

## 最終報告書

窒化ケイ素のは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号：B010043)

2002年2月28日

株式会社三菱化学安全科学研究所

## 目次

要約	5
材料および方法	6
1. 試験物質	6
2. 細胞	7
3. 培地	7
4. S9 mix	7
5. 試験物質溶液および懸濁液の調製	8
6. 細胞増殖抑制試験	9
7. 染色体異常試験	10
8. 結果のまとめ	12
結果	13
考察および結論	14
参考文献	14
表 1 染色体異常試験の結果（短時間処理法）[本試験 2]	16
表 2 染色体異常試験の結果（連続処理法）[本試験 3]	17
図 1 窒化ケイ素の細胞毒性（短時間処理法・-S9 mix）	18
図 2 窒化ケイ素の細胞毒性（短時間処理法・+S9 mix）	18
図 3 窒化ケイ素の細胞毒性（連続処理法）	19
図 4 窒化ケイ素の構造異常細胞出現頻度（短時間処理法）	20
図 5 窒化ケイ素の数的異常細胞出現頻度（短時間処理法）	20
図 6 窒化ケイ素の構造異常細胞出現頻度（連続処理法）	21
図 7 窒化ケイ素の数的異常細胞出現頻度（連続処理法）	21

## 要約

雌チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/TU を用い、窒化ケイ素の *in vitro* における染色体異常試験を実施した。

予備試験の結果に基づいて、細胞増殖抑制試験の用量は、短時間処理法の S9 mix 非共存下（以下 -S9 mix）で 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/mL}$ , S9 mix 共存下（以下 +S9 mix）で 50, 100, 200, 300, 625, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g/mL}$ , 連続処理法の 24 時間処理（以下 24 時間処理）で 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/mL}$  を設定した。その結果、被験物質による 50%細胞増殖抑制用量は -S9 mix で 187  $\mu\text{g/mL}$ , +S9 mix で 387  $\mu\text{g/mL}$ , 24 時間処理で 70  $\mu\text{g/mL}$  であった。

この結果に基づき、短時間処理法の本試験 1 は、-S9 mix で 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/mL}$ , +S9 mix, で 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/mL}$  を設定した。

短時間処理法の本試験 1 の細胞増殖率測定および予備鏡検の結果、-S9 mix では観察対象となる標本が 3 用量以上得られず、+S9 mix では 50%以上の細胞増殖抑制が認められなかった。このため、-S9 mix で 12.5, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/mL}$ , +S9 mix で 100, 200, 400, 800, 1600, 2400  $\mu\text{g/mL}$ , を設定し本試験 2 を実施した。

短時間処理法の本試験 2 の標本観察の結果、染色体異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの用量においても 5%未満であった。

細胞増殖抑制試験の結果に基づき、連続処理法 24 時間処理の本試験 1 は 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$  を設定した。

連続処理法の本試験 1 の細胞増殖率測定の結果、細胞増殖抑制試験と著しく異なる細胞毒性が認められ、また 50%以上の細胞増殖抑制も認められなかった。このため、24 時間処理で 50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/mL}$  を設定し本試験 2 を実施した。

連続処理法の本試験 2 の予備鏡検の結果、24 時間処理の陽性対照において、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度が 10%未満であった。このため、本試験 2 と同用量で本試験 3 を実施した。

連続処理法の本試験 3 の標本観察の結果、染色体異常を持つ細胞の出現頻度は、いずれの用量においても 5%未満であった。

従って、窒化ケイ素は、本試験条件下において CHL/TU 細胞に対する染色体異常誘発性を有さないと結論した。

## 材料および方法

### 1. 試験物質

#### 1.1 被験物質

から提供された窒化ケイ素を使用時まで室温、気密で保存し、  
使用した。被験物質の純度、組成および物理化学的性質は以下の通りである。

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	窒化ケイ素		
別 名	_____		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合 は、その製法の概要)	$\text{Si}_3\text{N}_4$		
試験に供した新規 化学物質の純度	約 97 wt%	試験に供した新規 化学物質の Lot No.	
不純物の名称及び濃度	Fe : 520 ppm, Al : 820 ppm, Ca : 110 ppm, O : 1.7%		
CAS 番号	12033-89-5	蒸 気 圧	—
分 子 量	140.28	分配係数	—
融 点	—	常温における性状	灰白色系粉末
沸 点	約 1900°C で昇華		
安 定 性	水と混合すると僅かにアンモニアを生ずる場合もある。		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	不溶	—
	DMSO	不溶	—
	アセトン	不溶	—
	その他	—	—

DMSO: ジメチルスルホキシド

## 1.2 陰性対照物質（被験物質の懸濁媒体）

局方生理食塩液（以下生食，株大塚製薬工場，ロット番号 K0E98, K0E00, K1B75）

## 1.3 陽性対照物質

マイトマイシン C（以下 MMC，協和発酵工業株，ロット番号 328AJF，含量 100%）

ベンゾ [a] ピレン（以下 BP，東京化成工業株，ロット番号 GG01，含量 95.6%）

## 2. 細胞

雌チャイニーズハムスター肺由来細胞株 CHL/TU を使用した。この細胞は、染色体数のモードが 25 本と少なく、染色体が比較的大きいため標本観察が容易である等の利点があり、培養細胞を用いる染色体異常試験で広く使用されている。

細胞は 2001 年 2 月 14 日に大日本製薬株から購入し、細胞懸濁液に対し最終 10 v/v% の割合で DMSO（関東化学株，ロット番号 204G1360）を添加したものを 1 mL に小分けし、液体窒素中で凍結保存した。試験には、これを融解して培養し、融解後 4 週間以内のものを使用した。細胞の培養には、プラスチックプレート（直径 6 cm または 10 cm ; Becton Dickinson and Company）を用い、炭酸ガス細胞培養装置内（炭酸ガス 5%，温度 37℃ に設定，加湿，NAPCO 社，7300 型）で培養した。

## 3. 培地

### 3.1 MEM

イーグル MEM 培地「ニッスイ」①（日水製薬株，ロット番号 436011, 439011, 43910311）約 8.3 g を精製水 880 mL に溶解し、オートクレーブ滅菌（121℃，15 分間）後，別に滅菌処理した 2.92 w/v% L-グルタミン水溶液と 10 w/v% 炭酸水素ナトリウム水溶液をそれぞれ 8.8 mL，11.2 mL 添加した。以下この溶液を MEM とする。

### 3.2 MEM 培地

MEM 900 mL に，非働化（56℃，30 分間加熱処理）した仔牛血清（GIBCO BRL，ロット番号 1027934, 296130）を 100 mL 添加した。

## 4. S9 mix

### 4.1 S9

フェノバルビタール（1 日目に 30 mg/kg を 1 回腹腔内投与，2 日目以降 60 mg/kg を

1日1回3日間腹腔内投与)と5,6-ベンゾフラボン(3日目に80 mg/kgを1回腹腔内投与)で酵素誘導したSD系雄ラット肝由来S9(キッコーマン(株),ロット番号RAA-441,2001年3月9日製造)を購入したものを使用した。購入したS9は使用時まで-80℃以下(実測値;-84~-81℃)に設定した超低温冷凍庫で保存した。

#### 4.2 S9 mix

S9 mix 1 mLあたり以下の組成で用時調製し、使用時まで氷中に保存した。

S9	0.3 mL
D グルコース 6-リン酸	5 $\mu$ mol
$\beta$ -NADP <sup>+</sup>	4 $\mu$ mol
HEPES (pH 7.2)	4 $\mu$ mol
塩化マグネシウム六水和物	5 $\mu$ mol
塩化カリウム	33 $\mu$ mol
精製水	残量

### 5. 試験物質溶液および懸濁液の調製

#### 5.1 被験物質懸濁液の調製

溶媒検討の結果、本被験物質は生食に50 mg/mLではほぼ均一に懸濁し、発熱、発泡、変色などは認められなかった。DMSOおよびアセトンにはそれぞれ500 mg/mLで不溶であった。1w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液には50 mg/mLで均一に懸濁したが、生食を媒体としたほうが懸濁状態が良好であった。これらの結果から、本被験物質の溶媒(懸濁媒体)には生食を用いた。

被験物質を秤量し、生食を加え、振盪攪拌および超音波処理により懸濁させて下記濃度の最高濃度懸濁液を調製した。

細胞増殖抑制試験：50 mg/mL

染色体異常試験(短時間処理法・本試験1)：8 mg/mL

染色体異常試験(短時間処理法・本試験2)：24 mg/mL

染色体異常試験(連続処理法・本試験1)：2 mg/mL

染色体異常試験(連続処理法・本試験2, 本試験3)：5 mg/mL

最高濃度懸濁液を生食で段階希釈し、各処理用量の10倍濃度の被験物質懸濁液を調製した。被験物質懸濁液は、用時調製とした。

#### 5.2 陽性対照物質溶液の調製

MMCは、2 mg入りバイアル瓶の内容物を、注射用水(株)大塚製薬工場,ロット番号K9I83)5 mLに用時溶解した(400  $\mu$ g/mL溶液)。これを生食(株)大塚製薬工場,ロット

番号 K0E00, K1B75) で段階希釈し, 各処理条件で使用する最終用量の 10 倍溶液を調製した (短時間処理法:  $1 \mu\text{g/mL}$ , 連続処理法:  $0.3 \mu\text{g/mL}$ ).

BP は, 処理用量の 200 倍濃度の溶液を調製 (DMSO (関東化学株), ロット番号 204G1360, 207G1673) に  $4 \text{ mg/mL}$  で溶解) した. 使用時まで凍結保存した.

## 6. 細胞増殖抑制試験

### 6.1 被験物質用量

細胞増殖抑制試験に先立ち,  $-S9 \text{ mix}$  および  $+S9 \text{ mix}$  ならびに 24 時間処理において,  $50, 500, 5000 \mu\text{g/mL}$  で予備試験を実施した. この試験では, 1 用量あたり 1 枚のプレートを用いた. 位相差倒立顕微鏡でプレートを観察し, 陰性対照物質処理プレートの細胞密度を 100% として, 被験物質処理プレートの細胞密度を相対的に判断した.

その結果, 被験物質処理プレートの細胞密度は下記の通りであった.

処理群 \ 用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	50	500	5000
$-S9 \text{ mix}$	100%	10%	0%
$+S9 \text{ mix}$	100%	50%	10%
24 時間処理	70%	10%	0%

以上の結果から, 細胞増殖抑制試験は下記の用量を設定した.

$-S9 \text{ mix}$  : 50, 100, 200, 300, 400,  $500 \mu\text{g/mL}$

$+S9 \text{ mix}$  : 50, 100, 200, 300, 625, 1250, 2500,  $5000 \mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400,  $500 \mu\text{g/mL}$

### 6.2 細胞処理

$4 \times 10^3$  個/mL に調製した細胞懸濁液を 6 cm プレートに 5 mL ずつ播き, 3 日間前培養した.

MEM 培地を除去した後, 下記の組成の細胞処理液を 1 用量あたり 2 枚のプレートに加え, 連続処理法では 24 時間, 短時間処理法では 6 時間細胞を処理した. 短時間処理法では 6 時間後, MEM で細胞表面を 1 回洗浄し, 新たに MEM 培地 5 mL を加え, さらに 18 時間培養した. 陰性対照物質として懸濁媒体を用い, 下記条件で同様に処理した.

	被験物質懸濁液 または陰性対照物質	S9 mix	MEM培地
-S9 mix	0.3 mL	—	2.7 mL
+S9 mix	0.3 mL	0.5 mL	2.2 mL
24 時間処理	0.5 mL	—	4.5 mL

### 6.3 細胞増殖率の測定

細胞表面を  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  フリーのリン酸緩衝液（以下 PBS(-), ダルベッコ PBS「ニッスイ」, 日水製薬(株)）で洗浄後, 0.25 w/v% トリプシン処理し, 培養液を加えて細胞を剥離した後, 血球計算盤で細胞を計数した。

### 6.4 50%細胞増殖抑制用量の算出

各処理条件について, 陰性対照値を100%として生存曲線を作成し, 被験物質の50%細胞増殖抑制用量 ( $\text{IC}_{50}$ ) を算出した。なお,  $\text{IC}_{50}$  は, 細胞増殖率が50%を示す用量を挟む2点を結ぶ直線式より算出した。

## 7. 染色体異常試験

染色体異常試験は, まず, 短時間処理法のみを実施した。その結果, 陰性結果が得られたため, 連続処理法の染色体異常試験を実施した。

### 7.1 被験物質用量および陽性対照物質用量

細胞増殖抑制試験の結果は図1, 2に示すごとく,  $\text{IC}_{50}$  は -S9 mix で  $187 \mu\text{g/mL}$ , +S9 mix で  $387 \mu\text{g/mL}$ , 24時間処理で  $70 \mu\text{g/mL}$  であった。

この結果より, 染色体異常試験（本試験1）は, 下記の用量を設定した。

-S9 mix : 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix : 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/mL}$

24 時間処理 : 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$

短時間処理法の本試験 1 の結果に基づいて, 短時間処理法の本試験 2 は下記の用量を設定した（詳細は「結果」参照）。

-S9 mix : 12.5, 25, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/mL}$

+S9 mix : 100, 200, 400, 800, 1600, 2400  $\mu\text{g/mL}$

連続処理法の本試験 1 の結果に基づいて, 連続処理法の本試験 2 は下記の用量を設定した（詳細は「結果」参照）。



24 時間処理：50, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu$ g/mL

連続処理法の本試験 2 の結果に基づいて、連続処理法の本試験 3 は、本試験 2 と同じ用量を設定した（詳細は「結果」参照）。

陽性対照物質の用量は、-S9 mix では MMC を 0.1  $\mu$ g/mL、24 時間処理では MMC を 0.03  $\mu$ g/mL とした。+S9 mix では BP を 20  $\mu$ g/mL とした。これらは、いずれも染色体異常誘発性が知られている用量である。

## 7.2 細胞処理

細胞増殖抑制試験と同様に細胞を処理した。

陽性対照については、下記の組成の細胞処理液で同様に細胞を処理した。

	MMC 溶液	BP 溶液	S9 mix	MEM 培地
-S9 mix	0.3 mL	—	—	2.7 mL
+S9 mix	—	0.015 mL	0.5 mL	2.5 mL
24 時間処理	0.5 mL	—	—	4.5 mL

## 7.3 標本作製

標本作製の 2 時間前にコルセミドを最終用量が 0.1  $\mu$ g/mL となるように加え、分裂中期細胞を蓄積した。処理終了後、細胞表面を PBS(-)で洗浄し、0.25 w/v%トリプシン処理にて細胞を剥離した後、遠心管に回収し、遠心分離（1000 rpm, 5 分間；以下同様）により細胞を集めた。上清を除去後、各遠心管に 0.075 mol/L 塩化カリウム溶液 4 mL を加えて低張処理（37°C, 15 分）を行った。次に、冷却したメタノール・酢酸 (3:1)(v/v)混合液（固定液）0.5 mL を加え細胞を半固定した後、遠心分離し、上清を除去した。さらに、同固定液 4 mL を加え、同様の操作を 2 回繰り返した。その後、適量の固定液で細胞を懸濁させ、濡らした手ぬぐいの上に置いたスライドガラスに 2 箇所滴下して乾燥させた。これを 3 v/v%ギムザ溶液で 20 分間染色し、水洗、乾燥後、封入して染色体標本とした。なお、標本は、各プレートにつき 2 枚作製した。

## 7.4 細胞増殖率の測定

標本作製と同時期における細胞増殖率の測定を実施した。標本作製時にトリプシン処理にて剥離した細胞の一部を採取し、血球計算盤で細胞を計数した。陽性対照群については測定を実施しなかった。

## 7.5 観察

### (1) 予備鏡検

標本作製後、試験の適否確認のため予備鏡検を行った。その結果、24 時間処理（本試験 3）の  $400 \mu\text{g/mL}$  の一方および  $500 \mu\text{g/mL}$  の標本において、プレート 1 枚あたりの分裂中期細胞が 50 個未満であったため、これらの標本は観察対象から除外した。また、陰性対照および陽性対照については、構造異常細胞の有無が適切であることを確認した。

### (2) 構造異常および数的異常

標本はすべてコード化し、盲検法で観察した。

プレート 1 枚につき 100 個、すなわち 1 用量 200 個の分裂中期細胞を盲検法で観察した。分裂中期細胞は、染色体がよく拡がった細胞を観察した。

構造異常は以下の分類<sup>1</sup>に従って観察した。ただし、動原体数が  $25 \pm 2$  または 35 以上でない細胞は除外した。

染色分体型切断  
 染色分体型交換  
 染色体型切断  
 染色体型交換（二動原体、環状染色体など）  
 断片化

ギャップは染色分体に見られる非染色部分の幅が染色分体の幅よりも狭いものとした。他の異常と区別して記録し、構造異常には含めなかった。

数的異常は動原体数が 35 以上のものとし、核内倍加細胞を含む倍数体細胞を数えた。

## 7.6 試験結果の判定基準

構造異常を 1 個以上もつ細胞を染色体異常細胞として集計した。

被験物質の染色体異常誘発性の判定は、各処理条件において、構造異常細胞および数的異常細胞の出現頻度が共に 5% 未満を陰性（-）、いずれか一方または両方が 5% 以上 10% 未満を疑陽性（±）、いずれか一方または両方が 10% 以上を陽性（+）とした。

## 8. 結果のまとめ

染色体構造異常および数的異常をもつ細胞の出現数ならびに合計およびそれぞれの出現頻度（%）を表示した。染色体異常は種類別に細胞数を表示した。また、細胞増殖抑制試験および染色体異常試験結果を図示した。

## 結果

細胞増殖抑制試験の結果、-S9 mix、+S9 mix および 24 時間処理における被験物質の 50% 細胞増殖抑制用量はそれぞれ 187, 387, 70  $\mu$ g/mL であった (図 1~3)。

短時間処理法の本試験 1 の細胞増殖率測定および予備鏡検の結果、-S9 mix では観察対象となる標本が 3 用量以上得られず、+S9 mix では 50% 以上の細胞増殖抑制が認められなかった (図 1)。このため、本試験 2 を実施した。なお、短時間処理法の本試験 1 の標本は、観察に使用しなかった。

短時間処理法 (本試験 2) の予備鏡検の結果、すべての用量でプレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られたため、すべてのプレートの標本を観察の対象とした。

短時間処理法 (本試験 2) の標本観察の結果、いずれの用量においても、染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5% 未満であった (表 1, 図 4, 5)。

連続処理法の本試験 1 の細胞増殖率測定の結果、細胞増殖抑制試験と著しく異なる細胞毒性が認められ、また 50% 以上の細胞増殖抑制も認められなかった (図 3)。このため、本試験 2 を実施した。なお、連続処理法の本試験 1 の標本は、予備鏡検を実施せず、観察にも使用しなかった。

連続処理法の本試験 2 の予備鏡検の結果、24 時間処理の陽性対照において、染色体構造異常を持つ細胞の出現頻度が 10% 未満であった。このため、本試験 2 と同用量で本試験 3 を実施した。なお、連続処理法の本試験 2 の標本は、観察に使用しなかった。

連続処理法 (本試験 3) の予備鏡検の結果、400  $\mu$ g/mL の一方および 500  $\mu$ g/mL において、プレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られなかったため、これらのプレートの標本は観察の対象から除外した (表 2)。

連続処理法 (本試験 3) の標本観察の結果、いずれの用量においても、染色体構造異常および数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5% 未満であった (表 2, 図 6, 7)。なお、400  $\mu$ g/mL の一方のプレートの標本において、プレート 1 枚あたり 50 個以上の分裂中期細胞が得られなかったため、集計から除外した (表 2)。

いずれの処理条件においても、50  $\mu$ g/mL 以上の被験物質処理群において、被験物質処理終了時に、培養液中に浮遊および沈殿する被験物質が認められた。

陰性対照群における染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は 5% 未満であった (表 1, 2, 図 4~7)。また、陽性対照群における染色体構造異常を持つ細胞の出現頻

度は10%以上であった(表1, 2)。

## 考察および結論

窒化ケイ素の染色体異常誘発性を検討するため、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

その結果、短時間処理法および連続処理法のいずれの被験物質処理群においても、染色体構造異常または数的異常を持つ細胞の出現頻度は5%未満であった。

一方、陰性対照および陽性対照群では染色体異常細胞の出現頻度は期待通りの値を示し、本試験が技術的に成立していることが示された。

従って、窒化ケイ素は、本試験条件下においてCHL/TU細胞に対する染色体異常誘発性を有しないと結論した。

なお、本物質の類似化合物の変異原性に関する情報を添付資料1にまとめた。

## 参考文献

1. 日本製薬工業協会 医薬品評価委員会 基礎研究部会 第3分科会 遺伝毒性ワーキンググループ編「医薬品のための遺伝毒性試験 Q&A」サイエンティスト社, 東京, 2000

表 1 染色体異常試験の結果(短時間処理法)[本試験2]

被験物質の名称 窒化ケイ素

処理・回復 時間(h)	S9 mix	被験物質の用量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常細胞数(出現頻度%)			
			観察細胞数	染色体体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
6-18	-	陰性対照 (生食)	100	1	0	0	0	0	1	0	112	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	1	0	88	100	0	0	0
			200	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	2 ( 1.0 )	0	100	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	-	12.5 P	100	0	0	0	0	0	0	1	107	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	1	105	100	0	0	0
			200	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	2	106	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	-	25 P	100	0	0	0	0	0	0	0	94	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	112	100	1	0	1
			200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0	103	200	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )
6-18	-	50 P	100	0	0	0	0	0	0	0	105	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	84	100	0	0	0
			200	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0	95	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	-	100 P	100	1	0	0	0	0	1	0	80	100	0	0	0
			100	1	0	0	0	0	1	0	74	100	0	0	0
			200	2 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	2 ( 1.0 )	0	77	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	-	200 P	100	0	0	0	0	0	0	0	23	100	0	0	0
			100	3	0	0	0	0	3	0	23	100	0	0	0
			200	3 ( 1.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	3 ( 1.5 )	0	23	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	-	400 P	100	0	0	0	0	0	0	0	15	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	23	100	0	0	0
			200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0	19	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	-	陽性対照 (MMC 0.1)	100	34	49	2	0	0	73	1	104	100	1	0	1
			100	27	38	0	0	0	53	0	96	100	0	0	0
			200	61 ( 30.5 )	87 ( 43.5 )	2 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	126 ( 63.0 )	1	100	200	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )
6-18	+	陰性対照 (生食)	100	0	0	0	0	0	0	0	57	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	72	100	0	0	0
			200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0	65	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	+	100 P	100	0	0	0	0	0	0	0	92	100	0	0	0
			100	0	0	1	0	0	1	0	69	100	0	0	0
			200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0	81	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	+	200 P	100	0	0	0	0	0	0	0	66	100	1	0	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	65	100	0	0	0
			200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0	65	200	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )
6-18	+	400 P	100	0	0	0	1	0	1	0	59	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	47	100	0	0	0
			200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0	53	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	+	800 P	100	0	0	0	0	0	0	0	32	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	33	100	0	0	0
			200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0	32	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	+	1600 P	100	0	1	0	0	0	1	0	22	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	23	100	0	0	0
			200	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0	22	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
6-18	+	2400 P	100	26	83	1	0	0	83	4	100	0	0	0	
			100	34	85	1	0	0	90	4	100	0	0	0	
			200	60 ( 30.0 )	168 ( 84.0 )	2 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	173 ( 86.5 )	8	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	
6-18	+	陽性対照 (BP 20)	100	26	83	1	0	0	83	4	100	0	0	0	
			100	34	85	1	0	0	90	4	100	0	0	0	
			200	60 ( 30.0 )	168 ( 84.0 )	2 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	173 ( 86.5 )	8	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	

生食:局方生理食塩液  
MMC:マイトマイシンC  
BP:ベンゾ[a]ピレン

P:被験物質処理(6時間処理)終了時,培養液中に沈殿または浮遊している被験物質が認められた。

表 2 染色体異常試験の結果(連続処理法)[本試験3]

被験物質の名称 窒化ケイ素

処理-回復 時間(h)	被験物質の用量 ( $\mu$ g/mL)	染色体構造異常細胞数(出現頻度%)							ギャップ の出現数	細胞増殖率 (%)	染色体数的異常の細胞数(出現頻度%)			
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	断片化	総異常細胞数(%)			観察細胞数	倍数体	核内倍加	総異常細胞数(%)
24-0	陰性対照 (生食)	100	4	0	0	1	0	5	1	103	100	0	0	0
		100	1	0	1	0	0	2	0	97	100	0	0	0
		200	5 ( 2.5 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	7 ( 3.5 )	1	100	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
24-0	50 P	100	0	1	0	0	0	1	0	117	100	0	0	0
		100	1	0	2	0	0	3	0	90	100	0	0	0
		200	1 ( 0.5 )	1 ( 0.5 )	2 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	4 ( 2.0 )	0	104	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
24-0	100 P	100	0	2	0	0	0	2	0	101	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	99	100	0	0	0
		200	1 ( 0.5 )	2 ( 1.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	3 ( 1.5 )	0	100	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
24-0	200 P	100	0	0	0	0	0	0	1	74	100	0	0	0
		100	0	1	0	0	0	1	0	88	100	0	0	0
		200	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	1	81	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
24-0	300 P	100	0	0	0	0	0	0	0	26	100	0	0	0
		100	1	0	0	0	0	1	0	37	100	0	0	0
		200	1 ( 0.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	1 ( 0.5 )	0	32	200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )
24-0	400 P	TOX								19	TOX			
		TOX								35	TOX			
		TOX								27	TOX			
24-0	500 P	TOX								15	TOX			
		TOX								22	TOX			
		TOX								18	TOX			
24-0	陽性対照 (MMC 0.03)	100	21	21	0	0	0	37	0	/	100	0	0	0
		100	23	8	3	0	0	31	1		100	0	0	0
		200	44 ( 22.0 )	29 ( 14.5 )	3 ( 1.5 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	68 ( 34.0 )	1		200	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )	0 ( 0.0 )

生食:局方生理食塩液

MMC:マイトマイシンC

TOX:細胞毒性のため、プレートあたり50個以上の分裂中期細胞が得られなかった。

P:被験物質処理終了時、培養液中に沈殿または浮遊している被験物質が認められた。

図1 窒化ケイ素の細胞毒性  
(短時間処理法・-S9 mix)

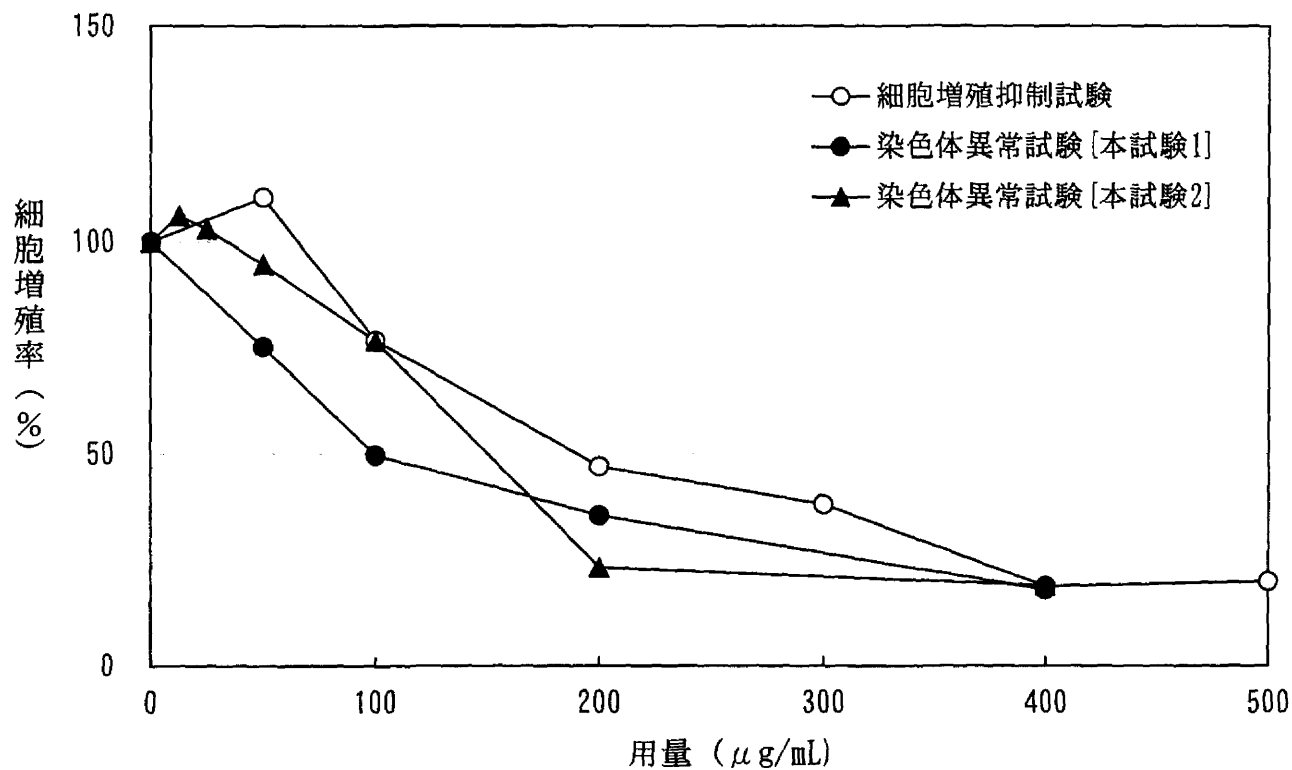


図2 窒化ケイ素の細胞毒性  
(短時間処理法・+S9 mix)

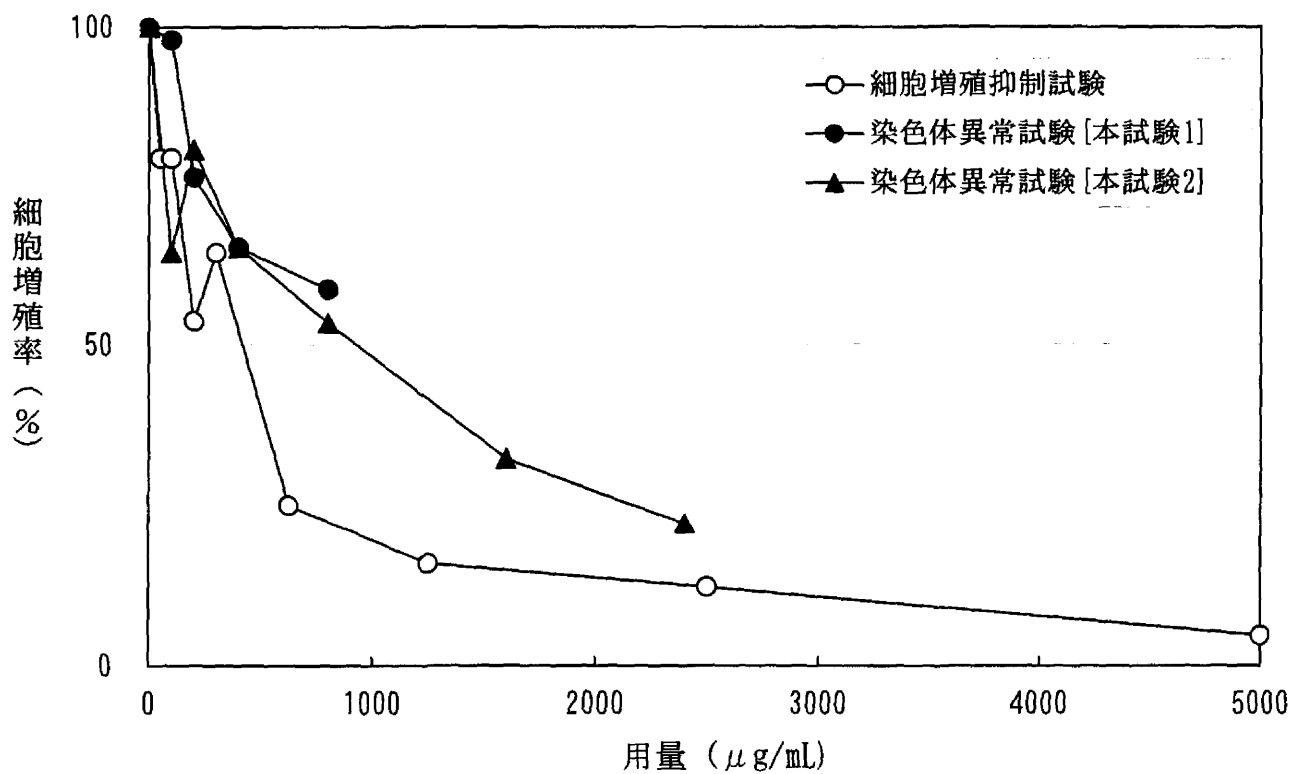


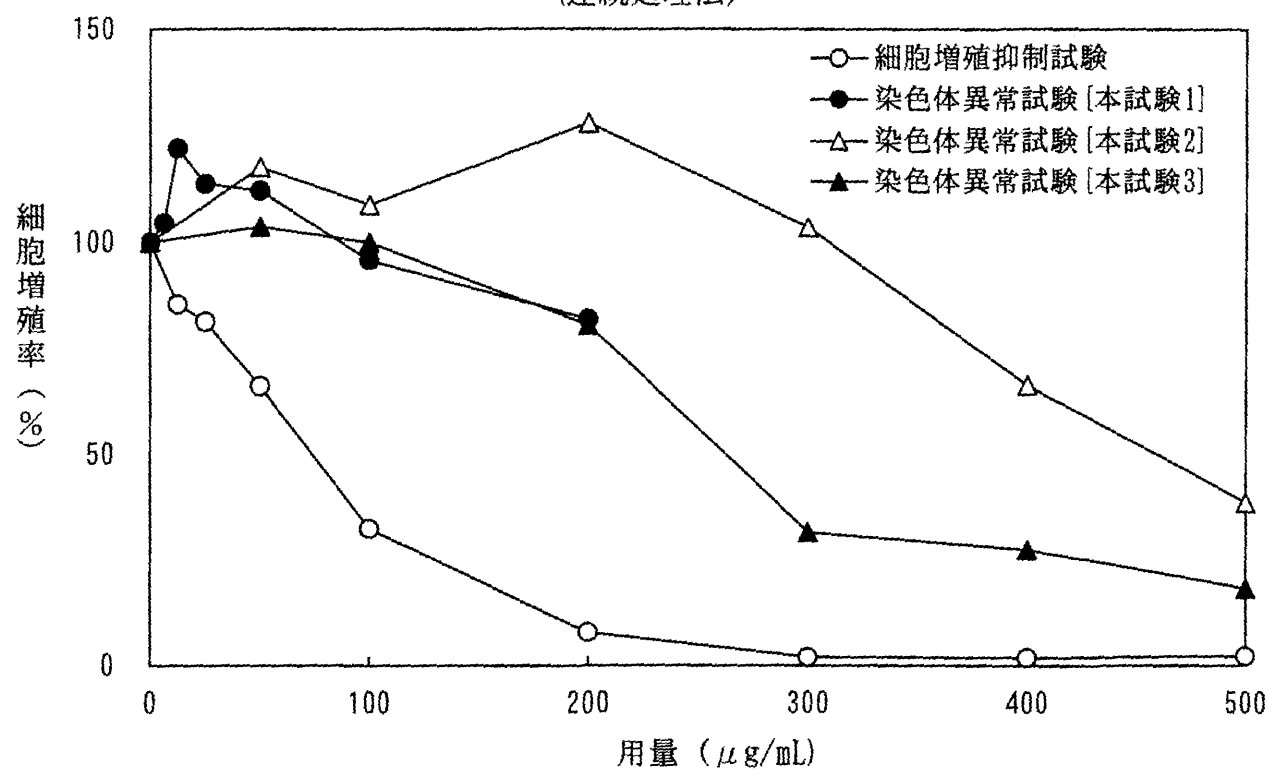
図3 窒化ケイ素の細胞毒性  
(連続処理法)



図4 窒化ケイ素の構造異常細胞出現頻度  
(短時間処理法)

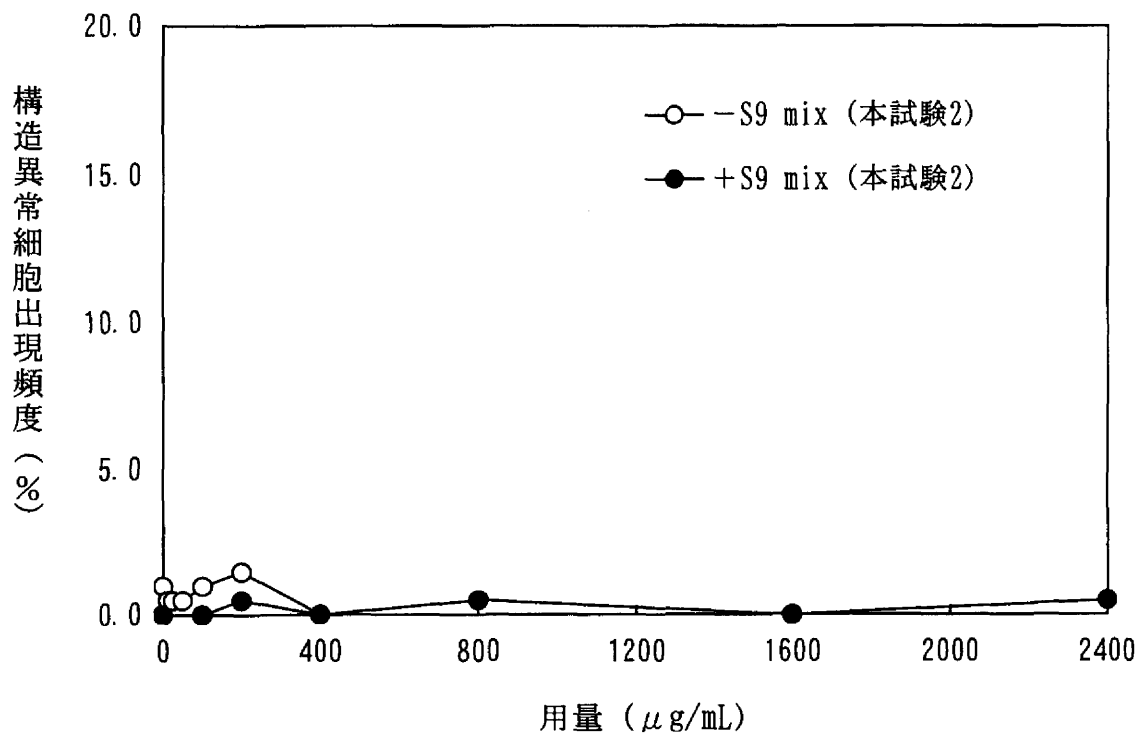


図5 窒化ケイ素の数的異常細胞出現頻度  
(短時間処理法)

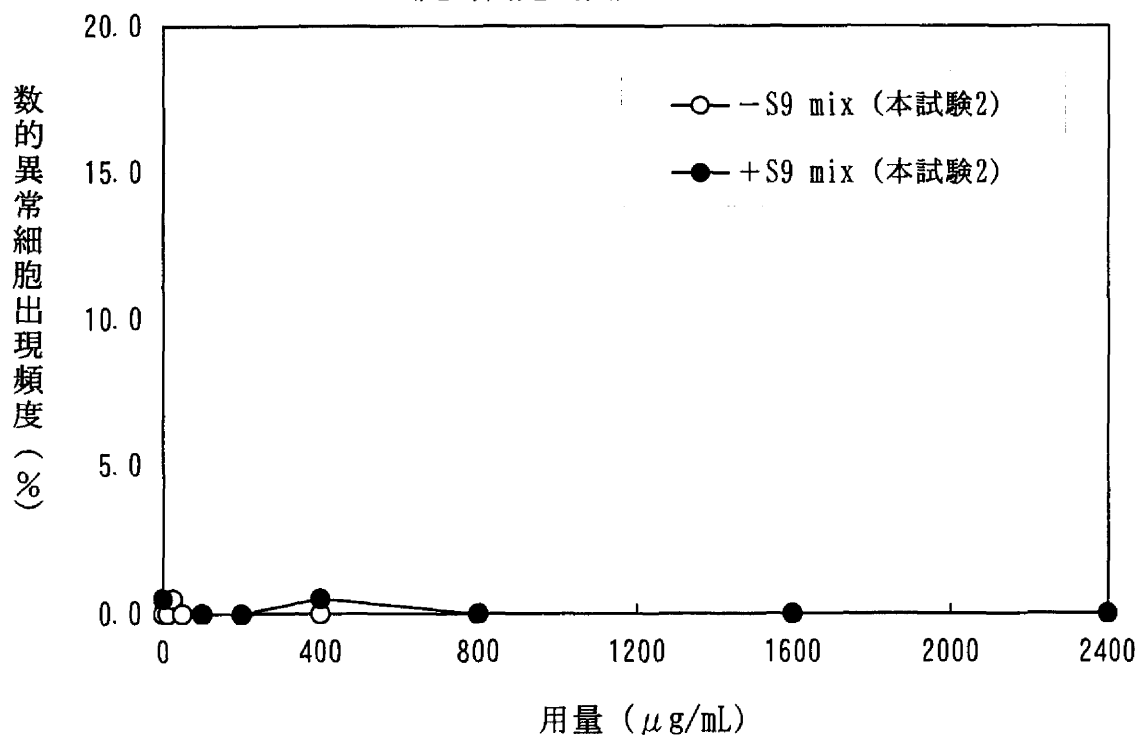
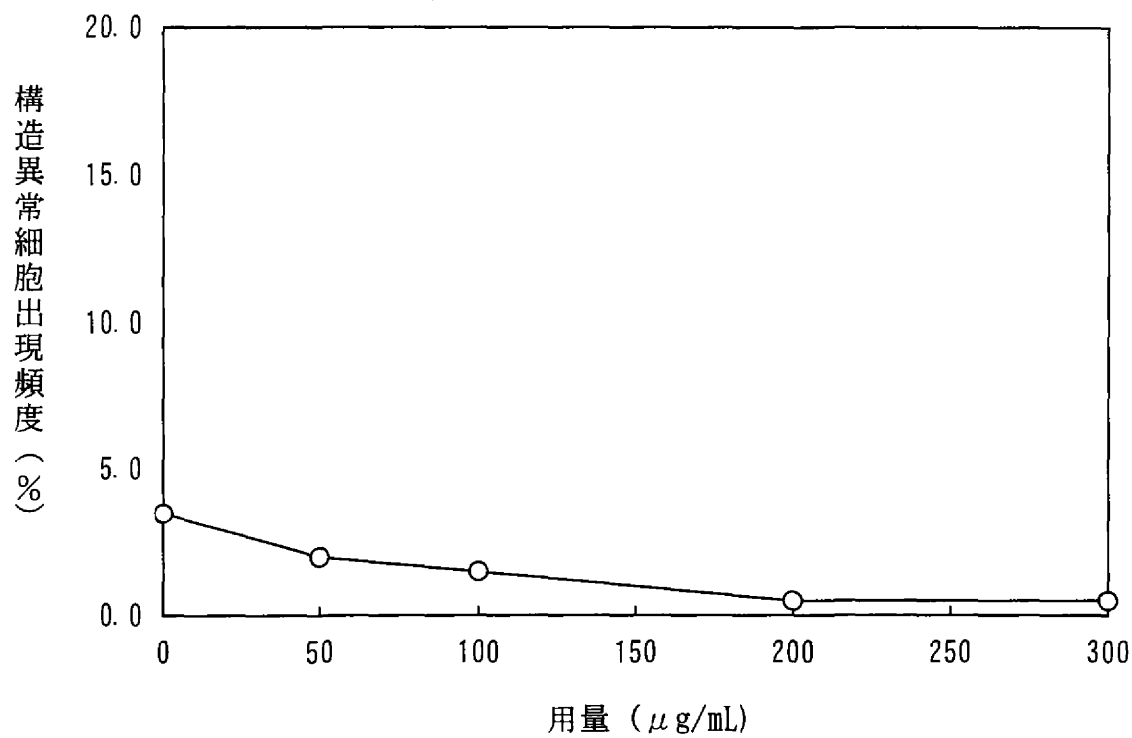


図6 窒化ケイ素の構造異常細胞出現頻度  
(連続処理法)図7 窒化ケイ素の数的異常細胞出現頻度  
(連続処理法)