
窒化ケイ素のラットを用いる単回経口投与毒性試験

最 終 報 告 書

作成日 2002年6月13日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

要約	7
緒言	8
方法	
1. 被験物質および媒体	8
2. 投与検体および濃度確認	8
3. 使用動物および飼育条件	9
4. 投与経路, 投与方法, 群構成および投与量	10
5. 観察および検査項目	11
6. 統計解析	11
結果および考察	
1. 死亡状況および一般状態	11
2. 体重	11
3. 剖検	11
文献	12

Attachment, Table, Fig. および Appendix の目次

Table 1	Mortality and LD ₅₀ value of rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	15
Table 2	General signs of male rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	16
Table 3	General signs of female rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	17
Table 4	Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	18
Table 5	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	19
Table 6	Necropsy findings of male rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	20
Table 7	Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	21
Fig.1	Chemical structure of silicone nitride	22
Fig.2	Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	23
Fig.3	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride	24

要約

窒化ケイ素を雌雄ラット各群 5 例に 1 回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、2000 mg/kg を最高用量とし、以下公比 2 により 1000, 500 および 250 mg/kg とした。対照として媒体(0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液)投与群を設けた。

1. 死亡状況および一般状態

死亡例は、いずれの群の雌雄にも認められなかった。

一般状態の観察において、いずれの群の雌雄にも異常はみられなかった。

2. 体重

各投与群の雌雄とも、体重推移に異常はみられなかった。

3. 剖検

いずれの群の雌雄にも異常はみられなかった。

以上の結果から、窒化ケイ素の LD₅₀ 値は、雌雄とも 2000 mg/kg を上回ると推定される。

緒言

窒化ケイ素(CAS No.12033-89-5)が人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test(401)に従って、窒化ケイ素を雌雄ラットに1回経口投与して、その毒性について検討した。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の窒化ケイ素(CAS No.12033-89-5)は、Fig.1 に示す化学構造を有し、分子量:140.29、沸点:約1900 °Cで昇華、比重:3.18であり、水、アセトン、DMSO に不溶の灰白色系の粉末である。当試験には、2001年2月19日に厚生労働省 医薬局審査管理課 化学物質安全対策室から提供されたものを用いた[製造元: _____, Lot No. _____]、純度:約97 wt%、ただし、不純物としてFeを520 ppm, Alを820 ppm, Caを110 ppm, Oを1.7%含む。入手後は、試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温・防湿条件下で保管した。なお、反復投与毒性試験の投与期間終了後に当試験施設での保管分を除いた残余被験物質を _____ に返却し、その一部について検査した結果、使用期間中の安定性が確認された。媒体として、0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。

2. 投与検体および濃度確認

0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液(以下、0.5 w/v%CMC-Na)は、カルボキシメチルセルロースナトリウム(Lot No.7416, 丸石製薬株式会社, 使用期限:2002年5月7日)を注射用水(Lot No.0H93N, 株式会社大塚製薬工場, 使用期限:2005年8月)に溶解して調製した。0.5 w/v%CMC-Naは、試験施設の被験物質保管室の保管庫に冷所(1~10 °C)保管した。窒化ケイ素は、0.5 w/v%CMC-Naで200 mg/mLとなるように、懸濁して調製した。100, 50および25 mg/mL懸濁液は、200 mg/mL懸濁液を0.5 w/v%CMC-Naで段階希釈して調製した。なお、被験物質の調製に際して、純度による換算を実施した。

2~200 mg/mLの調製液は、室温・遮光条件下で6時間保存しても安定性に問題のないことが確認されている¹⁾(Attachment 1)。各濃度の調製液は、用時調製とし、調製後6時間以内に使用した。投与後の残余投与検体は廃棄した。

投与に使用した各投与検体中の被験物質濃度を試験施設内で乾燥重量法により測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃度の99.6~106.8%であり、濃度に問題はなかった(Attachment 2)。

3. 使用動物および飼育条件

3.1 動物種および系統

試験には、毒性試験に一般的に用いられている動物種で、その系統維持が明らかである Sprague-Dawley 系雌雄ラット[Crj:CD(SD)IGS, SPF]を用いた。動物は、2001年5月30日に日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から4週齢で雌雄各31匹を入手した。入手後1日の体重範囲は、雄が75~85 g, 雌が63~78 gであった。

3.2 検疫および馴化, 群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後4日間の馴化期間を設けた。この間に、体重測定を4回とおよび一般状態の観察を毎日行って検疫・馴化とし、一般状態および体重推移に異常の認められなかった動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った。また、個々の動物の体重が平均体重の±20%を越えていないことを確認した。群分け後の残余動物は、投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した。

動物の個体識別は、検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法および色素塗布法を、群分け後は油性インクによる色素塗布法および耳パンチ法を併用して行った。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日および検疫・馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、投与量および動物番号を記入し、群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

3.3 環境条件および飼育管理

動物は、室温 20~26 °C(実測値:21~23 °C)、湿度 40~70%(実測値:49~63%)、明暗各12時間(照明:午前6時~午後6時)、換気回数12回/時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に維持されている飼育室(E棟9号室、ただし、検疫期間はE棟2号室)で飼育した。

検疫・馴化期間中および群分け前の絶食時間中は、ステンレス製懸垂式ケージ(W:240×D:380×H:200 mm)を用いて1ケージ当たり5匹までの雌雄別群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージ(W:755×D:210×H:170 mm)を用いて個別飼育した。ケージの受け皿および給水瓶の交換は1週間に2回以上、ステンレス製五連ケージならびに給餌器の交換は2週間に1回以上行った。なお、動物飼育室の清掃(床の掃き掃除)および0.02%次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。

3.4 飼料および飲料水

飼料は、製造後5ヵ月以内の固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻(午後4時)から投与までの約18時間30分と投与後約6時間まで絶食させ、その後に飼料を与えた。使用した同一ロットの飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社で実施した成績を入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約6時間までは絶水させ、その後に飲料水を与えた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ6ヵ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料および飲料水の分析結果は、いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

4.1 投与経路および投与方法

窒化ケイ素は、経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒(テルモ株式会社)を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として10 mL/kgで算出した。投与時刻は午前10時37分～11時12分の間で、投与回数は1回とした。

投与日の週齢は5週齢であり、体重範囲は雄が114～130 g、雌が99～112 gであった。

4.2 群構成および投与量

群構成は、下記のように被験物質投与群として4群を設定し、その他に対照群を設けた。1群の動物数は、雌雄それぞれ5匹とした。

群	試験群	投与量 (濃度)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
第1群	対照(0.5 w/v% CMC-Na)	0 mg/kg (0 mg/mL)	5(M01101～M01105)	5(F01151～F01155)
第2群	窒化ケイ素	250 mg/kg (25 mg/mL)	5(M02201～M02205)	5(F02251～F02255)
第3群	窒化ケイ素	500 mg/kg (50 mg/mL)	5(M03301～M03305)	5(F03351～F03355)
第4群	窒化ケイ素	1000 mg/kg (100 mg/mL)	5(M04401～M04405)	5(F04451～F04455)
第5群	窒化ケイ素	2000 mg/kg (200 mg/mL)	5(M05501～M05505)	5(F05551～F05555)

当試験では、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test(401)で限界用量とされている2000 mg/kgを最高用量とし、以下公比2により1000、500および250 mg/kg群を設定した。また、対照として媒体(0.5 w/v%CMC-Na)のみを同容量投与する群を設けた。

5. 観察および検査項目

5.1 観察期間

投与後 14 日間とした。

5.2 一般状態

投与日は投与前および投与後 6 時間(投与直後～投与後 30 分, 投与後 2, 4 および 6 時間)まで, 投与翌日からの観察期間中は 1 日 1 回, 一般状態および死亡の有無を観察した。

5.3 体重測定

投与日(投与直前)および投与後 1, 3, 7, 10 ならびに 14 日に測定した。

5.4 剖検

動物は, 観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

6. 統計解析

いずれの群の雌雄とも, 死亡例が認められなかったため, LD_{50} 値は推定した。

有意差検定は下記のように, 対照群と各投与群の間で行い, 危険率を 5%とし, 5%未満($p < 0.05$)と 1%未満($p < 0.01$)とに分けて表示した。

〈検定方法〉

体重は, 各群で平均値および標準偏差を算出した。その後, Bartlett 法による等分散性の検定を行い, 等分散の場合には Dunnett 法により, 等分散と認められなかった場合には順位を利用した Dunnett 型の検定法により行った。

結果および考察

1. 死亡状況および一般状態(Table 1~3, Appendix 1-1~1-5 および 2-1~2-5)

いずれの群の雌雄とも, 死亡例は認められなかった。窒化ケイ素の LD_{50} 値は, 雌雄とも 2000 mg/kg を上回ると推定される。

一般状態の観察において, いずれの群の雌雄とも異常はみられなかった。

2. 体重(Table 4 および 5, Fig.2 および 3, Appendix 3-1~3-5 および 4-1~4-5)

各投与群の雌雄とも, 対照群と比べて体重に有意差はみられなかった。

3. 剖検(Table 6 および 7, Appendix 5-1~5-5 および 6-1~6-5)

いずれの群の雌雄とも, 異常はみられなかった。

以上のように, 窒化ケイ素の雌雄ラットへの 1 回経口投与により, 雌雄とも 2000 mg/kg 投与

しても死亡例が認められず，一般状態，体重および剖検所見にも異常はみられなかった．窒化ケイ素のLD₅₀値は，雌雄とも2000 mg/kgを上回ると推定される．

文献

- 1) 渡邊ゆかりほか：窒化ケイ素調製液の安定性確認試験(試験番号：093220)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)

Table 1 Mortality and LD₅₀ value of rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride

Sex	Group	mg/kg	Number of animals	Number of deaths																	Total number of deaths	LD ₅₀ (mg/kg)
				Hours after administration				Days after administration														
				0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Male	Control	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LD ₅₀ >2000
	silicone nitride	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Female	Control	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LD ₅₀ >2000
	silicone nitride	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2 General signs of male rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Hours after administration				Days after administration														
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Control	0	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
silicone nitride	250	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 3 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Hours after administration				Days after administration													
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
silicone nitride	250	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 4 Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride

Group	Control	silicone nitride			
mg/kg	0	250	500	1000	2000
Number of males	5	5	5	5	5
Days after administration					
0	122 ± 5	122 ± 4	122 ± 5	122 ± 5	120 ± 4
1	139 ± 5	139 ± 6	140 ± 5	139 ± 5	137 ± 5
3	159 ± 8	159 ± 11	160 ± 9	160 ± 4	155 ± 5
7	187 ± 8	188 ± 10	192 ± 9	189 ± 8	181 ± 11
10	214 ± 11	216 ± 11	225 ± 13	213 ± 10	209 ± 14
14	243 ± 12	250 ± 13	260 ± 15	247 ± 7	245 ± 16

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 5 Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride

Group	Control		silicone nitride			
mg/kg	0		250	500	1000	2000
Number of females	5		5	5	5	5
Days after administration						
0	105 ± 4		105 ± 4	105 ± 4	106 ± 5	105 ± 3
1	122 ± 5		120 ± 2	120 ± 4	122 ± 7	119 ± 3
3	138 ± 8		136 ± 3	135 ± 4	140 ± 9	136 ± 7
7	155 ± 6		152 ± 4	150 ± 4	154 ± 11	155 ± 7
10	166 ± 8		161 ± 7	162 ± 8	167 ± 10	162 ± 8
14	176 ± 10		171 ± 7	172 ± 7	175 ± 11	172 ± 9

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 6 Necropsy findings of male rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride

Group	Control	silicone nitride			
		250	500	1000	2000
mg/kg	0	250	500	1000	2000
Number of males	5	5	5	5	5
Findings					
Normal	5	5	5	5	5

Table 7 Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride

Group	Control	silicone nitride			
mg/kg	0	250	500	1000	2000
Number of females	5	5	5	5	5
Findings					
Normal	5	5	5	5	5



Fig. 1 Chemical structure of silicone nitride

Study No. 403520

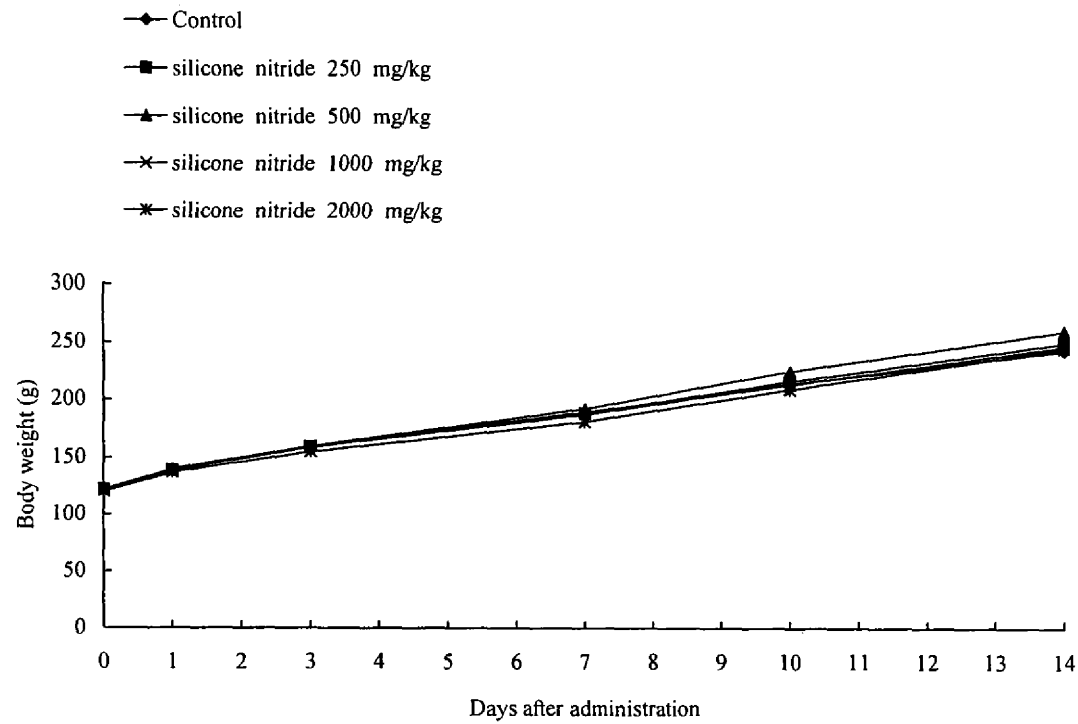


Fig. 2 Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride

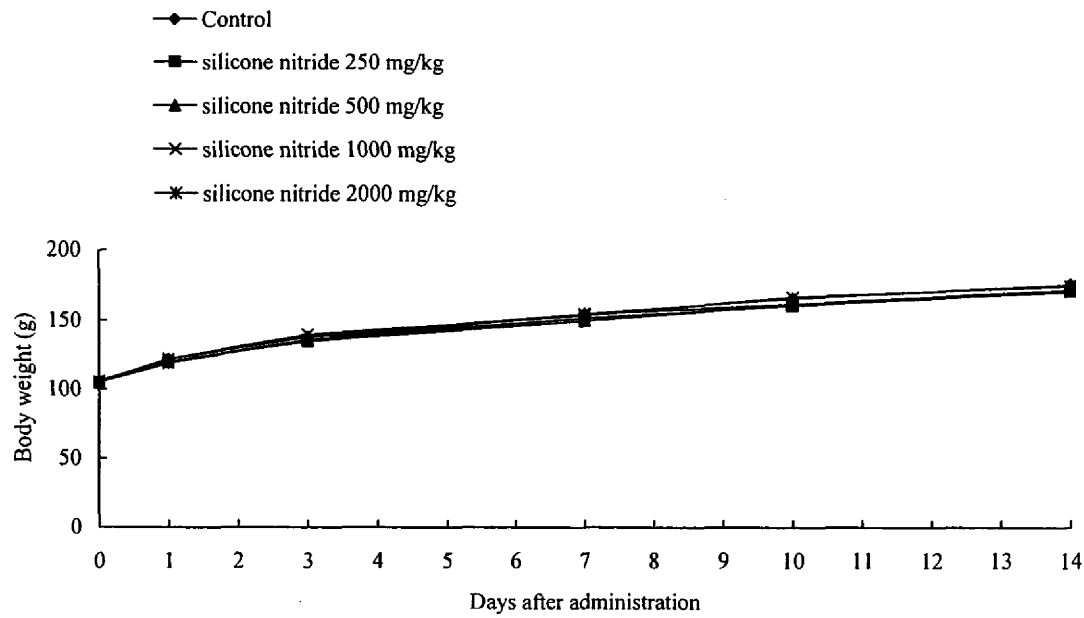


Fig. 3 Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of silicone nitride