

3) DNA 修復試験

(資料 A-25)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 原体
純度

試験方法 : 被験物質を枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の DNA 組換修復機構保持株 (H17 株) と欠損株 (M45 株) に処理し、その DNA の損傷誘発性を検定した。薬物代謝酵素系として S-9 Mix を、また、溶媒として蒸留水を用いた。予備試験の結果に基づき、本試験には供試菌株に対し毒性を示さない 5000、1500、500、150 および 50 µg/mL を処理濃度として選択した。即ち、各菌株の懸濁液を S-9 Mix の添加或いは非添加の条件下で、これらの被験物質濃度となるように調製して 1 時間培養した。次いで、この懸濁液に寒天を加えて寒天プレート上に重層 (最高濃度 = 5000 µg/plate) した。24 時間培養後、発育したコロニー数を計数した。各処理濃度について次の指標を算出した。

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{\text{処理プレートのコロニー数}}{\text{溶媒対照プレートのコロニー数}} \times 100$$

$$\text{生存率指数} = \frac{\text{M45 株の生存率}}{\text{H17 株の生存率}}$$

生存率指数が 0.85 未満となったときに、或いは生存率指数に用量相関性を伴った低下が認められたときに、M45 株の生存率が低下、即ち、処理物質により DNA 損傷が生じたと判定した。

S-9 Mix 存在下における陽性対照物質として 2-Aminoanthracene、陰性対照物質として Streptomycin を、また、S-9 Mix 非存在下における陽性対照物質として AF-2、陰性対照物質として Kanamycin を用いた。更に、溶媒対照物質として蒸留水を用いた。プレート 2 枚で 1 試験を構成し、2 反復の試験とした。

試験結果 : 次頁の表に示す。

S-9 Mix の非存在下においてのみ、被験物質は 500 µg/mL 以上の濃度で両菌株に対して毒性を示したが、両菌株の間に毒性の程度に差は認められなかった。一方、S-9 Mix 存在下および非存在下における陰性対照物質は両菌株に対し同等の毒性を示し、また、陽性対照物質は M45 (DNA 修復機構欠損株) に対してより強い毒性を示した。

以上の結果より、被験物質には DNA 損傷の誘発性はないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

DNA 修復試験の結果

処理物質	処理濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S-9 Mix	H17 株		M45 株		生存率 指数
			コロニー数*	生存率 (%)	コロニー数*	生存率 (%)	
被験物質	5000	-	0	0	0	0	-
	1500	-	11	8	12	9	1.13
	500	-	39	29	40	31	1.07
	150	-	135	101	121	95	0.94
	50	-	129	96	127	99	1.03
	5000	+	134	96	105	95	0.99
	1500	+	135	97	107	97	1.00
	500	+	134	96	115	105	1.09
	150	+	129	93	106	96	1.03
	50	+	142	102	109	99	0.97
Kanamycin (陰性対照)	160	-	0	0	0	0	-
	80	-	0	0	0	0	-
	40	-	39	29	40	31	1.07
Streptomycin (陰性対照)	400	+	0	0	0	0	-
	200	+	2	1	3	3	3.00
	100	+	32	23	23	21	0.91
AF-2 (陽性対照)	0.002	-	136	101	13	10	0.10
	0.001	-	137	102	36	28	0.27
	0.0005	-	140	104	61	48	0.46
2-Amino- anthracene (陽性対照)	20	+	138	99	28	25	0.25
	10	+	136	98	67	61	0.62
	5	+	136	98	85	77	0.79
溶媒 (水)	100 μL	-	134	100	128	100	1.00
	100 μL	+	139	100	110	100	1.00

*値は2回の試験の平均値であり、申請者がデータに基づいて計算した。

生存率 (%) = (処理プレートのコロニー数 / 溶媒対照プレートのコロニー数) x 100

生存率指数 = M45 株の生存率 / H17 株の生存率

4) マウスを用いた小核試験

(資料 A-26)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

被験物質：プロヘキサジオンカルシウム塩 原体
純度

供試動物：CD-1 (ICR) 系マウス、雌雄各 65 匹、各群雌雄各 5 匹、
試験開始時に約 40 日齢、体重 22~24 g

試験方法：被験物質を 1%CMC 溶液中に懸濁し、1 晩絶食させた動物に胃ゾンデを用いて
単回強制経口投与した。被験物質の投与量を予備試験の結果に基づいて、1250、
2500 および 5000 mg/kg とした。陽性対照物質として Mitomycin C を、また、陰
性対照物質として溶媒 (1%CMC 溶液) を用いた。被験物質投与群および陰性
対照群では投与 24、48 および 72 時間後に、また、陽性対照群では投与 24 時間
後にマウスを屠殺した。大腿骨を摘出して骨髓を直接スライドガラスに塗抹し、
メタノール固定、Giemsa 染色し、塗抹標本を作製した。鏡検により各動物の正
染性赤血球に対する多染性赤血球の割合、多染性赤血球 1000 個中の小核を有す
る多染性赤血球数および正染性赤血球 1000 個中の小核を有する正染性赤血球
数について検討した。

試験結果：試験結果の概要を次表に示す。

被験物質投与群では、陰性対照群と比較して正染性赤血球に対する多染性赤血
球の割合、小核を有する多染性赤血球数の割合および小核を有する正染性赤血
球数に有意な変動は認められなかった。一方、陽性対照群では、陰性対照群と
比較して正染性赤血球に対する多染性赤血球の割合および小核を有する多染性
赤血球数の割合に有意な上昇が認められた。

以上の結果から、被験物質は骨髓多染性赤血球小核を誘発せず、染色体異常の誘発性は陰性
と判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

試験結果

屠殺時期 (投与後時間)	投与物質	投与量 (mg/kg)	p/n	mnp (%)	mnn (%)
24 時間	溶媒対照 (1%CMC 溶液)	—	0.880	0.6	0.0
	被験物質	1250	1.073	1.2	0.0
		2500	1.168	0.8	0.2
		5000	0.990	0.4	0.0
	陽性対照 (Mitomycin C)	12	0.462*	51.8**	0.3
48 時間	溶媒対照 (1%CMC 溶液)	—	1.286	1.0	0.2
	被験物質	1250	1.292	1.2	0.2
		2500	1.302	1.5	0.4
		5000	0.843	0.9	0.2
72 時間	溶媒対照 (1%CMC 溶液)	—	1.276	0.9	0.4
	被験物質	1250	1.226	1.3	0.4
		2500	1.228	1.0	0.2
		5000	1.242	1.2	0.2

* : p < 0.05 (Wilcoxon の順位和検定)

** : p < 0.01 (Wilcoxon の順位和検定)

p/n : 多染性赤血球数 / 正染性赤血球数

mnp : 多染性赤血球 1,000 個中の小核を有する多染性赤血球数

mnn : 正染性赤血球 1,000 個中の小核を有する正染性赤血球数

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

5) ラット骨髄細胞における *in vivo* 染色体異常試験

(資料 A-27)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 年

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 原体
純度

供試動物 : Sprague-Dawley 系ラット、1 群雌雄各 5 匹、投与時 約 5 週齢

試験方法 : 被験物質投与群の動物には、被験物質の 5000 mg/kg を 1% CMC 溶液に懸濁して単回強制経口投与した。陽性対照群の動物には Cyclophosphamide の 40 mg/kg を単回腹腔内投与した。溶媒対照群の動物には 1% CMC 溶液の同容量を単回強制経口投与した。被験物質投与群および溶媒対照群の動物を投与 6、24 および 48 時間後に、また、陽性対照群の動物を投与 24 時間後に屠殺し、大腿骨の骨髄を採取した。骨髄細胞を洗浄し、固定したのち、Giemsa 染色したスライド標本を作成した。それぞれの動物について分裂中期細胞 50 個の染色体の構造異常および数的異常を調べた。なお、いずれの動物の場合も屠殺 2 時間前に Colchicine を 4 mg/kg で腹腔内投与して有糸分裂を停止させた。

試験結果:

屠殺時期 (投与後時間)	投与物質	染色体構造異常細胞出現率 (%)		倍数体細胞致 観察細胞数
		Gap を含まず	Gap を含む	
6	溶媒 (20 mL/kg)	0.2	0.2	1/500
	被験物質 (5000 mg/kg)	0.0	0.0	0/500
24	溶媒 (20 mL/kg)	0.0	0.2	4/500
	被験物質 (5000 mg/kg)	0.2	0.2	2/450 ^{*)}
	Cyclophosphamide	14.0 ^{***)}	14.2 ^{***)}	0/500
48	溶媒 (20 mL/kg)	0.6	0.6	4/500
	被験物質 (5000 mg/kg)	0.2	0.2	2/500

^{***)} : p<0.001, Wilcoxon の順位和検定

^{*)} : 動物 1 匹が死亡した結果、観察細胞数は 450 個となった。

被験物質投与群においては、溶媒対照群と比較して、ラットの骨髄細胞に染色体の構造異常および数的異常発現率に有意な上昇は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

以上の結果から、本試験条件下で被験物質はラットの骨髄細胞に染色体の損傷および数的変化を誘発しないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

6) ラット培養肝細胞を用いた *in vivo* 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 (資料 A-88)

試験実施機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

検体の純度:

方法: 検体を培養液に溶解し、³H-チミジンを含む培地に添加して、6~8 週齢の Wistar 系 (WISTAR/WU) 雄ラットより単離した培養肝細胞に 18 時間処理した。処理濃度は、William's Medium E (WME) 培地に 5.00, 16.67, 50.00, 166.67 及び 500.00µg/mL の計 5 用量とした。同時に溶媒対照群及び陽性対照群 (2-アセチルアミノフルオレン、2AAF 処理濃度 2.23µg/mL) も設けた。処理後の細胞についてオートラジオグラフィーを作製し、各用量当たり 100 個の細胞について ³H-チミジンの取り込み量を核グレイン、細胞質グレイン及び正味核グレイン (net grains per nucleus) 数として計数した。

正味核グレイン数 = (核グレイン数 - 細胞質グレイン数)

同時にニュートラルレッド吸収試験を実施することにより細胞毒性の評価を行った。

試験は再現性を確認するため、同一方法で独立した 2 試験 (試験 I、II) を実施した。

用量設定根拠:

試験結果: 結果を次頁の表に示す。

検体投与群においては、いずれの処理濃度においても、核グレイン、細胞質グレイン及び正味核グレイン数ともに対照群と比較して統計学的に有意な増加は認められず、用量相関関係も認められなかった。また、最高濃度の 500.00µg/ml. においては明らかな細胞毒性が認められた。一方、陽性対照 2AAF 群では対照群と比較して統計学的に有意な各グレイン数の増加が認められ、UDS 反応は陽性であった。

以上の結果より、検体は本試験条件下で、DNA 損傷誘発性を有しないと判断される。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

試験 I

検体	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間	細胞生 存率%	核グレイン数		細胞質グレイン数		正味核グレイン数	
				平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.
溶媒 対照	培養液	18	100	23.93	8.22	29.34	9.07	-5.41	5.45
検体	5.00	18	100	29.70	7.53	35.25	6.77	-5.55	7.35
	16.67	18	102	24.30	7.38	29.33	8.62	-5.03	5.06
	50.00	18	112	27.75	7.27	33.54	9.46	-5.79	7.85
	166.67	18	100	24.95	7.11	30.39	7.36	-5.44	7.05
	500.00*	18	36	20.70	6.77	24.24	7.78	-3.54	4.80
陽性 対照 2AAF	2.23	18	43	89.79	17.50	28.59	9.15	61.20	14.71

各グレイン数は各用量当り 100 細胞を観察して算出した。

*検体の析出が認められた。

正味核グレイン数 = (核グレイン数) - (細胞質グレイン数)

陽性対照 2AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

試験 II

検体	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	処理 時間	細胞生 存率%	核グレイン数		細胞質グレイン数		正味核グレイン数	
				平均	S.D.	平均	S.D.	平均	S.D.
溶媒 対照	培養液	18	100	24.08	6.04	28.79	7.12	-4.71	4.58
検体	5.00	18	76	24.13	6.55	27.52	5.89	-3.39	5.06
	16.67	18	86	24.45	6.24	27.64	7.11	-3.19	5.99
	50.00	18	101	25.36	6.78	28.14	6.12	-2.78	6.55
	166.67	18	84	23.13	6.47	24.83	6.79	-1.70	6.73
	500.00*	18	26	24.55	6.15	26.08	6.69	-1.53	6.06
陽性 対照 2AAF	2.23	18	36	96.88	20.74	25.51	7.73	71.37	19.05

各グレイン数は各用量当り 100 細胞を観察して算出した。

*検体の析出が認められた。

正味核グレイン数 = (核グレイン数) - (細胞質グレイン数)

陽性対照 2AAF : 2-アセチルアミノフルオレン

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(14) 生体の機能への影響に関する試験

1) プロヘキサジオンカルシウム塩の一般薬理試験

(資料 A-28)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 年

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 原体
純度

(1) 中枢神経系に対する作用

供試動物 : CD-1 (ICR)系雄マウス、体重 20~24 g、約 6 週齢、1 群 5 匹

試験方法 : 被験物質を 0.5% CMC 溶液に懸濁して投与量 0 (溶媒対照)、500、1500 および 5000 mg/kg で動物に 1 回強制経口投与した。投与 5 時間後まで Irwin の多次元観察法に準じて動物の一般症状を観察した。また、投与後 7 日間の死亡の有無と一般症状を観察した。

試験結果 : いずれの投与群の動物にも、投与 5 時間後までの期間に行動異常或いは毒性症状は認められなかった。また、投与後の 7 日間における遅発性の毒性症状或いは死亡も認められなかった。

(2) 呼吸・循環器系に対する作用

供試動物 : Wistar 系雄ラット、体重 170~230 g (約 7 週齢)、1 群 2~3 匹

試験方法 : 麻酔下で動物に次の外科処置を施した。

外科処置の種類	目的
十二指腸カニューレ	被験物質の十二指腸内投与
回腸静脈カニューレ	麻酔薬の追加投与 (必要時のみ)
気管カニューレ	呼吸深度および呼吸数の測定
頸動脈カニューレ	動脈血圧および心拍数の測定
心電図用針電極 (肢部皮下)	心電図 (第 2 誘導) の記録

被験物質を 0.5% CMC 溶液に懸濁し、投与量 0 (溶媒対照) 或いは 5000 mg/kg で十二指腸内に 1 回強制投与した。投与後 2 時間にわたって、上表の検査項目について観察を行った。

試験結果 : 被験物質投与群 (5000 mg/kg) の動物には、溶媒対照群の動物と比較して生物学的に意義のある変化はいずれの検査項目にも認められなかった。

(3) 消化管に対する影響

供試動物 : CD-1 (ICR)系雄マウス、体重 18~22 g (約 6 週齢)、1 群 10 匹

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

試験方法：被験物質を 0.5% CMC 溶液に懸濁して投与量 0 (溶媒対照)、500、1500 および 5000 mg/kg で動物に 1 回強制経口投与した。投与 45 分後に、薬用炭の 5% 蒸留水懸濁液 0.25 mL を各動物に強制経口投与した。薬用炭の投与後、正確に 30 分経過時に胃腸管全体を摘出して薬用炭の移動距離を測定した。移動距離の腸管全長に対する百分率 (%) を算出した。陽性対照群の動物には硫酸アトロピン 100 mg/kg を強制経口投与した。

試験結果：各被験物質投与群と溶媒対照群との間に、胃腸管における薬用炭の輸送能に有意な差は認められなかった。一方、陽性対照群では、薬用炭の移動率 (%) に有意な減少 (溶媒対照群より 24% の減少) が認められた。

(4) 運動協調性に対する影響

供試動物：CD-1 (ICR)系雌マウス、体重 16~21 g (約 6 週齢)、1 群 10 匹

試験方法：被験物質を 0.5% CMC 溶液に懸濁して投与量 0 (溶媒対照)、500、1500 および 5000 mg/kg を 1 回強制経口投与した。投与 45 分後に Rota-rod 装置を用い、低速回転しているローター上に動物を置き、回転数を上昇させた。動物がローター上に留まっている時間 (滞留時間) を測定した。陽性対照物質として、メフェネシンの 400 mg/kg を強制経口投与した。

試験結果：各被験物質投与群と溶媒対照群との間に、加速ローター上におけるマウス滞留時間に有意な差は認められなかった。即ち、被験物質の運動協調性に対する影響は認められなかった。一方、陽性対照群ではマウスの滞留時間に有意な減少 (溶媒対照群より 86% の減少) が認められた。

(5) 血液凝固に対する影響

供試動物：Wistar 系雄ラット、体重 155~193 g (約 6 週齢)、1 群 10 匹

試験方法：被験物質を 0.5% CMC 溶液に懸濁して投与量 0 (溶媒対照)、500、1500 および 5000 mg/kg を 1 回強制経口投与した。投与 60 分後に各ラットの尾を穿刺して得た全血を用いて、血液凝固時間 (Dale & Laidlaw 法) を測定した。また、軽麻酔下で眼窩静脈叢から採取した血液を用いて、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間を測定した。

試験結果：各被験物質投与群と溶媒対照群との間に、血液凝固時間、プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間に有意な差は認められなかった。

(6) 溶血作用 (in vitro)

試験方法：3 人のボランティアより、ヘパリン存在下でそれぞれ約 10 mL 採血した。赤血球を採取、洗浄後に 0.9% 生理食塩液で 3% 懸濁液を調製した。被験物質の生理食塩液溶液をこの赤血球懸濁液に加え、被験物質の最終濃度が 0.0、0.03、0.1、0.3、1.0 mg/mL となるように、被験物質赤血球混合液を調製した。陽性対照として蒸留水を赤血球懸濁液に加えた。被験物質赤血球混合液を 37℃ で 2 時間インキュベートした。吸光度 (540 nm) の測定によりす

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

ることにより溶血の程度を調べた。

試験結果：いずれの被験物質濃度においても溶血作用は認められなかった。蒸留水の場合には著しい溶血が認められた。

以上より、大経投与の場合でも、本試験条件下では被験物質の中樞神経系、呼吸・循環器系、消化管、運動協調性、血液凝固および溶血に対する作用はないものと判断された。

「生体機能への影響に関する試験」の総括表

試験項目 (試験動物)	投与経路 (溶媒)	投与量 (mg/kg)	動物数 /群	無影響量 (mg/kg)	影響量 (mg/kg)	結果の概要
中枢神経系に 対する影響 (Irwin法、 一般症状、マウス)	経口 (0.5% CMC)	0, 500, 1500, 5000	雄 5匹	> 5000	> 5000	行動異常あるいは毒性症状は認められなかった。避妊性の症状、あるいは死亡も認められなかった。
循環器系に 対する影響 (ラット)	十二指腸内 カニューレ (0.5% CMC)	0, 5000	雄 2~3匹	> 5000	> 5000	呼吸深度、呼吸数、動脈血圧、心拍数、心電図を検査し、いずれの項目にも生物学的に意義のある変化は認められなかった。
消化管に 対する影響 (マウス)	経口 (0.5% CMC)	0, 500, 1500, 5000	雄 10匹	> 5000	> 5000	薬用炭の小腸輸送に影響は認められなかった。
運動協調性 (Rota-rod法、 マウス)	経口 (0.5% CMC)	0, 500, 1500, 5000	雌 10匹	> 5000	> 5000	加速ローター上における運動協調性（ローダーロード上の滞留時間）に影響は認められなかった。
血液凝固	経口 (0.5% CMC)	0, 500, 1500, 5000	雄 10匹	> 5000	> 5000	血液凝固時間、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に影響は認められなかった。
溶血性	ヒト赤血球	最終濃度 0.0, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 mg/mL	<i>in vitro</i>	> 1.0 mg/mL	> 1.0 mg/mL	いずれの被験物質濃度においても溶血作用は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

2. 原体混在物および代謝物の毒性

(1) 代謝物【2】の Maus における急性経口毒性試験

(資料 A-29)

試験機関:

(GLP 対応)

報告書作成年:

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 代謝物【2】
純度

供試動物 : Slc:B6C3F₁系 Maus, 6 週齢, 1 群雌雄各 5 匹
体重; 雄 21.5~25.4g, 雌 17.1~20.7g

観察期間 : 14 日間観察

投与方法 : 動物を 3 時間絶食させた後, 0.25% CMC 水溶液中に懸濁させた被験物質を単回強制経口投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を 14 日間観察した。

体重は投与直前、投与後 7 日、14 日および死亡時に測定した。

死亡個体は死亡時、生存個体は試験終了後に剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	1667、2000、2400、2880、3450
LD ₅₀ (mg/kg) (95% 信頼限界)	雄 2629 (2393~2889) 雌 3115 (2499~3882)
死亡開始時間 および終了時間	投与後 1 時間 投与後 2 日
症状発現および消失時間	投与後 1 時間 投与後 3 日
毒性徴候の認められなかつた最高投与量	1667
死亡例の認められなかつた最高投与量 (mg/kg)	2000

中毒症状として雌雄ともに自発運動低下、側臥位、腹臥位、眼瞼下垂および赤色尿が観察された。

生存動物の体重は、試験期間中雌雄ともに増加した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

死亡動物の剖検で得られた所見として、雌雄で腺胃の赤色化および赤色斑、小腸の内腔拡張、さらに雄で胃の膨満、小腸の黒褐色内容物および赤色点、膀胱の赤色尿貯溜、雌で前胃の赤色点および赤色結節、腺胃の黒色点、小腸の赤色化および赤色斑が認められた。

試験終了時に実施した生存動物の剖検で得られた所見として雌雄で前胃粘膜の肥厚、雄で前胃と肝臓の癒着が認められた。

以上から、本被験物質をマウスに単回経口投与させた際のLD₅₀は、雄2629 mg/kg (95%信頼限界：2393～2889 mg/kg)、雌3115 mg/kg (2499～3882 mg/kg)であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(2) 代謝物【2】のラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-30)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 年

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 代謝物【2】
純度

供試動物 : F344/DuCrj 系ラット、6週齢、1群雌雄各5匹
体重; 雄 93~110g、雌 81~92g

観察期間 : 14日間観察

投与方法 : 動物を16時間絶食させた後、0.25% CMC水溶液中に懸濁させた被験物質を単回強制経口投与した。

観察・検査項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。

体重は投与前、投与後7日、14日および死亡時に測定した。

死亡個体は死亡時、生存個体は試験終了後に剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	雄 1183、1538、2000、2600、3800 雌 910、1183、1538、2000、2600、3800
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 1787 (1301~2453) 雌 1992 (1431~2775)
死亡開始時間 および終了時間	雄 投与後8時間 投与後2日 雌 投与後2時間 投与後3時間
症状発現および消失時間	雄 投与後1時間 投与後2日 雌 投与後1時間 投与後2日
毒性徴候の認められなかった最高投与量	雄 <1183 雌 910
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄 1538 雌 910

中毒症状として雌雄ともに自発運動低下、腹臥位、体温低下、流涙、褐色分泌物、眼瞼下垂、下痢および軟便が観察され、さらに雄で背臥位、雌で側臥位が観察された。

生存動物の体重は、試験期間中雌雄ともに増加した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

死亡動物の剖検で得られた所見として、雌雄で胃の膨満、胃内に黒褐色の内容物、腺胃の赤色化および赤色点、小腸の内腔拡張、黒褐色内容物および赤色化、さらに雌で腺胃の赤色斑が認められた。試験終了時に実施した生存動物の剖検では異常は見られなかった。

以上から、本被験物質をラットに単回経口投与させた際のLD₅₀は、雄1787 mg/kg (95%信頼限界：1301～2453 mg/kg)、雌1992 mg/kg (1431～2775 mg/kg)であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(3) 代謝物【3】のマウスにおける急性経口毒性試験

(資料 A-31)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 年

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 代謝物【3】
純度

試験動物 : Slc:B6C3F₁系 マウス、6週齢、1群雌雄各5匹
体重; 雄 20.4~24.8g、雌 16.6~20.0g

観察期間 : 14日間観察

投与方法 : 動物を3時間絶食させた後、0.25% CMC水溶液中に懸濁させた被験物質を単回強制経口投与した。

観察・検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。

体重は投与直前、投与後7日、14日および死亡時に測定した。

死亡個体は死亡時、生存個体は試験終了後に剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	雄 2000、2400、2880、3456、4147 雌 1667、2000、2400、2880、3456、4147、4977
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 2624 (2138~3220) 雌 2933 (2348~3663)
死亡開始時間 および終了時間	雄 投与後3時間 投与後2日 雌 投与後2時間 投与後2日
症状発現および消失時間	雄 投与後1時間 投与後2日 雌 投与後1時間 投与後2日
毒性徴候の認められなかった最高投与量	雄 2000 雌 1667
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 1667

中毒症状として雌雄ともに自発運動低下、腹臥位、体温低下、および眼瞼下垂が観察され、さらに雌で側臥位が観察された。

生存動物の体重は、試験期間中雌雄ともに増加した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

死亡動物の剖検で得られた所見として、雌雄で胃内の黒褐色内容物、前胃の結節、腺胃の褐色化および黒色点、小腸の内腔拡張、黒褐色内容物、黒色斑、黒色点および赤色斑、さらに雄で小腸の赤色化、雌で胃の膨満、腺胃の結節および赤色斑が認められた。

試験終了時に実施した生存動物の剖検では異常は見られなかった。

以上から、本被験物質をマウスに単回経口投与させた際のLD₅₀は、雄2624 mg/kg (95%信頼限界：2138~3220 mg/kg)、雌2933 mg/kg (2348~3663 mg/kg)であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(4) 代謝物【3】のラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-32)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 年

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 代謝物【3】
純度

供試動物 : F344/DuCrj 系ラット 1群雌雄各5匹
(体重; 雄 95~109g、雌 80~90g)

観察期間 : 14日間観察

投与方法 : 動物を16時間絶食させた後、0.25% CMC水溶液中に懸濁させた被験物質を単回強制経口投与した。

検査・観察項目: 中毒症状および生死を14日間観察した。

体重は投与直前、投与後7日、14日および死亡時に測定した。

死亡個体は死亡時、生存個体は試験終了後に剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	雄 1667、2000、2400、2880、3456 雌 2000、2400、2880、3456、4147
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 2504 (2166~2894) 雌 2710 (2245~3273)
死亡開始時間 および終了時間	雄 投与後1時間 投与後24時間 雌 投与後2時間 投与後2日
症状発現および消失時間	雄 投与後1時間 投与後2日 雌 投与後1時間 投与後2日
毒性徴候の認められなかった最高投与量	雄 <1667 雌 <2000
死亡例の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 2000

中毒症状として雌雄ともに自発運動低下、側臥位、腹臥位、体温低下、流涙、眼瞼下垂、タール便、下痢および軟便が観察され、さらに雌で流涎が観察された。

生存動物の体重は、試験期間中雌雄ともに増加した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

死亡動物の剖検で得られた所見として、雌雄で胃の膨満および黒褐色内容物、腺胃の赤色化および赤色点、小腸の内腔拡張、黒褐色または赤色内容物、盲腸の赤色化、さらに雌で腺胃の赤色点および小腸の赤色化が認められた。

試験終了時に実施した生存動物の剖検では異常は見られなかった。

以上から、本被験物質をラットに単回経口投与させた際のLD₅₀は、雄2504 mg/kg (95%信頼限界：2166～2894 mg/kg)、雌2710 mg/kg (2245～3273 mg/kg)であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(5) 代謝物【4】のラットにおける急性経口毒性試験

(資料 A-33)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：

被験物質：プロヘキサジオンカルシウム塩 代謝物【4】

供試動物：Sprague-Dawley系ラット、5週齢、1群雌雄各5匹
体重：雄105~134g、雌100~140g

観察期間：14日間観察

投与方法：動物を1晩絶食させた後、純水中に懸濁させた被験物質を単回強制経口投与した。

検査・観察項目：中毒症状および生死を14日間観察した。

体重は投与前日と直前、投与後7日、14日に測定した。

死亡個体は死亡時、生存個体は試験終了後に剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与量 (mg/kg)	800、1265、2000、3162、5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 3171 (1969~4372) 雌 3078 (2104~4052)
死亡開始時間 および終了時間	雄 投与後5分 投与後5日 雌 投与後5分 投与後6日
症状発現および消失時間	投与後5分 投与後6日
毒性徴候の認められなかつた最高投与量	雄 <800 雌 <800
死亡例の認められなかつた最高投与量 (mg/kg)	雄 1265 雌 1265

中毒症状として雌雄ともに嗜眠、自発運動低下、失調性歩行、腹臥、立毛、流涎が観察された。

生存動物の体重は試験期間中、雌雄ともに増加した。

死亡および生存動物の剖検では特記すべき所見はみられなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

以上から、本被験物質をラットに単回経口投与させた際のLD₅₀は、雄3171 mg/kg (95%信頼限界：1969～4372 mg/kg)、雌3078 mg/kg (2104～4052 mg/kg)であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(8) 原体混在物【1】のラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-34)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年：

被験物質：プロヘキサジオンカルシウム塩 原体混在物【1】
純度：

供試動物：Sprague-Dawley系ラット、5～8週齢、1群雌雄各5匹
体重：雄143～153g、雌136～154g

観察期間：14日間観察

投与方法：動物を一晩絶食させた後、蒸留水中に懸濁させた被験物質を単回強制経口投与した。

検査・観察項目：中毒症状および生死を14日間観察した。

体重は投与直前、投与後7日、14日に測定した。

試験終了後、全ての供試動物を剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果：

投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 >5000 雌 >5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかつた最高投与量	雄 5000 雌 5000
死亡例の認められなかつた最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

試験期間を通して全身毒性の徴候はみられなかった。

体重は、雌雄ともに予期された増加量を示した。

試験終了後に屠殺した動物の剖検では異常は見られなかった。

以上から、本被験物質をラットに単回経口投与させた際のLD₅₀は、雌雄ともに、5000 mg/kgを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(7) 原体混在物【2】のラットにおける急性経口毒性試験 (資料A-35)

試験機関:

(GLP対応)

報告書作成年: 年

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 原体混在物【2】
純度:

供試動物 : Sprague-Dawley系ラット、5~8週齢、1群雌雄各5匹
体重: 雄 136~154g、雌 140~152g

観察期間 : 14日間観察

投与方法 : 動物を一晩絶食させた後、蒸留水中に懸濁させた被験物質を単回強制経口投与した。

検査・観察項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。

体重は投与直前、投与後7日、14日に測定した。

死亡個体は死亡時、生存個体は試験終了後に剖検し、肉眼的異常を調べた。

試験結果 :

投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg) (95%信頼限界)	雄 >5000 雌 >5000
死亡開始時間 および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかつた最高投与量	雄 5000 雌 5000
死亡例の認められなかつた最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

試験期間を通して全身毒性の徴候はみられなかった。

体重は、雌雄ともに予期された増加量を示した。

試験終了後に屠殺した動物の剖検では異常は見られなかった。

以上から、本被験物質をラットに単回経口投与させた際のLD₅₀は、雌雄ともに、5000 mg/kgを超える値であると推定された。

(8) 代謝物【2】の復帰突然変異試験

(資料 A-36)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 年

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 代謝物【2】
純度

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 およびトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2uvrA株を用い、ラットの肝臓から精製した粟物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で Ames らの方法で変異性を検定した。
被験物質はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。
予備試験の結果、各菌株に対して抗菌作用が認められなかったため、5000 µg/plate を最高用量とした。
試験は実施日を変えて2回行った。

試験結果 :

1回目

薬物	濃度 (µg/plate)	S-9 Mix の有無	復帰変異コロニー数 / plate *				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	15	17	125	16	24
被験 物質	40.5	-	20	13	128	14	25
	135	-	18	10	131	15	21
	450	-	8	17	139	14	24
	1500	-	14	14	133	10	21
	5000	-	16	11	131	14	22
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	-	AF-2 (0.1) 64	ENNG (5) 948	AF-2 (0.01) 433	ACR (80) 1731	AF-2 (0.1) 303
対照 (DMSO)		+	15	15	115	10	26
被験 物質	40.5	+	21	15	119	8	25
	135	+	16	14	145	9	18
	450	+	20	11	130	6	20
	1500	+	18	11	116	6	22
	5000	+	19	13	123	7	18
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	+	2-AA (20) 828	2-AA (2) 319	2-AA (1) 641	2-AA (2) 105	2-AA (0.5) 213

2 回目

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate*				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	20	14	144	17	26
被験 物質	156	-	14	20	155	16	31
	313	-	17	15	151	17	23
	625	-	21	23	170	16	20
	1250	-	16	18	150	11	22
	2500	-	13	18	166	14	17
	5000	-	23	19	119	11	30
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-	AF-2 (0.1) 52	ENNG (5) 864	AF-2 (0.01) 425	ACR (80) 2060	AF-2 (0.1) 324
対照 (DMSO)		+	20	18	132	13	20
被験 物質	156	+	13	19	110	10	26
	313	+	13	15	137	10	26
	625	+	21	18	127	11	24
	1250	+	12	18	149	14	18
	2500	+	12	19	141	13	38
	5000	+	16	20	126	13	21
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	+	2-AA (20) 814	2-AA (2) 226	2-AA (1) 722	2-AA (2) 105	2-AA (0.5) 207

AF-2 : 2-(Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

ENNG : 1-Ethyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine

ACR : 9-Aminoacridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 2プレートの平均値

被験物質処理群では S9-Mix の有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニーの有意な増加は認められなかった。一方、各陽性対照群では全ての試験菌株で復帰突然変異の有意な増加が認められた。

以上の結果より、被験物質は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発性は有しないものと判定された。

(9) 代謝物【3】の復帰突然変異試験

(資料A-37)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年: 年

被験物質 : プロヘキサジオンカルシウム塩 代謝物【3】
純度

試験方法 : ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 およびトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2uvrA株を用い、ラットの肝臓から精製した粟物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で Ames らの方法で変異性を検定した。被験物質はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた。
予備試験の結果、5000 µg/plate では抗菌作用が認められたが、コロニー数の有意な増加は認められなかった。よって 5000 µg/plate を最高用量とした。試験は実施日を変えて2回行った。

試験結果 :

1回目

薬物	濃度 (µg/plate)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate*				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	8	8	172	11	22
被験 物質	40.5	-	11	13	164	9	22
	135	-	9	10	141	10	29
	450	-	11	10	138	7	13
	1500	-	8	9	152	12	22
	5000	-	11	15	144	12**	16**
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	-	AF-2 (0.1) 48	ENNG (5) 312	AF-2 (0.01) 410	ACR (80) 1546	AF-2 (0.1) 228
対照 (DMSO)		+	13	16	129	12	25
被験 物質	40.5	+	12	13	102	10	23
	135	+	10	13	131	9	25
	450	+	12	10	127	9	19
	1500	+	10	11	109	7	18
	5000	+	14	12	101	8**	22**
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	+	2-AA (20) 989	2-AA (2) 296	2-AA (1) 567	2-AA (2) 63	2-AA (0.5) 199

2 回目

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数 / plate *				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			WP2 _{uvrA}	TA1535	TA100	TA1537	TA98
対照 (DMSO)		-	17	15	128	9	18
被験 物質	156	-	11	15	128	6	18
	313	-	14	15	120	5	22
	625	-	16	15	136	7	20
	1250	-	16	11	124	11	24
	2500	-	17	15	115	7	21
	5000	-	12	10	94	16**	18**
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-	AF-2 (0.1) 67	ENNG (5) 588	AF-2 (0.01) 438	ACR (80) 2934	AF-2 (0.1) 280
対照 (DMSO)		+	15	15	110	9	26
被験 物質	156	+	13	10	109	10	25
	313	+	9	17	130	9	27
	625	+	16	14	128	6	32
	1250	+	17	10	101	9	29
	2500	+	13	12	108	7	30
	5000	+	15	12	160	11**	22**
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	+	2-AA (20) 929	2-AA (2) 232	2-AA (1) 530	2-AA (2) 83	2-AA (0.5) 155

AF-2 : 2-(Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide

ENNG : 1-Ethyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine

ACR : 9-Aminoacridine

2-AA : 2-Aminoanthracene

* : 2 プレーートの平均値

** : 生育阻害が観察された

被験物質処理群では 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で一部の試験菌株に生育阻害が認められたが、S9-Mix の有無にかかわらず、いずれの用皿においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。

一方、各陽性対照群では全ての試験菌株で復帰変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、被験物質は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発性は有しないものと判定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(10) 代謝物【4】の復帰突然変異試験

(資料A-38)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年： 年

被験物質：プロヘキサジオンカルシウム塩 代謝物【4】

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 およびトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2uvrA株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で Ames らの方法で変異性を検定した。被験物質は純水に溶解させた。予備試験の結果、5000 µg/plate では抗菌作用が認められたが、コロニー数の有意な増加は認められなかった。よって、5000 µg/plate を最高用量とした。試験は実施日を変えて2回行った。

試験結果：

1回目

薬物	濃度 (µg/plate)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate*					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98	TA1538
溶媒 対照		-	23	17	111	20	27	13
被験 物質	50	-	25	13	117	15	27	12
	158	-	21	16	129	13	23	11
	500	-	23	14	96	13	29	11
	1580	-	26	16	129	13	23	12
	5000	-	22	15	116	14	24	10
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	-	2AA (20) 23	2AA (2) 19	BP (5) 124	BP (5) 14	BP (5) 25	BP (5) 9
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	-	ENNG (2) 392	SA (2) 905	SA (2) 896	9AC (80) 181	2-N (1) 145	2-N (2) 325
溶媒 対照		+	24	19	118	23	38	11
被験 物質	50	+	26	15	115	19	29	10
	158	+	22	13	107	21	36	15
	500	+	24	14	116	19	41	14
	1580	+	25	15	107	21	38	12
	5000	+	21	13	105	15	22	11
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	+	2AA (20) 133	2AA (2) 224	BP (5) 676	BP (5) 20	BP (5) 358	BP (5) 181

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

2 回目

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate*					
			塩基置換型			フレームシフト型		
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98	TA1538
溶媒 対照		—	22	14	132	12	29	15
被験 物質	50	—	29	15	126	15	23	13
	158	—	17	11	137	15	27	10
	500	—	25	13	135	12	23	11
	1580	—	25	11	133	14	24	10
	5000	—	22	12	125	10	29	12
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	—	2AA (20)	2AA (2)	BP (5)	BP (5)	BP (5)	BP (5)
			29	20	142	14	29	15
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	—	ENNC (2)	SA (2)	SA (2)	9AC (80)	2N (1)	2-N (2)
			177	1046	1014	131	132	265
溶媒 対照		+	21	14	125	12	27	14
被験 物質	50	+	20	13	98	13	41	12
	158	+	26	13	116	11	34	11
	500	+	21	16	128	14	30	15
	1580	+	18	13	148	15	28	15
	5000	+	17	12	123	16	29	11
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	+	2AA (20)	2AA (2)	BP (5)	BP (5)	BP (5)	BP (5)
			579	323	656	139	355	147

BP : Benzo(a)pyrene

2AA : 2-Aminoanthracene

ENNC : N-ethyl-N'-nitro-n-nitrosoguanidine

9AC : 9-Aminoacridine

2N : 2-Nitrofluorene

SA : Sodium azide

* : 3プレートの平均値

被験物質処理群では、S9-Mixの有無にかかわらず、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度においても復帰変異コロニー数の有意な増加は認められなかった。

一方、各陽性対照群では全ての試験菌株で復帰変異コロニー数の有意な増加が認められた。

以上の結果より、被験物質は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発は有しないものと判定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(11) 原体混在物【1】の復帰突然変異試験

(資料A-39)

試験機関：

(GLP対応)

報告書作成年： 年

被験物質：プロヘキサジオンカルシウム塩 原体混在物【1】
純度

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 およびトリプトファン要求性の大腸菌 *E. coli* WP2uvrA株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で Amesらの方法で変異性を検定した。被験物質は滅菌蒸留水に溶解させた。予備試験の結果、菌株に対して毒性を示さなかったため、5000 µg/plateを最高用量とした。
試験は実施日を変えて2回行った。

試験結果：

1回目

薬物	濃度 (µg/plate)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate*				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒 対照		-	19.3	14.0	96.0	12.0	18.3
被験 物質	8.0	-	15.3	13.7	99.0	12.3	17.3
	40	-	14.3	12.3	90.0	12.7	18.0
	200	-	12.3	9.0	86.3	13.0	16.0
	1000	-	12.7	13.7	80.7	9.0	15.0
	5000	-	21.0	12.3	68.3	13.3	16.3
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	-	ENNG (2.0) 736.3	ENNG (5.0) 397.0	ENNG (3.0) 641.7	9AC (80.0) 802.3	4NQO (0.2) 275.7
溶媒 対照		+	13.7	12.7	115.0	10.7	25.7
被験 物質	8.0	+	11.7	13.0	110.3	13.3	17.0
	40	+	15.3	12.3	105.7	13.7	16.3
	200	+	13.7	14.0	106.3	15.0	22.3
	1000	+	11.7	13.0	93.3	13.7	17.3
	5000	+	18.3	10.7	93.3	12.7	18.3
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	+	2-AA (20.0) 466.3	2-AA (2.0) 271.3	BP (5.0) 608.0	BP (5.0) 201.7	BP (5.0) 397.0

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

2 回目

薬物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数 / plate *				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒 対照		-	23.0	19.7	113.3	11.7	19.7
被験 物質	312.5	-	16.7	11.7	105.0	10.3	17.7
	625	-	24.3	10.3	91.3	13.7	16.0
	1250	-	16.0	14.0	95.3	13.0	18.7
	2500	-	20.7	11.3	85.3	13.7	21.0
	5000	-	19.0	9.3	77.7	14.7	19.3
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-	ENNG (2.0) 332.1	ENNG (5.0) 271.7	ENNG (3.0) 610.0	9AC (80.0) 783.7	4NQO (0.2) 239.0
溶媒 対照		+	25.0	15.7	137.0	10.7	27.7
被験 物質	312.5	+	25.7	17.3	99.7	11.3	24.3
	625	+	23.7	12.3	98.3	12.0	23.3
	1250	+	24.7	17.3	98.3	14.0	20.3
	2500	+	19.7	12.3	93.3	13.0	26.0
	5000	+	22.0	11.3	94.0	12.7	24.7
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	+	2-AA (20.0) 246.0	2-AA (2.0) 313.0	BP (5.0) 687.3	BP (5.0) 166.7	BP (5.0) 229.7

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

4NQO : 4-Nitroquinoline N-oxide

9 AC : 9-Aminoacridine

2 AA : 2-Aminoanthracene

BP : Benzo(a)pyrene

* : 3 プレーットの平均値

被験物質処理群では、S9-Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰突然コロニー数の増加は認められなかった。

一方、各陽性対照群では全ての試験菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、被験物質は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発性を有しないものと判定された。

(12) 原体混在物【2】の復帰突然変異試験

(資料 A-40)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年： 年

被験物質：プロヘキサジオンカルシウム塩 原体混在物【2】
純度

試験方法：ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1537, TA98, TA100 およびトリプトファン要求性の大腸菌 *E.coli* WP2uvrA 株を用い、ラットの肝臓から精製した薬物代謝酵素系 (S-9Mix) の存在下および非存在下で Ames らの方法で変異性を検定した。被験物質はアセトンに溶解させた。

予備試験の結果、菌株に対して毒性を示さなかったため、5000 µg/plate を最高用量とした。

試験は実施日を変えて2回行った。

試験結果：

1回目

薬物	濃度 (µg/plate)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数/plate*				
			塩基置換型			フレームシフト 型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒 対照		-	20.0	12.0	108.7	9.3	16.0
被験 物質	8.0	-	15.0	10.3	109.7	11.0	17.7
	40	-	13.0	11.3	100.3	11.3	16.3
	200	-	13.3	10.3	90.7	10.7	16.3
	1000	-	15.3	14.3	86.3	10.0	16.0
	5000	-	21.3	13.7	86.7	11.0	15.7
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	-	ENNG (2.0) 736.3	ENNG (5.0) 397.0	ENNG (3.0) 641.7	9AC (80.0) 802.3	4NQO (0.2) 275.7
溶媒 対照		+	19.0	14.0	126.7	11.7	36.7
被験 物質	8.0	+	18.0	13.0	118.3	11.3	24.3
	40	+	16.7	14.3	119.7	15.0	27.7
	200	+	16.0	13.0	105.3	12.0	29.0
	1000	+	16.7	15.0	119.3	12.7	26.0
	5000	+	18.7	14.0	109.3	12.0	20.0
陽性 対照	化合物名 (µg/plate)	+	2-AA (20.0) 466.3	2-AA (2.0) 271.3	BP (5.0) 608.0	BP (5.0) 201.7	BP (5.0) 397.0

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

2 回目

試物	濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	S-9Mix の有無	復帰変異コロニー数 / plate*				
			塩基置換型			フレームシフト型	
			WP2uvrA	TA1535	TA100	TA1537	TA98
溶媒 対照		-	20.7	22.3	110.3	11.3	18.3
被験 物質	312.5	-	18.3	14.7	107.7	13.3	20.3
	625	-	21.7	15.0	92.3	14.0	15.7
	1250	-	18.5	13.3	90.7	14.7	16.7
	2500	-	15.3	15.0	106.7	12.0	17.7
	5000	-	17.7	11.3	99.7	9.7	15.3
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	-	ENNG (2.0) 332.7	ENNG (5.0) 271.7	ENNG (3.0) 610.0	9AC (80.0) 783.7	4NQO (0.2) 239.0
溶媒 対照		+	22.0	18.3	139.3	12.0	23.0
被験 物質	312.5	+	23.7	18.3	124.7	13.7	20.0
	625	+	21.7	19.7	124.0	13.0	26.0
	1250	+	20.0	19.3	113.0	14.0	21.3
	2500	+	19.3	15.7	115.7	10.3	20.3
	5000	+	19.0	11.7	109.7	11.0	19.0
陽性 対照	化合物名 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	+	2-AA (20.0) 246.0	2-AA (2.0) 313.0	BP (5.0) 687.3	BP (5.0) 166.7	BP (5.0) 229.7

ENNG : N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

4NQO : 4-Nitroquinoline N-oxide

9 AC : 9-Aminoacridine

2 AA : 2-Aminoanthracene

BP : Benzo(a)pyrene

* : 3 プレーットの平均値

被験物質処理群では、S9-Mixの有無にかかわらず、いずれの用量においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

一方、各陽性対照群では全ての試験菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加を示した。

以上の結果より、被験物質は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰突然変異誘発性を有しないものと判定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

3. 製剤

(1) 0.12%粉剤 (ビビフル粉剤DL)

(1-1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-52)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年

被験物質： ビビフル粉剤DL (KUH-833粉剤DL)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩： 0.12%

鉱物質微粉等： 99.88%

供試動物： Sprague-Dawley系ラット、約4~7週齢、1群雌雄各5匹、

体重：雄92~102 g、雌96~118 g

観察期間： 14日間

投与方法： 投与前に一晩絶食させた動物に、蒸留水中に懸濁した被験物質を単回強制経口投与した。

観察・検査項目： 中毒症状および生死を14日間観察した。

体重を投与直前、投与後7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肉眼的病理検査を行った。なお、試験途中の死亡動物についても肉眼的病理検査を行うこととしたが、死亡例は認められなかった。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 >5000 雌 >5000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	投与後6分より発現、 投与後6日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 <5000 (中毒症状) 雌 <5000 (中濃症状)
死亡の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

中毒症状として雌雄の全例に立毛が投与後6分以内に発現し、次いで円背位が認められた。これらの症状は投与後6日には認められなかった。そのほかに中毒症状は認められなかった。

体重変化について、いずれの動物にも体重変化の異常は認められなかった。

肉眼的病理検査において、いずれの動物にも異常所見は認められなかった。

以上から、本被験物質をラットに単回経口投与させた際のLD₅₀は5000 mg/kgを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(1-2) マウスにおける急性経口毒性試験 (限界試験)

(資料A-53)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作成年 年

被験物質 : ビビフル粉剤DL (KUH-833粉剤DL)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 : 0.12%

鉱物質微粉等 : 99.88%

供試動物 : Hsd:ICR系マウス、約4~7週齢、1群雌雄各5匹、体重 : 雄19~22g、雌17~19g

観察期間 : 14日間

試験方法 : 限界試験

投与方法 : 投与前に一晚絶食させた動物に、蒸留水中に懸濁した被験物質を単回強制経口投与した。

観察・検査項目 : 中毒症状および生死を14日間観察した。

体重を投与前、投与後7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肉眼的病理検査を行った。なお、試験途中の死亡動物についても肉眼的病理検査を行うこととしたが、死亡例は認められなかった。

試験結果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 >5000 雌 >5000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	投与後10分より発現、 投与後3日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 <5000 (中毒症状) 雌 <5000 (中毒症状)
死亡の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

中毒症状として雌雄の全例に立毛および呼吸数の増加が投与後10分以内に発現した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

呼吸数の増加は投与後1時間以内に消失した。一方、立毛は投与後1時間以降もいずれの動物にも認められ、円背位および四肢の蒼白を伴っていた。いずれの症状も投与後3日には認められなくなった。そのほかには中毒症状は認められなかった。体重変化について、投与後14日に雌1例の体重増加抑制が認められた。その他いずれの動物にも体重変化の異常は認められなかった。肉眼的病理検査において、いずれの動物にも異常所見は認められなかった。

以上から、本試験物質をマウスに単回経口投与させた際のLD₅₀は5000 mg/kgを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(1-3) ラットにおける急性経皮毒性試験 (限界試験)

(資料 A-54)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作成年 年

被験物質 : ビビフル粉剤DL (KUH-833粉剤DL)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 : 0.12%

賦物質微粉等 : 99.88%

供試動物 : Sprague-Dawley系ラット、約7~10週齢、1群雌雄各5匹、

体重 : 雄240~252 g、雌230~253 g

観察期間 : 14日間

試験方法 : 限界試験

投与方法 : 被験物質を蒸留水で湿潤させたのち、剪毛した背腰部の皮膚に貼付した。

貼付 24 時間後に投与部の皮膚を温水で洗浄した。

観察・検査項目 : 中毒症状、投与部の皮膚反応および生死を 14 日間観察した。体重を投与前、投与後 7 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適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行った。なお、試験途中の死亡動物についても肉眼的病理検査を行うこととしたが、死亡動物は認められなかった。

試験結果 :

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 >2000 雌 >2000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 <2000 (体重増加抑制) 雌 <2000 (体重増加抑制)
死亡の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 2000

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

試験期間中に中毒症状および投与部位の異常は認められなかった。

体重増加量に関しては、軽度の低下が投与後7日に雌2例で認められ、同様の傾向が投与後14日に雄1例および雌3例で認められた。その他の動物において体重変化の異常は認められなかった。

肉眼的病理検査において、いずれの動物にも異常所見は認められなかった。

以上から、本被験物質をラットに単回経皮投与させた際のLD₅₀は2000 mg/kgを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(1-4) ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料A-41)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年 年

被験物質： ビピフル粉剤DL (KUH-833粉剤DL)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩： 0.12%

賦物質微粉等： 99.88%

供試動物： Sprague-Dawley系ラット、8~10週齢、1群雌雄各5匹、

暴露時の体重： 雄：328~433 g、雌：217~259 g

観察期間： 14日間

暴露方法： 被験物質のダストエアロゾルを発生させ、それに動物を4時間、全身暴露させた。なお、試験した暴露濃度（実際濃度）2.61 mg/Lはダストエアロゾルが発生可能な最高濃度であった。グラスファイバーフィルタを用いて暴露空気を捕集し、重量測定法により実際濃度を求めた。対照群には空気のみを暴露させた。

暴露条件：

名目濃度 ¹⁾ (mg/L)	36.8
実際濃度 (mg/L)	2.61
粒子径分布 (%) ²⁾ :	
>10.0 μm	9.7
6.0~10.0	23.2
3.5~6.0	38.2
2.0~3.5	18.3
0.9~2.0	5.6
0.5~0.9	3.8
≤0.5	1.2
合計	100.0
空気力学的質量中位径 (μm)	4.3
呼吸可能な粒子 (<7 μm) の割合 (%)	71.1
チャンバー容積 (L)	120
チャンバー内通気量 (L/min)	15
暴露条件	ダスト、4時間、全身暴露

¹⁾ : 通気量と被験物質消費量から算出した濃度

²⁾ : Anderson mini-sampler法により2回測定した平均

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

観察・検査項目： 暴露中および暴露後14日間、中毒症状と生死を観察した。また、体重、摂餌量および飲水量を毎日測定した。観察期間終了時の全生存動物につき肉眼的病理検査を行い、肺重量対体重比を算出した。なお、試験途中の死亡動物についても肉眼的病理検査を行うこととしたが、死亡例は認められなかった。

試験結果

暴露方法	吸入
暴露濃度 (mg/L)	2.61
LC ₅₀ (mg/L)	雄 >2.61 雌 >2.61
死亡開始時間および終了時間	雌雄ともに死亡なし
症状発現および消失時期	暴露中～暴露終了1日後
毒性徴候の認められなかった最高暴露濃度 (mg/L)	雄 <2.61 (体重増加抑制等) 雌 2.61
死亡例の認められなかった最高暴露濃度 (mg/L)	雄 2.61 雌 2.61

中毒症状としては、暴露期間に雌雄に関係なく異常呼吸および半眼が認められたが、暴露終了後1日には認められなくなった。死亡動物は認められなかった。

体重に関しては、暴露群の雄においてのみ暴露後1日に軽度の体重増加抑制が認められたが、暴露群における雄のその後の観察期間および雌における体重増加量は対照群と同等であった。

摂餌量に関しては、雌雄ともに被験物質暴露による影響は認められなかった。

飲水量に関しては、暴露群においては雄では暴露後1日にのみ増加が認められたが、雌では対照群と同等であった。

肉眼的病理検査では暴露群の雄1例に肺の腫脹、全ての肺葉における中程度のうっ血、および気管内の泡沫状液体貯留が認められた。しかしながら、本例には一般症状あるいはその他の変化が認められないことから、その肉眼的病変の毒性的な意義は明らかではなかった。

肺重量対体重比に関しては、暴露群におけるいずれの動物にも正常範囲内の値が認められた。

以上から、本被験物質をラットに4時間吸入暴露（全身暴露）させた際のLD₅₀は2.61 mg/Lを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(1-5)ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 A-43)

試験機関：

{GLP 対応}

報告書作成年 年

被験物質： ビビフル粉剤DL (KUH-833粉剤DL)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩： 0.12%

鉱物質微粉等： 99.88%

供試動物： ニュージーランドホワイト種ウサギ、約 13~15 週齢、体重 2.9~3.5 kg、
雌 6 匹

観察期間： 72 時間

投与方法： 被験物質の 0.5 g を蒸留水 0.5 mL で湿し、ガーゼパッチ (25 x 25 mm) に塗布し、剪毛した動物の背部の皮膚に半閉塞貼付した。4 時間後にパッチを除去し、暴露部の皮膚を温水洗浄した。

観察・検査項目： 暴露終了後 1、24、48 および 72 時間に暴露部の皮膚の刺激性の変化 (紅斑・痂皮、浮腫) を観察し、農林水産省の指針に従って採点した。

試験結果： 認められた刺激性変化の採点結果は次頁表のとおりである。

観察期間中に投与局所の刺激性変化はいずれの動物にも認められなかった。

以上の結果よりプロヘキサジオンカルシウム塩の 0.12% 粉剤はウサギの皮膚に対して刺激性はないものと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

皮膚刺激性試験結果表

動物番号(性)	項目	最高評点	被験物質除去後の経過時間			
			1hr	2day	3day	4day
1297(雌)	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1298(雌)	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1299(雌)	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1300(雌)	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1301(雌)	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0
1364(雌)	紅斑・痂皮	4	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0

(1-6)ウサギにおける眼刺激性試験

(資料 A-42)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質： ビピフル粉剤DL (KUH-833粉剤DL)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩： 0.12%

鉱物質微粉等： 99.88%

供試動物： ニュージーランドホワイト種ウサギ、約 12~19 週齢、体重 2.6~3.9 kg、
雄 6 匹、雌 1 匹

観察期間： 7 日

投与方法： 被験物質の 100 mg (0.1 mL に相当) をそのまま片眼の結膜嚢内に投与した。反対側の眼を無処置対照とした。雌 1 匹の場合には、点眼 30 秒後に蒸留水で洗眼した。他の 6 匹 (雄動物) の場合には洗眼を行わなかった。

観察・検査項目： 投与 1、24、48 および 72 時間後ならびに 4 および 7 日後に角膜、虹彩、結膜の変化を観察し、農林水産省の指針に従って採点した。なお、採点値が次のいずれかの場合には被験物質の眼刺激性による陽性反応とした。

被験物質の眼刺激性による陽性反応と判定する採点値			
角膜混濁：	1~4	結膜の発赤：	2~3
虹彩：	1~2	結膜の浮腫：	2~4

試験結果： 認められた刺激性変化の採点結果は次頁の表のとおりである。

洗眼動物および非洗眼動物ともに、角膜および虹彩に対する刺激性は認められなかったが、結膜に対する軽微な刺激性変化が 1 時間後に全例で認められた。投与 24 時間後にはいずれの動物にも変化は認められなかった。被験物質による「陽性反応」は認められなかった。

投与 1 日後に 1 例が呼吸困難、眼の光沢鈍化、食欲不振および便秘を示し、投与 2 日後に死亡が確認された。本例の剖検時により肺の重度の鬱血、鼻口吻周囲の汚染、胃腸内の液体貯留が認められたが、死因は被験物質投与とは関係しないと思われた。

以上の結果より、プロヘキサジオンカルシウム塩の 0.12% 粉剤はウサギの眼に対して軽微な刺激性があると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

眼刺激性試験結果表

項目	最高 評点	投与後時間における評価点								
		1hr	24hr	48hr	76hr	4day	7day			
動物番号 1375 (雄)	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0
動物番号 1376 (雄)	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0
動物番号 1365 (雄)	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0	0	0	0
動物番号 1366 (雄)	角膜混濁	4	0	0	死亡					
	虹彩	2	0	0						
	結膜	発赤	3	1						0
		浮腫	4	1						0
動物番号 1367 (雄)	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0
動物番号 1368 (雄)	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0	0	0	0
平均採点値	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	0	
	虹彩	2	0	0	0	0	0	0	0	
	結膜	発赤	3	1.0	0	0	0	0	0	0
		浮腫	4	0.3	0	0	0	0	0	0
洗 眼 動 物	動物番号 1269 (雌)	角膜混濁	4	0	0	0	0	0	0	
		虹彩	2	0	0	0	0	0	0	
		結膜	発赤	3	1	0	0	0	0	0
			浮腫	4	0	0	0	0	0	0

注) 平均採点値は、申請者が計算した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(1-7) モルモットにおける皮膚感作性試験 (Buehler 法)

(資料 A-44)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質: ビビフル粉剤DL (KUH-833粉剤DL)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩: 0.12%

賦物質微粉等: 99.88%

供試動物: Dunkin-Hartley系モルモット、約7~8週齢、体重: 351~425 g、
1群雄10匹

観察期間: 30日間

試験方法: Buehler法

用量設定根拠: Alembicol D (椰子油製品) を媒体として調製した被験物質の70、50、30および10%(w/v)懸濁液をモルモット4匹の皮膚に貼付して予備試験を実施した。なお、70%(w/v)懸濁液は調製可能な最高濃度であった。いずれの濃度の場合でも皮膚刺激性反応が認められなかったため、試験した最高濃度である70%(w/v)懸濁液を感作および惹起に選択した。

感作暴露: 被験物質の70%(w/v)懸濁液(媒体: Alembicol D)の約0.5 mLをガーゼパッチ(20 x 20 mm)に浸み込ませ、被験物質感作群の動物の刈毛した左肩部の皮膚に6時間閉塞貼付した。
陽性対照物質感作群の動物には蒸留水で調製した30%(v/v)ホルマリンの約0.5 mLを同様に閉塞貼付した。
被験物質対照群の動物にはAlembicol Dのみを、また、陽性対照物質対照群の動物には蒸留水のみを同様に閉塞貼付した。
それぞれの群における上記の操作を初回感作の7日後および14日後にも同様にを行った(計3回の感作暴露)。

惹起暴露: 最終感作暴露の14日後に、被験物質の70%(w/v)懸濁液(媒体: Alembicol D)約0.5 mLを被験物質感作群および被験物質対照群の動物の刈毛した右側腹部の皮膚に6時間閉塞貼付した。
陽性対照物質感作群および陽性対照物質対照群の動物には、蒸留水で調製した15%(v/v)ホルマリンの約0.5 mLを同様に閉塞貼付した。

なお、動物の一般状態を毎日観察し、体重を試験開始日および観察期間終了日

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

に測定した。

観察・検査項目：Draizeの採点基準を用い、惹起暴露の24時間後および48時間後に貼付部位の紅斑・痲皮および浮腫の程度を肉眼的に観察して採点した。なお、被験物質感作群の動物で認められた皮膚反応が被験物質対照群で認められたそれと比べて重度である場合に、または長期に継続している場合に、その動物における被験物質の感作性を陽性と判定した。

試験結果：以下に被験物質および陽性物質群の惹起後の皮膚反応表を示す。

群	観察項目	惹起後 時間	皮膚反応の評点別の動物数					感作陽性率 (%)
			0	1	2	3	4	
被験物質感作群	紅斑・痲皮	24	10	0	0	0	0	0
		48	10	0	0	0	0	
	浮腫	24	10	0	0	0	0	
		48	10	0	0	0	0	
被験物質対照群	紅斑・痲皮	24	10	0	0	0	0	-
		48	10	0	0	0	0	
	浮腫	24	10	0	0	0	0	
		48	10	0	0	0	0	
陽性対照物質 感作群	紅斑・痲皮	24	2	4	4	0	0	80
		48	1	4	5	0	0	
	浮腫	24	10	0	0	0	0	
		48	10	0	0	0	0	
陽性対照物質 対照群	紅斑・痲皮	24	10	0	0	0	0	-
		48	10	0	0	0	0	
	浮腫	24	10	0	0	0	0	
		48	10	0	0	0	0	

被験物質感作群および被験物質対照群の動物では、惹起暴露終了後24時間および48時間の観察時に皮膚反応は全く認められなかった。すなわち、被験物質感作群のいずれの動物も被験物質の感作性は陰性であった。

一方、陽性対照物質感作群では、10例中8例で陽性対照物質対照群を上回る程

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

度の皮膚反応が認められ、感作陽性動物率は80%であった。

いずれの群のいずれの動物にも観察期間に一般状態の異常は認められず、また、体重増加が認められた。

以上の結果より、プロヘキサジオンカルシウム塩の0.12%粉剤の皮膚感作性は陰性と判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(2) 25.0%フロアブル (ビオロックフロアブル)

(2-1) ラットにおける急性経口毒性試験

(資料A-46)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年 年

被験物質 : ビオロックフロアブル (BX-112 25SC)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 : 25.0 %

水、界面活性剤等 : 75.0 %

供試動物 : Sprague-Dawley系ラット、約5~8週齢、1群雌雄各5匹、体重: 雄137~156 g、雌127~142 g

観察期間 : 14日間

投与方法 : 動物を投与前に一晩絶食させた動物に、被験物質の原液を単回強制経口投与した。

観察・検査項目 : 中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重を投与前、投与後7及び14日に測定した。

試験終了時の全生存動物について肉眼的病理検査を行った。なお、試験途中の死亡動物についても肉眼的病理検査を行うこととしたが、死亡動物は認められなかった。

試験結果 :

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 >5000 雌 >5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000
死亡の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

試験期間中に全身性の中毒症状はいずれの動物にも認められなかった。

体重に関しては、投与後のいずれの測定時にも雌雄の全例に体重増加が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

肉眼的病理検査では、いずれの動物にも異常な所見は認められなかった。

以上から、本被験物質をラットに単回経口投与させた際のLD₅₀は5000 mg/kgを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(2-2) マウスにおける急性経口毒性試験

(資料A-45)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年 年

被験物質：ピオロックフロアブル (BX-112 25SC)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩： 25.0%

水、界面活性剤等： 75.0%

供試動物：BKW系マウス、約5~8週齢、1群雌雄各5匹、体重：雄 25~29 g、雌 20~23 g

観察期間：14日間

投与方法：投与前に3~4時間絶食させた動物に、被験物質の原液を単回強制経口投与した。

観察・検査項目：中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重を投与前、投与後7及び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。なお、試験途中の死亡動物についても肉眼的病理検査を行うこととしたが、死亡例は認められなかった。

試験結果：

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	5000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 >5000 雌 >5000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	症状発現なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000
死亡の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 5000 雌 5000

試験期間中における全身性の中毒症状はいずれの動物にも認められなかった。

体重変化について、投与後のいずれの測定時にも異常は認められなかった。

肉眼的病理検査では、いずれの動物にも異常所見は認められなかった。

以上から、本被験物質をマウスに単回経口投与させた際の LD₅₀ は 5000 mg/kg を超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(2-3) ラットにおける急性経皮毒性試験 (限界試験)

(資料A-47)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年 年

被験物質: ビオロックフロアブル (BX-112 25SC)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩: 25.0%

水、界面活性剤等: 75.0%

供試動物: Sprague-Dawley系ラット、約10~14週齢、1群雌雄各5匹、体重: 雄 187~214 g、
雌 197~213 g

観察期間: 14日間

試験方法: 限界試験

投与方法: 被験物質の原液を背部の皮膚に半閉塞貼付した。
貼付24時間後に投与部の皮膚を蒸留水で湿らせた綿花で清拭した。

観察・検査項目: 中毒症状及び生死を14日間観察した。

体重を投与直前、投与開始後7及び14日に測定した。

試験終了時の全生存動物について適用部位を含む組織の肉眼的病理検査を行った。

なお、試験途中の死亡動物についても肉眼的病理検査を実施することとしたが、死亡動物は認められなかった

試験結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 >2000 雌 >2000
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 <2000 (腎臓の変化) 雌 <2000 (腎臓の変化等)
死亡の認められなかった 最高投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 2000

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

試験期間中に全身性の中毒症状はいずれの動物にも認められなかった。

体重に関しては、投与開始後7日に雌1例に体重減少が認められたが、その他の動物で体重増加量に異常は認められなかった。

肉眼的病理所見として、雄動物2匹及び雌動物3匹に腎臓の暗色化が認められた。

以上から、本被験物質をラットに単回経皮投与させた際のLD₅₀は2000 mg/kgを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(2-4)ラットにおける急性吸入毒性試験

(資料 A - 48)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質： ビオロックフロアブル (BX-112 25SC)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩： 25.0%

水、界面活性剤等： 75.0%

供試動物： Sprague-Dawley 系ラット (CrI:CD® BR, VAF/PLUS®)、

雄：約 8 週齢、雌：約 10 週齢、1 群雌雄各 5 匹、

体重 雄：268～286 g、雌：236～254 g

観察期間： 14 日間

暴露方法： 被験物質原液のミストエアロゾルを発生させ、それに動物を 4 時間、全身暴露させた。なお、試験した暴露濃度 (実際濃度) 1.9 mg/L はミストエアロゾルが発生可能な最高濃度であった。グラスファイバーフィルタを用いて暴露空気を捕集し、重量測定法により実際濃度を求めた。

暴露条件：

名目濃度 ¹⁾ (mg/L)	26.4
実際濃度 (mg/L)	1.9
粒子径分布 (%) :	
>5.27 μm	15.4
3.20 - 5.27	22.8
1.94 - 3.20	21.0
1.18 - 1.94	23.7
0.71 - 1.18	13.6
0.43 - 0.71	3.3
0.26 - 0.43	0.2
合 計	100.0
空気力学的質量中位径 (μm)	2.5
呼吸可能な粒子 (<10 μm) の割合 (%)	97.0
チャンバー容積 (L)	110
チャンバー内通気量 (L/min)	24
暴露条件	ダスト、4時間、全身暴露

¹⁾： 通気量と被験物質消費量から算出した濃度

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

観察・検査項目：暴露中及び暴露後 14 日間、中毒症状と生死を観察した。また、体重を暴露直前、暴露終了 3、7 及び 14 日に測定した。観察期間終了時の全生存動物につき肉眼的病理検査を実施した。なお、試験途中の死亡動物についても肉眼的病理検査を実施することとしたが、死亡例は認められなかった。

試験結果：

暴露方法	吸入
暴露濃度 (mg/L)	1.9
LC ₅₀ (mg/L)	雄 >1.9 雌 >1.9
死亡開始時間及び終了時間	死亡例なし
症状発現及び消失時間	暴露終了後 2 日に発現、 暴露終了後 3 日に消失
毒性徴候の認められなかった 最高暴露濃度 (mg/L)	雄 <1.9 (中毒症状) 雌 1.9
死亡例の認められなかった 最高投量 (mg/L)	雄 1.9 雌 1.9

中毒症状として、暴露終了後 2 日に雄 1 例でラッセル音が認められた。その他はいずれの動物にも暴露期間から観察期間の終了時までには毒性学的に意義のある症状は認められなかった。

暴露終了後の体重増加量に異常は認められなかった。

肉眼的病理検査では、いずれの動物にも異常所見は認められなかった。

以上から、本被験物質をラットに 4 時間吸入暴露（全身暴露）させた際の LD₅₀ は雌雄ともに 1.9 mg/L を超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(2-5) ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料A-50)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質： ビオロックフロアブル (BX-112 2SSC)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩： 25.0%

水、界面活性剤等： 75.0%

供試動物： ニュージーランドホワイト種ウサギ、約12~16週齢、体重：約2.15~2.45kg、
6匹 (雄5匹、雌1匹)

観察期間： 7日間

投与方法： 被験物質の0.5 mLをガーゼパッチ(2.5 x 2.5 cm)に塗布し、剪毛した動物の背部の皮膚に貼付した。4時間後にパッチを除去し、暴露部の皮膚をジエチルエーテルに浸した脱脂綿で清拭した。

観察・検査項目： 暴露終了後1、24、48、72時間および7日に暴露部の皮膚の刺激性変化(紅斑・痂皮、浮腫)を観察し、Draize, J.H.の方法に従って評点を付けた。暴露終了後24および72時間における採点値(計24データ)から得た皮膚一次刺激指数(P.I.I.)に従って、被験物質の皮膚刺激性を分類した。

試験結果： 認められた刺激性変化の採点結果は次頁の表のとおりである。

極めて軽度の紅斑が暴露終了1時間後に全例、24および48時間後にそれぞれ2例および72時間後に1例で認められた。極めて軽度の浮腫が暴露終了1時間後に5例および24時間後に1例で認められた。

得られたP.I.I. (0.3) から、被験物質は「軽度の刺激性物質」に該当した。

以上の結果より プロヘキサジオンカルシウム塩の25.0%フロアブルはウサギの皮膚に対して軽度の刺激性があると思われた。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

皮膚刺激性試験結果表

動物番号 (性)	項目	最高評点	被験物質除去後の経過時間				
			1hr	24hr	48hr	72hr	7day
95 (雄)	紅斑・痂皮	4	1	1	1	1	0
	浮腫	4	1	1	0	0	0
4 (雄)	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
25 (雄)	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0
	浮腫	4	0	0	0	0	0
59 (雌)	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
70 (雄)	紅斑・痂皮	4	1	1	1	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
71 (雄)	紅斑・痂皮	4	1	0	0	0	0
	浮腫	4	1	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	24	(6)	2	(2)	1	(0)
	浮腫	24	(5)	1	(0)	(0)	(0)

皮膚一次刺激指数 (P.I.I.) = (24 時間後の合計値+72 時間後の合計値) / 2 / 動物数 = 4 / 12
= 0.3

(): P.I.I. の計算に使用しない評点

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(2-6) ウサギにおける眼刺激性試験

(資料A-49)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質： ビオロックフロアブル (BX-112 2SSC)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩： 25.0 %
水、界面活性剤等： 75.0 %

供試動物： ニュージーランドホワイト種ウサギ、約12～16週齢、体重：2.20～3.36 kg、
6匹 (雄4匹、雌2匹)

観察期間： 72時間

投与方法： 被験物質の0.1 mLを右眼の結膜嚢内に投与した。左眼を無処置対照とした。

観察・検査項目：投与後1、24、48及び72時間に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察し、Draize
の評点基準に従って採点した。

試験結果： 観察した刺激性変化の採点結果は次頁の表のとおりである。

投与1時間後に2例に虹彩の炎症が、また、全例に結膜の軽微な刺激性反応が認められた。これらの変化はいずれも投与24時間後には消失した。

Draize の評価基準による投与後1、24、48及び72時間におけるそれぞれの平均評点にもとづき、Kay & Calandra の分類基準で被験物質を分類すると、「軽微な眼刺激性物質」に該当した。

以上の結果よりプロヘキサジオンカルシウム塩の25.0%フロアブルはウサギの眼に対し軽微な刺激性があるものと思われる。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

眼刺激性試験結果 非洗眼動物

項目			最高評点	投与後時間における評価点			
				1hr	24hr	48hr	72hr
動物番号 98 (雄)	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	1	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
動物番号 15 (雄)	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
動物番号 41 (雄)	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
動物番号 47 (雌)	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
動物番号 50 (雌)	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	0	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	0	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
動物番号 126 (雌)	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0
		面積	4	0	0	0	0
	虹彩		2	1	0	0	0
	結膜	発赤	3	1	0	0	0
		浮腫	4	1	0	0	0
		分泌物	3	0	0	0	0
合計評点			660	28	0	0	0
平均評点			110	4.7	0.0	0.0	0.0

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(2-7) モルモットにおける皮膚感作性試験 (Buehler法)

(資料A-51)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質: ビオロックフロアブル (BX-112 2SSC)

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩: 25.0%

水、界面活性剤等: 75.0%

供試動物: Dunkin-Hartley系モルモット、約8~12週齢、体重: 300~412 g、

被験物質感作群: 1群雌20匹、被験物質対照群: 1群雌20匹、

陽性対照物質感作群: 1群雌10匹、陽性対照物質対照群: 1群雌10匹

観察期間: 30日間

試験方法: Buehler法

用量設定根拠: 被験物質の感作濃度および惹起濃度を次の予備試験の結果にもとづき設定した。

感作濃度: 被験物質の非希釈液、50%、25%および10%(v/v)蒸留水希釈液のそれぞれ0.5 mLをモルモット2匹に6時間閉塞塗布した。その結果、被験物質の非希釈液でも皮膚刺激性が認められなかったため、非希釈液を感作暴露に用いた。

惹起濃度: 被験物質の非希釈液および75%(v/v)蒸留水希釈液のそれぞれ0.5 mLをモルモット2匹に6時間閉塞塗布した。その結果、被験物質の非希釈液でも皮膚刺激性が認められなかったため、非希釈液を惹起暴露に用いた。

感作暴露: 被験物質感作群の動物の刈毛した左側腹部の皮膚に、被験物質の非希釈液0.5 mLをリント布パッチ (約15 x 35 mm) に浸み込ませて6時間閉塞貼付した。陽性対照物質感作群の動物には2,4-dinitrochloro-benzene (DNCB)の0.5%(w/v)無水エタノール溶液0.5 mLを同様に閉塞貼付した。

被験物質対照群の動物にはパッチのみの貼付とした。また、陽性対照物質対照群の動物には無水エタノールのみを同様に閉塞貼付した。
それぞれの群における上記の操作を初回感作の7日後および14日後にも同様に行った (計3回の感作暴露)。

惹起暴露: 最終感作暴露の14日後に、被験物質感作群および被験物質対照群の動物の刈毛した右側腹部の皮膚に被験物質の非希釈液0.5 mLを同様に6時間閉塞貼付した。
同様に陽性対照物質感作群および陽性対照物質対照群の動物の右側腹部にDNCBの0.15%(w/v)無水エタノール溶液0.5 mLを同様に6時間閉塞貼付した。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

観察・検査項目：惹起暴露の24時間後および48時間後に貼付部位の紅斑の程度を肉眼的に観察して採点した。

なお、刺激性反応が対照群において認められる場合には、対照群における最高刺激点数を超える刺激評点を示す動物のみを感作反応陽性動物とした。

試験結果：次表に被験物質誘発後および陽性対照群の皮膚反応表を示す。

皮膚感作性試験結果 (Buehler法)

群	惹起後 時 間	皮膚反応の評点別の動物数				感作 陽性率 ³⁾
		0	1	2	3	
被験物質感作群	24	18 ¹⁾	0	0	0	0%
	48	18 ¹⁾	0	0	0	
被験物質対照群	24	19 ²⁾	0	0	0	—
	48	19 ²⁾	0	0	0	
陽性対照物質感作群	24	0	0	10	0	100%
	48	0	0	10	0	
陽性対照物質対照群	24	6	3	0	0	—
	48	6	3	0	0	

¹⁾ 感作暴露期間に2例を切迫屠殺

²⁾ 惹起暴露開始日に1例が死亡

³⁾ 感作陽性動物率

被験物質感作群では感作暴露期間に切迫屠殺動物が2例に、また、被験物質対照群では惹起暴露開始日に死亡動物が1例に認められたが、試験に及ぼす影響はないものと判断された。

被験物質感作群および被験物質対照群の動物に惹起暴露終了後24時間および48時間の観察時には、皮膚反応は全く認められなかった。

陽性対照物質感作群では既知のアレルギー反応が認められた。

試験期間における体重増加量は被験物質感作群と被験物質対照群との間で同等であった。また、陽性対照物質感作群では試験期間における体重増加量に低下が認められたが、投与による影響とは考えられなかった。

以上の結果から、プロヘキサジオンカルシウム塩の25.0%フロアブルの皮膚感作性は陰性と判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(3) 5.0%フロアブル (カルタイムフロアブル)

(3-1) ラットにおける急性経口毒性試験 (毒性等級法)

(資料 A-68)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質: カルタイムフロアブル

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 5.0%

水、界面活性剤等 95.0%

供試動物: Sprague-Dawley 系ラット、雌 6 匹、週齢 8 週、体重 174.4~186.0 g

観察期間: 14 日間観察

試験方法: 毒性等級法

投与方法: 約 16 時間絶食させたラット 5 匹に、被験物質 2000 mg/kg 体重を単回強制経口投与した。

用量設定根拠: 2000 mg/kg 投与でも死亡および毒性を示さないと予想されたため。

観察・検査項目: 死亡および毒性徴候等について、投与直後、投与後 30 分、1、2、4、6 時間、その後 14 日間、1 日 1 回観察した。

体重は投与直前、投与後 1、3、7、14 日に測定した。

生存動物は試験終了時に剖検を行い、体外表ならびに諸臓器の肉眼的観察を行った。

試験結果:

投与方法	経口
投与量 (mg/kg)	雌 2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雌 >2000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	中毒症状なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量	雌 2000
死亡の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雌 2000

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

観察期間を通じて、死亡例は見られなかった。

一般状態に異常は認められなかった。各動物の体重は順調に増加した。

試験終了時の剖検においても異常は認められなかった。

以上から、本被験物質をラットに急性経口投与させた際のLD₅₀は2000 mg/kgを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクミアイ化学工業株式会社にある。

(3-2) ラットにおける急性経皮毒性試験 (限界試験)

(資料 A-69)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質: カルタイムフロアブル

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 5.0%

水、界面活性剤等 95.0%

供試動物: Sprague-Dawley 系ラット 雌雄各 10 匹 週齢: 雄 8 週、雌 9 週

被験物質処理群 10 匹 (雌雄各 5 匹)、溶媒対照群 10 匹 (雌雄各 5 匹)

体重: 雄 291.6~331.9 g/動物、雌 217.1~237.1 g/動物

観察期間: 14 日間観察

試験方法: 限界試験

投与方法: 被験物質をリント布を用いて剪毛した部分に貼付し、24 時間後に温水およびガーゼを用いて除去した。対照群は注射用水を貼付した。

用量設定根拠: 2000 mg/kg 投与でも死亡および毒性を示さないと予想されたため。

観察・検査項目: 死亡および毒性徴候等について、投与直後、投与後 30 分、1、2、4 および 6 時間に観察した。その後 14 日間、1 日 1 回観察した。

体重は投与直前 (試験第 0 日)、投与後 1、3、7、14 日に測定した。

生存動物について試験終了時に剖検を行い、体外表ならびに諸臓器の内眼的観察を行った。変化の見られた臓器のみ保管した。

試験結果:

投与方法	経皮
投与量 (mg/kg)	2000
LD ₅₀ (mg/kg)	雄 >2000 雌 >2000
死亡開始時間および終了時間	死亡例なし
症状発現および消失時間	中重症状なし
毒性徴候の認められなかった最高投与量	雄 2000 雌 2000
死亡の認められなかった最高投与量 (mg/kg)	雄 2000 雌 2000

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

死亡例はなかった。

特に一般状態および皮膚反応は見られなかった。

投与後1日に雌雄の平均体重が減少したが、対照群でも同様に減少したことから、被験物質の影響ではないと考えられた。また、剖検において異常は認められなかった。

以上から、本被験物質をラットへ急性経口投与させた際のLD₅₀は、2000 mg/kgを超える値であると推定された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(3-3) ウサギにおける皮膚刺激性試験

(資料 A-70)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年 年

試験物質： カルタイムフロアブル

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 5.0%

水、界面活性剤等 95.0%

供試動物： ニュージーランドホワイト種ウサギ 雄3匹、週齢16週 体重：2.41~2.78 kg

観察期間： 14日間

投与方法： 剪毛した各ウサギの皮膚に試験物質 0.5 mL をリント布を用いて貼付し、包帯で固定した。4時間後に除去した。

観察・検査項目： 一般状態について毎日観察した。投与日および投与 72 時間後に体重を測定した。皮膚反応について、試験物質除去後 1、24、48、72 時間およびその後は 14 日まで毎日、Draize の方法に従い紅斑、痂皮、および浮腫の程度を評価した。

試験結果： 認められた刺激性変化の採点結果は次表のとおりである。

皮膚刺激性試験結果表

動物番号	項目	最高値	試験物質除去後の経過時間							
			1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	4~9 day	10 day	11 day	12~14 day
1101	紅斑・痂皮	4	2	2	3	4*	4*	2*	2	1
	浮腫	4	1	2	2	1	0	0	0	0
1102	紅斑・痂皮	4	2	2	3	4*	4*	2*	2	2
	浮腫	4	1	2	2	1	0	0	0	0
1103	紅斑・痂皮	4	2	2	3	4*	4*	2*	2	1
	浮腫	4	1	2	2	1	0	0	0	0
合計	紅斑・痂皮	12	6	6	9	12	12	6	6	4
	浮腫	12	3	6	6	3	0	0	0	0
平均	紅斑・痂皮	4	2.0	2.0	3.0	4.0	4.0	2.0	2.0	1.3
	浮腫	4	1.0	2.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0

*落屑が確認された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

パッチ除去後 1 時間に、全ての動物に紅斑が認められ、被験物質除去後 72 時間～9 日で最高になり、その後回復傾向がみられるが除去後 14 日の時点では全快しなかった。パッチ除去後 1 時間に、全ての動物に浮腫が認められ、被験物質除去後 24～48 時間で最高になったが、除去後 4 日には認められなくなった。

一般状態および体重推移の点では異常は認められなかった。

以上の結果、Draize による刺激性の指数**は 4.3 であり、本被験物質はウサギ皮膚に貼付した場合、中等度の刺激性を有すると判断された。

$$**1 \sim 72 \text{ 時間後の全評点の合計} + 12 = (9 + 12 + 15 + 15) + 12 = 4.25$$

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(3-4) ウサギにおける眼刺激性試験

(資料 A-71)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質： カルタイムフロアブル

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 5.0%
水、界面活性剤等 95.0%

供試動物： ニュージーランドホワイト種ウサギ 雄 6 匹、週齢 16 週、体重：2.44～2.83 kg

観察期間： 72 時間観察

試験方法： 被験物質 0.1 mL を 3 匹のウサギの右眼の結膜嚢内に投与した。投与直後約 1 秒間、
眼瞼を閉じて被験物質を保持した。左眼は無処理対照とした。
洗眼群は投与後 30 秒に注射用水で 30 秒間洗い流した。

観察・検査項目： 投与後 1、24、48、72 時間に角膜、虹彩、結膜について観察した。各動物の一
般状態は毎日観察した。また、投与日、投与後 3 日に体重を測定した。

試験結果： 認められた刺激性変化の採点結果は次頁表のとおりである。

非洗眼群の全例に、投与後 1 時間に虹彩変化や結膜の発赤、浮腫、分泌物が見られ
たが、虹彩は投与後 24 時間に、それ以外は投与後 72 時間に消失した。洗眼群につ
いても同様であった。

一般状態および体重変化において異常は認められなかった。

以上の結果、非洗眼群における投与後 1 時間のスコア 16.3、72 時間のスコア 0 であり、
Kay&Carandra の判定基準から、本被験物質はウサギの眼に対し軽度の刺激性を有すると判断され
た。また、明確な洗眼効果は認められなかった。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

眼刺激性試験結果表（非洗眼群）

項目				最高評点	投与後時間における評価点				
					1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	
非洗眼群	動物番号 1101	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
			面積	4	0	0	0	0	
		虹彩			2	1	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	1	1	0	
			浮腫	4	1	1	1	0	
			分泌物	3	2	1	0	0	
	動物番号 1102	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
			面積	4	0	0	0	0	
		虹彩			2	1	0	0	0
		結膜	発赤	3	2	2	1	0	
			浮腫	4	2	2	1	0	
			分泌物	3	3	2	1	0	
	動物番号 1103	角膜混濁	程度	4	0	0	0	0	
			面積	4	0	0	0	0	
		虹彩			2	1	0	0	0
		結膜	発赤	3	1	2	1	0	
			浮腫	4	2	2	1	0	
			分泌物	3	3	2	0	0	
合計点				330	49	30	14	0	
平均点				110	16.3	10.0	4.7	0.0	

眼刺激性試験結果表（洗眼群）

項目				最高評点	投与後時間における評価点 (カッコ内は最高点)				
					1 hr	24 hr	48 hr	72 hr	
洗眼群	3例の 平均値	角膜混濁	程度	4	0.0	0.0	0.0	0.0	
			面積	4	0.0	0.0	0.0	0.0	
		虹彩			2	1.0(1)	0.0	0.0	0.0
		結膜	発赤	3	1.3(2)	1.0(1)	0.7(1)	0.0	
			浮腫	4	1.7(2)	0.7(1)	0.3(1)	0.0	
			分泌物	3	1.7(2)	0.3(1)	0.0	0.0	
		合計				110	14.3	4.0	2.0

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(3-5) ウサギにおける希釈液の眼刺激性試験

(資料 A-72)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質： カルタイムフロアブル

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 5.0%
水、界面活性剤等 95.0%

供試動物： ニュージーランドホワイト種ウサギ、雄3匹、週齢16週、体重：2.58～2.65 kg

観察期間： 72 時間

投与方法： 被験物質の 600 倍希釈液 0.1 mL を 3 匹のウサギ右眼の結膜嚢内に投与した。投与直後約 1 秒間、眼瞼を閉じて被験物質を保持した。左眼は無処理対照とした。洗眼液は投与後 30 秒に注射用水で 30 秒間洗い流した。

観察・検査項目： 投与後 1、24、48、72 時間に角膜、虹彩、結膜について観察した。各動物の一般状態は毎日観察した。また、投与日、投与後 3 日に体重を測定した。

試験結果：

項目			最高評点	投与後時間における評価点 (カッコ内は最高点)			
				1 hr	24 hr	48 hr	72 hr
3 例の平均値	角膜混濁	程度	4	0.0	0.0	0.0	0.0
		面積	4	0.0	0.0	0.0	0.0
	虹彩		2	0.0	0.0	0.0	0.0
	結膜	発赤	3	0.0	0.0	0.0	0.0
		浮腫	4	0.0	0.0	0.0	0.0
		分泌物	3	0.0	0.0	0.0	0.0
合計			110	0.0	0.0	0.0	0.0

試験期間を通じて刺激性は認められなかった。

また、一般状態および体重推移の点でも異常は認められなかった。

以上の結果から、本被験物質の 600 倍希釈液は、ウサギの眼に対して刺激性はないと判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

(3-6) モルモットにおける皮膚感作性試験 (Buehler 法)

(資料 A-73)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年 年

被験物質: カルタイムフロアブル

[組成] プロヘキサジオンカルシウム塩 5.0%
水、界面活性剤等 95.0%

供試動物: ハートレー系モルモット、雄 40 匹、体重: 336~401 g、週齢 5 週
感作群: 20 匹、非感作群: 10 匹

試験方法: Buehler 法

試験期間: 30 日間

用量設定根拠: 2 匹のモルモットを用いて、被験物質原液および被験物質 50、25、12.5、6.25、3.25% 注射用水希釈液を 6 時間貼付した。被験物質原液で軽度の紅斑が見られ、被験物質希釈液では皮膚反応がないことから、感作暴露は被験物質原液、惹起暴露濃度は被験物質 50% とした。

感作暴露: 30 匹のモルモットを用意し、20 匹を感作群、10 匹を非感作群とした。
剪毛したモルモットの肩部位に被験物質を 2 cm 四方のパッチを用いて貼付した。
6 時間後に被験物質を除去した。同様の操作を初回感作後 7 日、14 日にも行った。
非感作群には注射用水を貼付した。

惹起暴露: 3 回目の感作暴露の 2 週間後に、モルモットの左右側腹部を剪毛し、被験物質および注射用水をそれぞれ同様に貼付した。6 時間後に被験物質を除去し、除去後 24 時間後および 48 時間後に皮膚の状態を観察した。非感作群も被験物質を用いて感作群と同様の操作を行った。

他観察事項: 一般状態を毎日 1 回観察した。体重は、初回感作日、最終日に測定した。

試験結果: 惹起暴露の試験結果は次頁表の通り。

感作群において惹起暴露後のモルモットに皮膚反応が認められた。
各動物の体重変化に異常は認められず、一般状態にも異常はなかった。

以上から、本被験物質は、モルモットの皮膚に対して感作性を有すると判断された。

本資料に記載された情報に係る権利および内容の責任はクマイ化学工業株式会社にある。

皮膚感作性試験 試験結果

群	処理物質		供試動物数	皮膚反応	24時間				重症度	48時間				重症度	発生率
					感作反応動物数					感作反応動物数					
					皮膚反応評点					皮膚反応評点					
					0	1	2	3		0	1	2	3		
感作群	被験物質原液	被験物質50%	20	紅斑または浮腫	13	7			0.35	13	7			0.35	35% (7/20)
		注射用水			20					20					
非感作群	注射用水	被験物質50%	10	紅斑または浮腫	10				0	10				0	0% (0/10)
		注射用水			10					10					

尚、本試験機関における陽性対照物質（1-chloro-2,4-dinitrobenzen（以下、CDNB）、溶媒：オリーブオイル）による背景データを以下に示す。（実施期間：2008年7月8日～8月7日）

群	暴露		供試動物数	24時間				重症度	48時間				重症度	発生率
				感作反応動物数					感作反応動物数					
				皮膚反応評点					皮膚反応評点					
				0	1	2	3		0	1	2	3		
対照	オリーブオイル	オリーブオイル	10	10				0	10				0	10/10
		CDNB 0.1%	10	10				0	10				0	0/10
陽性対照	CDNB 1.0%	オリーブオイル	10	10				0	10				0	0/10
		CDNB 0.1%	10	0	0	4	6	2.6	0	0	4	6	2.6	10/10