 群の雄1例）が認められた。



(2) ニテンピラム代謝物 CPCF の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代2)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検 体：ニテンピラム代謝物 CPCF

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は2連制とし、プレインキュベーション法により2回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照群の2倍を越え

る増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン $\cdot$ 2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPCF は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

試験1

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	125	9	44	19	13	
CPCF	31.3	-	131	13	/	19	11	
	62.5	-	133	13	/	11	9	
	125	-	126	10	46	12	6	
	250	-	136	9	53	16	7	
	500	-	80*	5*	47	5*	2*	
	1000	-	0*	0*	35	0*	0*	
	2000	-	/	/	9*	/	/	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	127	13	41	28	14	
CPCF	62.5	+	136	9	/	27	11	
	125	+	156	11	42	22	9	
	250	+	135	13	44	17	6	
	500	+	133	9	37	12	7	
	1000	+	3*	2*	38	1*	2*	
	2000	+	0*	0*	26*	0*	0*	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	808	/	815	/	/
		0.1	-	/	/	/	420	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	171	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	952
	2AA	0.5	+	/	/	/	188	/
		1	+	706	/	/	/	/
		2	+	/	143	/	/	163
		10	+	/	/	495	/	/

/: 実施しなかった。

\*: 菌の生育阻害が認められた。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン $\cdot$ 2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

試験2

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	136	11	38	24	4	
CPCF	31.3	-	127	11	/	21	6	
	62.5	-	132	12	/	14	7	
	125	-	114	7	35	17	7	
	250	-	114	12	40	12	4	
	500	-	27*	1*	42	0*	0*	
	1000	-	/	/	47	/	/	
	2000	-	/	/	0*	/	/	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	128	9	49	29	12	
CPCF	62.5	+	133	11	/	27	14	
	125	+	128	11	53	26	8	
	250	+	132	8	54	23	7	
	500	+	115	7	50	17	8	
	1000	+	0*	0*	39	0*	0*	
	2000	+	/	/	8*	/	/	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	977	/	516	/	/
		0.1	-	/	/	/	173	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	190	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1107
	2AA	0.5	+	/	/	/	183	/
		1	+	575	/	/	/	/
		2	+	/	118	/	/	152
		10	+	/	/	811	/	/

/: 実施しなかった。

\*: 菌の生育阻害が認められた。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2 HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

(3) ニテンピラム代謝物 CPCF の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 代 3)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検 体：ニテンピラム代謝物 CPCF

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>, H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>, M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠；

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPCF は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

本試験

物質名	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0
CPCF	625	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0
	10000	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	5.5	6.0		
陽性対照	AF-2	0.001	3.5		
	2AA	5		5.0	0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

(4) ニテンピラム代謝物 CEMU のラットにおける急性経口毒性試験

(資料代4)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1991年

検体：ニテンピラム代謝物 CEMU

検体純度：

供試動物：Wistar/ST 系ラット、6 週齢、体重：雄 149～169 g、雌 116～139 g、  
1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

試験方法：対照群および 5 濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率から Probit 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を精製水に溶解し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。対照群には精製水のみを同様に投与した。投与前は約 17 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間（投与日は投与後 10 分、20 分、30 分および以後 6 時間まで 1 時間毎、投与後 1 日以降は 1 日 1 回）観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日ならびに死亡発見時に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、500、660、870、1140、1500
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1067 (915～1308) 雌 972 (853～1114)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 20 分より開始、 投与後 2 日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 5 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 500 (全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 500

中毒症状としては、よろめき歩行、腹遣い歩行、腹臥、横臥、痙攣、自発運動の低下、鎮静が観察された。

500 mg/kg 群雌を除く全投与群で投与後 3 日に体重増加抑制あるいは体重減少が認められた。

剖検では、雌雄とも死亡動物に肺のうっ血、腺胃の糜爛および出血ならびに膀胱の膨満が認められた。生存動物では、雌雄ともに腺胃の点状出血が認められ、雌ではさらに前胃の肥厚が認められた。



(5) ニテンピラム代謝物 CEMU の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代5)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体：ニテンピラム代謝物 CEMU

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体は蒸留水に溶解し、試験は 2 連制とし、プレインキュベーション法により 2 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照群の 2 倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰突然変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CEMU は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰突然変異誘発性は有しないと判断された。

試験1

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (蒸留水)	0	-	139	12	45	24	9	
CEMU	313	-	126	17	43	27	10	
	625	-	119	17	50	25	12	
	1250	-	146	15	49	24	9	
	2500	-	116	18	43	23	11	
	5000	-	119	18	42	32	11	
溶媒対照 (蒸留水)	0	+	130	17	48	31	16	
CEMU	313	+	137	15	59	33	17	
	625	+	141	12	57	33	17	
	1250	+	139	14	55	25	16	
	2500	+	129	18	53	31	12	
	5000	+	123	12	46	34	11	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	587	/	568	/	/
		0.1	-	/	/	/	391	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	221	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1513
	2AA	0.5	+	/	/	/	113	/
		1	+	569	/	/	/	/
		2	+	/	118	/	/	138
		10	+	/	/	576	/	/

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

試験2

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (蒸留水)	0	-	153	13	53	25	10	
CEMU	313	-	153	10	55	25	10	
	625	-	154	14	56	31	10	
	1250	-	160	11	55	27	13	
	2500	-	159	13	60	33	6	
	5000	-	158	17	64	31	12	
溶媒対照 (蒸留水)	0	+	139	13	70	37	20	
CEMU	313	+	142	18	78	32	20	
	625	+	125	11	60	30	13	
	1250	+	140	10	65	32	18	
	2500	+	134	11	57	29	23	
	5000	+	138	13	54	27	16	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	800	/	631	/	/
		0.1	-	/	/	/	252	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	339	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1065
	2AA	0.5	+	/	/	/	159	/
		1	+	508	/	/	/	/
		2	+	/	146	/	/	130
		10	+	/	/	767	/	/

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン $\cdot$ 2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

(6) ニテンピラム代謝物 CEMU の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 代 6)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検 体：ニテンピラム代謝物 CEMU

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 ( $rec^+$ 、H17) と欠損株 ( $rec^-$ 、M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。

試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠；

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体処理群で生育阻止帯が認められたため、最少生育阻止濃度 (MIC) を算出した結果、DNA 損傷度 ( $MIC_{rec^+}/MIC_{rec^-}$ ) の値は S9 mix 非存在下では 4300/4180、S9 mix 存在下では 6060/5910 であり、陽性判定基準値である 2 未満であった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に著大な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CEMU は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

本試験

物質名	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0
CEMU	2000	0	0	0	0
	4000	0	0	0	0
	6000	1.0	0.5	0	0
	8000	3.0	2.0	1.0	0.5
	10000	3.5	2.5	1.5	1.0
陰性対照 (KM)	10	5.5	5.0		
陽性対照	AF-2	0.001	4.0	0	
	2AA	5			3.5 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

(7) ニテンピラム代謝物 CPMA のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 代7)

試験機関：(株) 臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1993年

検体：ニテンピラム代謝物 CPMA

検体純度：

供試動物：Sprague-Dawley 系ラット、6 週齢、体重：雄 178～206 g、雌 140～172 g、  
1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

試験方法：対照群および検体 5000 mg/kg 投与群を設け、その死亡率から LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を希釈せずに金属製胃管を用いて強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。対照群には精製水のみを同様に投与した。投与前約 18 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間（投与日は投与後 5 時間まで頻繁に、投与後 1 日以降は 1 日 1 回）観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。試験終了時の全生存動物について組織の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄共 > 5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	投与後 15 分より発現、 投与後 3 時間に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 5000 (雌雄共 5000mg/kg 投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000

中毒症状としては、自発運動の低下、流涎が観察された。

体重および剖検では検体投与による影響は認められなかった。

(8) ニテンピラム代謝物 CPMA の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代 8)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検 体：ニテンピラム代謝物 CPMA

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体は蒸留水に溶解し、試験は溶媒対照を 3 連制、被験物質と陽性対照を 2 連制とし、プレインキュベーション法により用量設定試験および本試験を各 1 回実施した。

用量設定根拠；

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照群の 2 倍を越える再現性のある増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPMA は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験 (表中の数値：溶媒対照群は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)



本試験 (表中の数値: 溶媒対照群は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (蒸留水)	0	-	132	14	43	23	9	
CPMA	313	-	135	18	42	16	14	
	625	-	141	8	45	15	9	
	1250	-	124	15	41	19	13	
	2500	-	120	14	38	21	11	
	5000	-	151	16	61	24	9	
溶媒対照 (蒸留水)	0	+	119	12	57	31	16	
CPMA	313	+	138	10	54	33	12	
	625	+	133	10	63	38	14	
	1250	+	140	11	67	30	12	
	2500	+	110	14	48	39	10	
	5000	+	129	10	59	39	13	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	610	/	466	/	/
		0.1	-	/	/	/	402	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	227	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	2206
	2AA	0.5	+	/	/	/	92	/
		1	+	685	/	/	/	/
		2	+	/	193	/	/	95
		10	+	/	/	454	/	/

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン $\cdot$ 2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

(9) ニテンピラム代謝物 CPMA の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 代9)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1993 年

検体：ニテンピラム代謝物 CPMA

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>, H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>, M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体を蒸留水に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPMA は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないものと判断された。

本試験

物質名	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (蒸留水)	0	0	0	0	0
CPMA	625	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0
	10000	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	7.0	7.0		
陽性対照	AF-2	0.001	4.5	0	
	2AA	5			4.5 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

(10) ニテンピラム代謝物 CPOA のラットにおける急性経口毒性試験

(資料代10)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP対応]

報告書作成年：1992年

検体：ニテンピラム代謝物 CPOA

検体純度：

供試動物：Wister/ST系ラット、6週齢、体重：雄159～172g、雌128～147g、  
1群雌雄各10匹

観察期間：14日間

試験方法：対照群および検体5000mg/kg投与群を設け、その死亡率からLD<sub>50</sub>値を求めた。

投与方法：検体を十分に粉碎した後0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁(25%w/v)し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は20mL/kgとした。対照群には0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液のみを同様に投与した。投与前約17時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を14日間(投与日は投与後10分、20分、30分および以後6時間まで1時間毎、投与後1日以降は1日1回)観察した。体重は投与前、投与後3、7、10および14日に測定した。試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、5000
LD <sub>50</sub> (mg/kg)	雌雄共 > 5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現時間 および消失時間	投与後20分より発現、 投与後4日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 5000 (雌雄共5000mg/kg投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 5000

中毒症状としては、流涎、下痢、自発運動の低下が観察された。

体重および剖検では検体投与による影響は認められなかった。

(11) ニテンピラム代謝物 CPOA の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代 1 1)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検 体：ニテンピラム代謝物 CPOA

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は 2 連制とし、プレインキュベーション法により 2 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁以降の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が用量に依存して溶媒対照群の 2 倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPOA は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

試験1

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	125	9	28	19	13	
CPOA	313	-	120	11	44	19	8	
	625	-	118	10	48	15	10	
	1250	-	111	10	44	16	6	
	2500	-	128	10	40	16	7	
	5000	-	126	12	42	16	9	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	127	13	41	28	14	
CPOA	313	+	127	11	52	23	13	
	625	+	127	8	44	25	18	
	1250	+	137	8	43	20	10	
	2500	+	122	8	52	20	8	
	5000	+	158	10	56	22	13	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	808	/	720	/	/
		0.1	-	/	/	/	420	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	171	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	952
	2AA	0.5	+	/	/	/	188	/
		1	+	706	/	/	/	/
		2	+	/	143	/	/	163
10		+	/	/	495	/	/	

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

試験 2

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	136	11	44	24	4	
CPOA	313	-	148	12	36	22	6	
	625	-	132	14	39	21	8	
	1250	-	134	11	40	12	4	
	2500	-	138	12	36	24	6	
	5000	-	130	15	36	19	6	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	128	9	49	29	12	
CPOA	313	+	119	8	39	30	10	
	625	+	131	6	47	32	16	
	1250	+	136	6	37	27	11	
	2500	+	125	9	51	35	9	
	5000	+	130	15	45	21	9	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	977	/	815	/	/
		0.1	-	/	/	/	173	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	190	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1107
	2AA	0.5	+	/	/	/	183	/
		1	+	575	/	/	/	/
		2	+	/	118	/	/	152
		10	+	/	/	811	/	/

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2 HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

(12) ニテンピラム代謝物 CPOA の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 代 1 2)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1992 年

検体：ニテンピラム代謝物 CPOA

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 ( $rec^+$ 、H17) と欠損株 ( $rec^-$ 、M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体処理群で生育阻止帯が認められたため、最少生育阻止濃度 (MIC) を算出した結果、DNA 損傷度 ( $MIC_{rec^+}/MIC_{rec^-}$ ) の値は S9 mix 非存在下では 2290/2150、S9 mix 存在下では 3930/3940 であり、陽性判定基準値である 2 未満であった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPOA は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。



本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0
CPOA	2000	0	0	0	0
	4000	1.0	1.0	0	0
	6000	2.5	2.0	2.0	2.0
	8000	3.0	3.5	2.5	3.0
	10000	3.5	4.0	4.0	4.0
陰性対照 (KM)	10	5.5	6.0		
陽性対照	AF-2	0.001	3.5	0	
	2AA	5			5.0 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

(13) ニテンピラム代謝物 NAMI のラットにおける急性経口毒性試験

(資料代13)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検 体：ニテンピラム代謝物 NAMI

検体純度：

供試動物：Wistar/KY 系ラット、6 週齢、体重：雄 158~185 g、雌 111~125 g、  
1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

試験方法：対照群および 5 濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率から Probit 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁し、金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。対照群には 0.5% メチルセルロース水溶液のみを同様に投与した。投与前約 17 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間（投与日は投与後 10 分、20 分、30 分および以後 6 時間まで 1 時間毎、投与後 1 日以降は 1 日 1 回）、観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経 口
投与量 (mg/kg)	0、150、200、270、370、500
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 291 (250~339) 雌 287 (251~325)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 1 日より開始、 投与後 9 日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 12 日に消失（尾端の脱落以外） （尾端の脱落は投与後 14 日まで継続）
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 150 （全ての検体投与群で症状が発現した）
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 150 雌 200

中毒症状としては、流涎、自発運動の低下、鎮静、横臥、振戦、衰弱、尾端の黒色化および尾端の脱落が観察された。

投与後 3 日に全投与群で体重減少あるいは体重増加抑制が認められ、150 および 270 mg/kg 群雄ならびに 370 mg/kg 群雌は観察期間終了時においても対照群との間に有意差がみられた<sup>1)</sup>。

剖検では、雌雄とも死亡動物に胸腺の出血、肺の出血またはうっ血、腺胃の出血または糜爛、十二指腸の潰瘍ならびに小腸の出血が認められ、雄ではさらに前胃の潰瘍が、雌では胸腺の萎縮、十二指腸の出血および小腸の重積が認められた。生存動物では前胃の肥厚（雌の 150、270 および 370 mg/kg 群の 1~2 例）および前胃と肝臓との癒着が認められた。

---

申請者注 1 : 雄の体重の推移について :

雄の 200 mg/kg 群および 370 mg/kg 群の体重は観察期間終了時には統計学的有意差は認められなかったが、対照群と較べて低値であった。

(14) ニテンピラム代謝物 NAMI の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料 代 1 4)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検 体：ニテンピラム代謝物 NAMI

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は 2 連制とし、プレート法により用量設定試験および本試験を各 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照群の 2 倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 NAMI は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

本試験

(表中の数値は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	79	9	39	19	5	
NAMI	313	-	80	9	35	15	5	
	625	-	84	9	29	17	5	
	1250	-	71	7	39	16	5	
	2500	-	78	7	34	14	5	
	5000	-	81	8	33	18	7	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	111	7	51	18	11	
NAMI	313	+	105	7	48	25	12	
	625	+	104	4	47	17	9	
	1250	+	94	8	43	20	8	
	2500	+	93	6	48	23	11	
	5000	+	90	10	42	22	13	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	375	/	250	/	/
		0.1	-	/	/	/	422	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	277	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1287
	2AA	0.5	+	/	/	/	289	/
		1	+	1227	/	/	/	/
		2	+	/	416	/	/	201
20		+	/	/	1045	/	/	

/: 実施しなかった。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2 HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

(15) ニテンピラム代謝物 NAMI の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 代 15)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1990 年

検 体：ニテンピラム代謝物 NAMI

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>, H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>, M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。

試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 NAMI は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0
NAMI	625	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0
	10000	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	6.0	5.5		
陽性対照	AF-2	0.001	4.0		
	2AA	5			4.5

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン



(16) ニテンピラム代謝物 CPMF のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 代 1 6)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1993年

検 体：ニテンピラム代謝物 CPMF

検体純度：

供試動物：Sprague-Dawley 系ラット、7 週齢、体重：雄 188～218 g、雌 135～164 g、  
1 群雌雄各 5 匹

観察期間：14 日間

試験方法：対照群および 5 濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率から Probit 法により  $LD_{50}$  値を求めた。

投与方法：検体をコーンオイルに希釈し、金属製胃管を用いて強制経口投与した。投与液量は 10 mL/kg とした。対照群にはコーンオイルのみを同様に投与した。投与前約 18 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間（投与日は投与後 5 時間まで頻回、投与後 1 日以降は 1 日 1 回）、観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、300、420、590、820、1150
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 689 (520~952) 雌 616 (443~899)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 30 分より開始、 投与後 1 日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 3 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 300 雌 < 300 (雌は全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 300

中毒症状としては、雌雄ともに自発運動の低下、流涎、よろめき歩行、痙攣、挙尾、口腔周囲の汚れが認められ、雄ではさらに黒色便および血尿が観察された。

820 mg/kg 群雄で投与後 3 日に体重増加の抑制傾向が認められた（申請者注：統計検定は未実施）。

剖検では、雌雄とも死亡動物に腺胃の点状出血が認められた。雄ではさらに腺胃の出血および糜爛、胸腺の点状出血ならびに小腸の充血が認められ、雌では腺胃の充血および十二指腸の点状出血が認められた。生存動物では、雌雄ともに胸腺の鬱血が認められ、雄ではさらに前胃の糜爛が、雌では前胃の肥厚ならびに腺胃の糜爛が少数例ではあるが認められた。

(17) ニテンピラム代謝物 CPMF の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料代17)

試験機関：(財)化学品検査協会

[GLP対応]

報告書作成年：1994年

検体：ニテンピラム代謝物 CPMF

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA*株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体はモレキュラシーブスで脱水したジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、試験は溶媒対照を3連制、被験物質と陽性対照を2連制とし、プレインキュベーション法により用量設定試験および本試験を各1回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照群の2倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPMF は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験 (表中の数値：溶媒対照群は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

本試験 (表中の数値：溶媒対照群は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
溶媒対照 (脱水 DMSO)	0	-	135	12	35	21	9	
CPMF	313	-	163	11	44	28	11	
	625	-	136	10	51	24	9	
	1250	-	169	13	46	22	10	
	2500	-	141	10	37	19	4	
	5000	-	95*	0*	26*	12*	7*	
溶媒対照 (脱水 DMSO)	0	+	152	7	47	30	13	
CPMF	313	+	159	9	51	30	17	
	625	+	145	7	46	36	23	
	1250	+	140	8	54	31	16	
	2500	+	143	14	44	24	13	
	5000	+	88*	0*	38*	21*	11*	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	585	/	551	/	/
		0.1	-	/	/	/	567	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	275	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1679
	2AA	0.5	+	/	/	/	246	/
		1	+	1035	/	/	/	/
		2	+	/	154	/	/	161
		10	+	/	/	393	/	/

/: 実施しなかった。

\*: 菌の生育阻害が認められた。

統計処理は実施しなかった。

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>: アジ化ナトリウム

ICR-191: 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA: 2-アミノアントラセン

(18) ニテンピラム代謝物 CPMF の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料代18)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1994 年

検体：ニテンピラム代謝物 CPMF

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復能保持株 (rec<sup>+</sup>, H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>, M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をモレキュラシーブスで脱水したジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体処理群で生育阻止帯が認められたため、最少生育阻止濃度 (MIC) を算出した結果、DNA 障害度 (MIC<sub>rec<sup>+</sup></sub>/MIC<sub>rec<sup>-</sup></sub>) の値は S9 mix 非存在下では 1.12、S9 mix 存在下では 1.29 であり、陽性判定基準値である 2 未満であった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPMF は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (脱水 DMSO)	0	0	0	0	0
CPMF	3000	0	0	0	0
	4000	2.0	1.0	0.6	0
	5000	2.3	1.2	1.3	0.8
	6000	3.5	2.5	2.4	1.5
	8000	3.7	4.2	3.7	3.0
	10000	6.0	4.6	4.2	4.4
陰性対照 (KM)	10	6.2	5.5		
陽性対照	AF-2	0.001	4.0	0	
	2AA	5			3.5 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

(19) ニテンピラム代謝物 CPU のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料代19)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1995年

検体：ニテンピラム代謝物 CPU

検体純度：

供試動物：ICR 系マウス、6 週齢、体重：雄 25.6～32.4 g、雌 21.1～27.9 g、  
1 群雌雄各 10 匹

観察期間：14 日間

試験方法：対照群および 4 または 5 濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率から Van der Waerden 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を粉碎した後、精製水に懸濁し、金属製胃管を用いて強制経口投与した。  
投与液量は 20 mL/kg とした。対照群には精製水のみを同様に投与した。投与前約 18 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間（投与日は投与後 5 時間まで頻回、投与後 1 日以降は 1 日 1 回）観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄 0、1410、2000、2830、4000 雌 0、1410、2000、2830、4000、5650
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1800 (1706～1900) 雌 1864 (1759～1975)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 30 分より開始、 投与後 2 日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 3 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 1410 (全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 1410



中毒症状としては、雌雄ともに自発運動の低下、腹臥位、横臥位、反射の亢進、よろめき歩行が認められ、雄ではさらに痙攣が認められた。

体重について、2000 mg/kg 群雄では投与後 3 日に、雌では投与後 10 および 14 日に増加抑制傾向が認められた（申請者追記：統計検定は未実施）。

剖検では、雌雄とも死亡動物に胃の血様物貯留、腺胃の出血、糜爛および粘膜剥離ならびに小腸の血様物貯留が認められ、雄ではさらに小腸の黄色物貯留が認められた。雌では肝臓および腎臓の胃に接する部位の変色、前胃の粘膜剥離、腺胃の充血、小腸の液体貯留、膀胱の尿貯留ならびに口および肛門周囲の汚染が認められた。生存動物では、雌雄ともに前胃の肥厚が認められた。

(20) ニテンピラム代謝物 CPU の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料代20)

試験機関：(財)化学品検査協会

[GLP対応]

報告書作成年：1995年

検体：ニテンピラム代謝物 CPU

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は溶媒対照を3連制、被験物質と陽性対照を2連制とし、プレインキュベーション法により用量設定試験および本試験を各1回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照群の2倍を超える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPU は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験 (表中の数値：溶媒対照は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

本試験 (表中の数値：溶媒対照は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}$ /プレート)	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	104	10	40	20	8	
CPU	313	-	102	10	34	27	7	
	625	-	95	9	38	24	8	
	1250	-	100	10	37	21	8	
	2500	-	105	10	37	22	8	
	5000	-	109	9	34	24	7	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	110	12	48	33	15	
CPU	313	+	107	11	45	33	14	
	625	+	117	9	49	30	15	
	1250	+	104	11	52	27	14	
	2500	+	108	11	47	32	16	
	5000	+	110	11	42	30	14	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	378	/	454	/	/
		0.1	-	/	/	/	471	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	211	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1717
	2AA	0.5	+	/	/	/	193	/
		1	+	439	/	/	/	/
		2	+	/	118	/	/	108
10		+	/	/	438	/	/	

/ : 実施しなかった。  
統計処理は実施しなかった。

陽性対照

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド
- NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム
- ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン $\cdot$ 2HCl
- 2AA : 2-アミノアントラセン

(21) ニテンピラム代謝物 CPU の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 代 2 1)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検 体：ニテンピラム代謝物 CPU

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換え修復能保持株 (rec<sup>+</sup>, H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>, M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPU は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないものと判断された。

本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0
CPU	625	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0
	10000	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	5.0	5.0		
陽性対照	AF-2	0.001	3.0	0	
	2AA	5			3.0 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン

(22) ニテンピラム代謝物 CPEO のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料代22)

試験機関：(株)臨床医科学研究所

[GLP 対応]

報告書作成年：1995年

検体：ニテンピラム代謝物 CPEO

検体純度：

供試動物：ICR系マウス、6週齢、体重：雄 25.0~31.7 g、雌 20.7~25.9 g、  
1群雌雄各 10匹

観察期間：14日間

試験方法：対照群および4濃度の検体投与群を設け、それらの死亡率から Van der Waerden 法により LD<sub>50</sub> 値を求めた。

投与方法：検体を粉碎した後、0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し、金属製胃管を用いて強制経口投与した。投与液量は 20 mL/kg とした。対照群には 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液のみを同様に投与した。投与前約 18 時間絶食させた。

観察・検査項目：中毒症状および生死を 14 日間（投与日は投与後 5 時間まで頻回、投与後 1 日以降は 1 日 1 回）観察した。体重は投与前、投与後 3、7、10 および 14 日に測定した。死亡動物および試験終了時の全生存動物について臓器の肉眼的病理検査を行った。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	0、1000、1410、2000、2830
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1739 (1670~1810) 雌 1801 (1673~1938)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 1 時間より開始、 投与後 2 日に終了
症状発現時間 および消失時間	投与後 10 分より発現、 投与後 2 日に消失
毒性兆候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雌雄共 < 1000 (全ての検体投与群で症状が発現した)
死亡例の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 1410 雌 1000

中毒症状としては、雌雄ともに自発運動の低下、腹臥位、横臥位、よろめき歩行、痙攣および反射の亢進が観察された。

体重については、2000 mg/kg 群雄で投与後7および14日に、1000 mg/kg 群雌で観察期間を通じて、対照群に比べやや高値を示した（申請者追記：統計検定は未実施）。

剖検では、雌雄とも死亡動物に胃の血様物貯留、腺胃の充血、出血および糜爛、血様物貯留、口周囲の汚染が認められた。雄ではさらに小腸の黄色物貯留および膀胱の尿貯留が認められ、雌では小腸の充血および肛門の汚染が認められた。生存動物では、雌雄ともに前胃の肥厚および腺胃の糜爛が認められ、雄ではさらに脾臓の萎縮が認められた。



(23) ニテンピラム代謝物 CPEO の細菌を用いた復帰突然変異試験

(資料代23)

試験機関：(財)化学品検査協会

[GLP対応]

報告書作成年：1995年

検体：ニテンピラム代謝物 CPEO

検体純度：

試験方法：ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537 株) およびトリプトファン要求性の大腸菌 *Escherichia coli* (WP2 *uvrA* 株) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法を用いて変異原性を調べた。  
検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、試験は溶媒対照を3連制、被験物質と陽性対照を2連制とし、プレインキュベーション法により用量設定試験および本試験を各1回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は、試験を通じて、いずれの菌株においても S9 mix の有無にかかわらず検体処理群の全ての濃度で、復帰突然変異コロニー数が溶媒対照群の2倍を越える増加を示さなかった。

一方、陽性対照として用いた 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2)、アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ )、2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン $\cdot$ 2HCl (ICR-191) および 2-アミノアントラセン (2AA) では、各菌株で著しい復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPEO は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で復帰変異誘発性は有しないと判断された。

用量設定試験 (表中の数値：溶媒対照は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

本試験 (表中の数値：溶媒対照は3枚、その他は2枚のプレートの平均値)

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	S9 mix の有無	復帰変異コロニー数/プレート					
			塩基対置換型			フレームシフト型		
			TA100	TA1535	WP2 $uvrA$	TA98	TA1537	
溶媒対照 (DMSO)	0	-	104	10	40	20	8	
CPEO	313	-	106	9	36	26	9	
	625	-	110	8	38	25	10	
	1250	-	114	9	37	22	8	
	2500	-	113	8	38	24	9	
	5000	-	109	12	35	29	8	
溶媒対照 (DMSO)	0	+	110	12	48	33	15	
CPEO	313	+	107	12	41	38	11	
	625	+	118	10	40	31	16	
	1250	+	113	12	54	34	11	
	2500	+	121	11	47	31	14	
	5000	+	133	10	43	29	12	
陽性 対照	AF-2	0.01	-	378	/	454	/	/
		0.1	-	/	/	/	471	/
	NaN <sub>3</sub>	0.5	-	/	211	/	/	/
	ICR-191	1	-	/	/	/	/	1717
	2AA	0.5	+	/	/	/	193	/
		1	+	439	/	/	/	/
		2	+	/	118	/	/	108
		10	+	/	/	438	/	/

/ : 実施しなかった。  
統計処理は実施しなかった。

陽性対照

- AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 NaN<sub>3</sub> : アジ化ナトリウム  
 ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)-アミノプロピルアミノ]アクリジン・2 HCl  
 2AA : 2-アミノアントラセン

(24) ニテンピラム代謝物 CPEO の細菌を用いた DNA 修復試験

(資料 代 2 4)

試験機関：(財) 化学品検査協会

[GLP 対応]

報告書作成年：1995 年

検 体：ニテンピラム代謝物 CPEO

検体純度：

試験方法：枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換え修復能保持株 (rec<sup>+</sup>, H17) と欠損株 (rec<sup>-</sup>, M45) を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で、賀田らの Rec-assay 法を用いて DNA 損傷誘発性を検定した。

検体をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、溶液 0.02 mL を添加した直径 8 mm のディスクを孢子プレート上に置き、生じた菌の生育阻止帯を測定した。

試験は 1 連制で本試験を 1 回実施した。

用量設定根拠：

試験結果：結果を次頁の表に示した。

検体は S9 mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても、M45、H17 両株に対し全く生育阻止帯を示さなかった。一方、陽性対照の 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド (AF-2) および 2-アミノアントラセン (2AA) では両株の間に顕著な生育阻止帯の差を生じ、陰性対照のカナマイシン (KM) では同程度の生育阻止帯を認めた。

以上の結果より、ニテンピラム代謝物 CPEO は代謝活性化の有無にかかわらず、本試験条件下で DNA 損傷誘発性を有しないと判断された。

本試験

薬物	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ディスク}$ )	生育阻止帯 (mm)			
		S9 mix 非存在下		S9 mix 存在下	
		M45 株	H17 株	M45 株	H17 株
溶媒対照 (DMSO)	0	0	0	0	0
CPEO	313	0	0	0	0
	625	0	0	0	0
	1250	0	0	0	0
	2500	0	0	0	0
	5000	0	0	0	0
陰性対照 (KM)	10	5.0	5.0		
陽性対照	AF-2	0.001	3.0	0	
	2AA	5			3.0 0

陰性対照

KM: カナマイシン

陽性対照

AF-2: 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

2AA: 2-アミノアントラセン