

最終報告書

表 題： 一けい酸四ナトリウム n 水和物のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

試験番号：SR03189

株式会社 化合物安全性研究所

目次

表紙	1
目次	4
要約	8
緒言	9
材料および方法	9
成績	17
考察	19

Tables and Figure

Table 1	Effects of tetrasodium monosilicate n-hydrate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)	21
Figure 1	Effects of tetrasodium monosilicate n-hydrate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)	22
Table 2	Effects of tetrasodium monosilicate n-hydrate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test)	23
Table 3	Effects of tetrasodium monosilicate n-hydrate on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (chromosomal aberration test, retest)	24
Table 4	Effects of tetrasodium monosilicate n-hydrate on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (chromosomal aberration test, retest 2)	25
Table 5-1	Results of the chromosomal aberration test of tetrasodium monosilicate n-hydrate (6 hours treatment without metabolic activation)	26
Table 5-2	Results of the chromosomal aberration test of tetrasodium monosilicate n-hydrate (6 hours treatment with metabolic activation)	27
Table 5-3	Results of the chromosomal aberration test of tetrasodium monosilicate n-hydrate (24 hours treatment without metabolic activation)	28

要 約

一けい酸四ナトリウム n 水和物の *in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いて検討した。試験は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列で実施した。

予備試験 (細胞増殖抑制試験 : 7.42~1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の結果、各系列で 50% 以上の細胞増殖抑制が認められ、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の IC_{50} はそれぞれ 947、1290 および 1222 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

被験物質の析出は、予備試験および本試験ともに観察されなかった。

培養液 pH の上昇が、予備試験では処理開始時の 59.4 あるいは 119 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量および処理終了時の 1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で観察された。また、本試験では処理開始時の全ての用量および処理終了時の 1267 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量 (短時間処理法の代謝活性化によらない場合)、1583 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量 (短時間処理法の代謝活性化による場合) ならびに 1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量 (連続処理法の 24-0 h 処理による場合) で観察された。

本試験 (染色体異常試験) の結果、染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合 (713、950 および 1267 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、短時間処理法の代謝活性化による場合 (1267、1583 および 1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合 (357、475、594、713、831 および 950 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のいずれの用量においても 5% 未満であった。数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では、いずれの用量も 5% 未満であったが、連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 713 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で 7.9% と軽度の増加がみられた。しかし、公比 1.17 あるいは 1.20 と狭い用量間隔で設定した前後の用量で増加はみられず、用量との関連性がないことから結果は陰性と判断した。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、一けい酸四ナトリウム n 水和物は本試験条件においてほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

緒言

一けい酸四ナトリウム n 水和物の *in vitro* における染色体異常誘発性を検討する目的で、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いる染色体異常試験を実施した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は一けい酸四ナトリウム n 水和物であり、CAS 番号は 13472-30-5、分子式は $2\text{Na}_2\text{O} \cdot \text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ である。当該試験では、より提供された純度が $\text{Na}_2\text{O} + \text{SiO}_2$ として 90.4% (Na_2O 59.7%、 SiO_2 30.7%、M.R 0.53%) のロット番号 を使用した。

被験物質は pH が 13 前後 (2% 溶液、20°C)、密度が約 1.0 g/mL (見かけ比重) 等の物理化学的性状を示す白色無臭の固体である (Appendix 1-1 および 1-2)。被験物質は、受入後は冷暗所 (実測範囲 1~8°C)、密閉の条件で保存し、眼、皮膚および衣服にふれないように、適切な保護具を着用して取り扱った。なお、被験物質は実験期間中安定であったことが被験物質提供者において確認された (Appendix 2)。

2. 被験物質の調製

いずれの調製においても、被験物質を精秤後、日本薬局方注射用水 (ロット番号 4C78、株式会社大塚製薬工場) を用いて 21 mg/mL 調製液 (被験物質の分子量 184.0 の 10 mM 相当値を 1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、当該ロットの純度 90.4% による補正を加えた場合の調製濃度) を調製した。

予備試験では、21 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈した調製液、すなわち 10.5、5.25、2.63、1.31、0.656、0.328、0.164 および 0.0820 mg/mL を調製した。

本試験では、21 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈した調製液、すなわち 10.5、5.25、2.63 および 1.31 mg/mL を調製し、さらに、21 mg/mL 調製液から 17.5、14.0 および 7.88 mg/mL 調製液を調製した。

再試験では、21 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈した調製液、すなわち 10.5、5.25 および 2.63 mg/mL を調製し、さらに、21 mg/mL 調製液から 17.5、14.0、8.75 および 7.00 mg/mL 調製液を調製した。

再試験 2 では、21 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈した調製液、すなわち 10.5、5.25 および 2.63 mg/mL を調製し、さらに、21 mg/mL 調製液から 17.5、14.0、9.19、7.88、6.57、および 3.94 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、予備試験、本試験および2回の再試験ともに、被験物質調製時の目視確認において媒体の反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質溶液は用時に調製し、予備試験では調製後1.0時間以内に、本試験では調製後1.1時間以内に、再試験では0.5時間以内に、再試験2では0.8時間以内に使用した。

3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の媒体の日本薬局方注射用水(ロット番号4C78、株式会社大塚製薬工場)を使用した。陰性対照物質は、原液のまま使用した。

4. 陽性対照物質

代謝活性化によらない場合の陽性対照物質として、マイトマイシンC(ロット番号413ACF、協和醗酵工業株式会社)を使用した。マイトマイシンCは、購入後室温で保存し、日本薬局方生理食塩液(ロット番号2G74N、株式会社大塚製薬工場)を用いて5および10 µg/mLの濃度に調製した。購入したマイトマイシンCは、1瓶中に日局マイトマイシンCを2 mg(力価)含有しており、調製の際には1 mg(力価)を1 mgとして換算した。

代謝活性化法による場合の陽性対照物質として、ベンゾ[a]ピレン(ロット番号KLM1182、和光純薬工業株式会社)を使用した。ベンゾ[a]ピレンは、購入後冷所(2~8℃)で保存し、ジメチルスルホキシド(ロット番号PW186、株式会社同仁化学研究所)を用いて1 mg/mLの濃度に調製した。なお、購入したベンゾ[a]ピレンの含量は101.0%であった(和光純薬工業株式会社 検査成績書)。

陽性対照物質の各調製液は-20℃以下で分注凍結保存し、調製後8カ月以内に試験に使用した(使用期限は調製後1年)。保存調製液は解凍後0.7時間以内に使用し、それぞれプレート内の液に対し1 vol%の割合で添加した。

5. 試験系

試験系として、1999年2月2日に大日本製薬株式会社より継代数14で入手したCHL/IUを使用した。CHL/IUは、雌性の新生チャイニーズハムスターの肺に由来し、染色体数(モード)は25本(2n=22)、倍化時間の測定値は13.2時間である。本細胞は、増殖速度、継代における染色体の安定性、染色体標本の観察の容易さおよび既知の変異原物質に対する感受性を考慮して選択した。

細胞の保存に際しては、10 vol%ジメチルスルホキシドを含む培地を用いて 1×10^6 cells/mL細胞浮遊液を調製し、1 mLずつアンプルに分注したものを漸次冷却して凍結させた後、液体窒素内に収納した。解凍後は、75 cm²培養フラスコを用いて5.0%CO₂、37.0℃に設定したCO₂インキュベーター(MCO-175、三洋電機株式会社)で培養し、3または4日毎に継代を行った。使用した細胞の継代数は、いずれの試験とも19であった。

6. 培地

イーグル MEM 培地 (Code 05902、ロット番号 508402 および 50841009、日水製薬株式会社) 9.4 g を日本薬局方注射用水 (ロット番号 4C78、4D74 および 4K77、株式会社大塚製薬工場) に溶解し、さらにフェノールレッド (ロット番号 PKF3307、和光純薬工業株式会社) 6 mg を加え、全量を 1L とした。オートクレーブ滅菌後、室温まで冷却し、滅菌済みの炭酸水素ナトリウム溶液 (炭酸水素ナトリウム: ロット 501F1411、関東化学株式会社) で pH7.2~7.4 に調整し、ろ過除菌した L-グルタミン溶液 (L-グルタミン: ロット番号 KLN3911、和光純薬工業株式会社) を 0.292 g/L となるように添加した。さらに牛胎児血清 (ロット番号 1195887、GIBCO) を最終調製量の 10% になるように加えた。牛胎児血清は、56°C で 30 分間非働化した後に使用した。

7. S9 mix

S9 mix はキッコーマン株式会社より購入し (ロット番号 CAM-508、2004 年 8 月 26 日製造)、-80°C 以下で凍結保存したものを、製造日より 3 カ月以内 (使用期限: 製造後 6 カ月) に使用した。

S9 mix は、フェノバルビタールおよび 5,6-ベンゾフラボンの腹腔内投与で酵素誘導した Slc:SD 系ラット (雄、7 週齢) の肝ホモジネートより調製した S9 1.05 mL に、コファクターミックス 2.45 mL を加え、次表の組成に調製されている。

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	(キッコーマン株式会社製 RAA-508、S9 中蛋白含量 27.24 mg/mL、S9 蛋白の培地中での最終濃度は 1.36 mg/mL)	0.3 mL
MgCl ₂	(和光純薬工業株式会社 PTN2433)	5 μmol / 0.1 mL
KCl	(和光純薬工業株式会社 WAK2693)	33 μmol / 0.1 mL
G-6-P	(オリエンタル酵母工業株式会社 115403)	5 μmol / 0.1 mL
NADP	(オリエンタル酵母工業株式会社 045405)	4 μmol / 0.1 mL
HEPES 緩衝液	(株式会社同仁化学研究所 FX115)	4 μmol / 0.2 mL
蒸留水		0.1 mL

8. 試験方法

(1) 予備試験

1) 試験群

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 3 系列について実施した。

被験物質の最高用量は、10 mM相当値の1900 µg/mLとし、以下公比2で低下させた計9用量(1900、950、475、238、119、59.4、29.7、14.8 および7.42 µg/mL)の試験群を設定した。更に、試験系列毎に陰性対照群を設定した。

各群につき2枚のプレートを使用し、各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

直径60 mmの培養プレートに、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の24-0 h処理による場合では 0.4×10^4 cells/mL、短時間処理法の代謝活性化による場合では 0.6×10^4 cells/mLの細胞浮遊液をそれぞれ5 mLずつ播種し、5.0%CO₂、37.0°Cに設定したCO₂インキュベーターで培養した。

3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、培養液2.7 mLに対して試験液を300 µLの割合で試験チューブ内で混合し、その混合液3 mLをプレートに添加し6時間培養した。6時間経過後に、プレート内の液を除去してCa²⁺およびMg²⁺フリーのDulbeccoのリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地5 mLを加えて更に18時間培養した。

4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、S9 mix 0.5 mLおよび培養液2.2 mLの混和液に対し試験液を300 µLの割合で試験チューブ内で混合し(S9の最終濃度約5 vol%)、その混合液3 mLをプレートに添加し6時間培養した。6時間経過後に、プレート内の液を除去してCa²⁺およびMg²⁺フリーのDulbeccoのリン酸緩衝液で細胞を洗い、新鮮な培地5 mLを加えて更に18時間培養した。

5) 連続処理法の24-0 h処理による場合

細胞播種後3日目に、プレートの培養液を除去し、培養液4.5 mLに対して試験液を500 µLの割合で試験チューブ内で混合し、その混合液5 mLをプレートに添加した。更に、24時間培養した。

6) 被験物質の析出の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質の析出の有無を目視確認した。

7) 被験物質による培養液pHへの影響の有無の確認

試験液による処理の開始時と終了時に、被験物質による培養液色の変化の有無を目視確認した。培養液色に変化が認められない場合には、被験物質による培養液pHへの影響は無いものと判断し、培養液色の変化が認められた場合には、pH試験紙(東洋濾紙株式会社)で培養液のpHを確認した。

8) 細胞増殖率の測定および50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)の算出

培養終了後、プレート内の液を除去してCa²⁺およびMg²⁺フリーのDulbeccoのリン酸緩衝液で細胞を洗い、10%ホルマリンで約10~15分間固定した後、0.1w/v%クリスタルバイオレットで約10~15分間の染色を行った。染色後、水道水を入れた水槽内でプレートを洗浄して風乾させた。対照群のプレートを100%として、各プレートの細胞増殖率を単層培養細胞密度測定装置(MONOCELLATER II、東洋測器株式会社)で測定した。細胞増殖率が50%以下まで低下した場合には、用量を対数化した回帰計算により50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)を算出した。

(2) 本試験

1) 試験群

予備試験の結果、各系列で50%以上の細胞増殖抑制がみられたことから、各系列ともIC₅₀値より高用量を最高用量とし、1900 μg/mLより公比2で低下させた系列の用量あるいはそれらの用量間を2分割あるいは3分割する用量の計6試験群を設定した。

本試験の結果、連続処理法の24-0h処理による場合には、細胞増殖率が50%以上の用量においても分裂中期細胞が少なく評価可能な3用量を得ることができなかったことから、用量間隔を狭めた8試験群による再試験を実施した。

再試験の結果、2相性の細胞増殖抑制がみられ、再び評価可能な3用量を得ることができなかったことから、用量間隔をさらに狭めた10試験群による再試験2を実施した。

陽性対照群を除く各群にはサテライト群2枚を加えた4枚のプレートを使用し、陽性対照群では2枚のプレートを使用した。各プレートには識別番号を明記した。

2) 細胞の播種

8. 試験方法、(1)予備試験、2)細胞の播種と同様の方法で実施した。

3) 短時間処理法の代謝活性化によらない場合

8. 試験方法、(1)予備試験、3)短時間処理法の代謝活性化によらない場合と同様の方法で実施した。

4) 短時間処理法の代謝活性化による場合

8. 試験方法、(1)予備試験、4)短時間処理法の代謝活性化による場合と同様の方法で実施した。

5) 連続処理法の24-0h処理による場合

8. 試験方法、(1)予備試験、5)連続処理法の24-0h処理による場合と同様の方法で実施した。

6) 被験物質の析出の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、6)被験物質の析出の有無の確認と同様の方法で実施した。

7) 被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認

8. 試験方法、(1)予備試験、7)被験物質による培養液 pH への影響の有無の確認と同様の方法で実施した。

8) 細胞増殖率の測定

8. 試験方法、(1)予備試験、8)細胞増殖率の測定および 50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)の算出と同様の方法で実施した。IC₅₀は算出しなかった。

9) 染色体標本の作製

培養終了の約 2 時間前に、各プレートに最終濃度 0.2 µg/mL のコルセミド(ロット番号 1176571、1187876 および 1238727、GIBCO)を加えた。培養終了時間に、プレート内の液をそれぞれ遠沈管に回収し、各プレートを 0.02%EDTA(ロット番号 1118913、GIBCO)-0.25%トリプシン(ロット番号 1185824 および 1209484、GIBCO)で処理して細胞を剥離させ、得られた細胞浮遊液を上上の遠沈管に回収して約 1000 rpm で約 5 分間遠心分離した。上清を除去し、0.075 mol/L 塩化カリウム (ロット番号 403F1156、関東化学株式会社)を加え、穏やかにピペッティングを繰り返しながら常温で約 30 分間放置し細胞を膨満化させた。氷冷したカルノア固定液(メタノール：酢酸=3：1、メタノール：ロット番号 509C1008 および 603C1051、関東化学株式会社、酢酸：ロット番号 ASE7431、和光純薬工業株式会社)を用いて細胞を固定した後、1000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を除去し、新しいカルノア固定液を加えた。細胞の固定操作を 3 回繰り返した後、細胞浮遊液をスライドグラス上に滴下し、一夜以上自然乾燥させた。各プレートより、1 枚(細胞毒性により得られた細胞数が少ない場合)あるいは 2 枚の染色体標本作製した。

各スライドは、2%ギムザ液(ギムザ液：ロット番号 PP867 および PH842、和光純薬工業株式会社、インスタント磷酸緩衝液：ロット番号 L326 および L430、株式会社三菱化学ヤトロン)で 20 分間染色し、水洗および風乾の後、封入剤(マリノール、ロット番号 0301119、武藤化学薬品株式会社)で封入した。

10) 染色体標本の観察

標本観察の前に各用量の各プレートにつき 1 枚あるいは 2 枚(分裂中期像が少ない場合)の標本を選択してブラインド化した。

観察用量として、短時間処理法の代謝活性化によらない場合では本試験の 713、950 および 1267 µg/mL の用量を、短時間処理法の代謝活性化による場合では本試験の 1267、1583 および 1900 µg/mL の用量を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合では再試験 2 の 357、475、594、713、831 および 950 µg/mL の用量を選択した。

総合倍率 1000 倍の顕微鏡(BX51TF、オリンパス光学工業株式会社)で、1 枚あたり 100 個の分裂中期像を選択して観察し、次頁の分類に従って染色体異常の判定を行った。なお、1 枚の

分裂中期像が 100 個に満たない標本では、観察可能な数を観察した。構造異常については 25 ± 2 本の染色体をもつものを観察対象とした。

①構造異常(structural aberration)

・染色分体切断(ctb: chromatid break)

染色分体のはっきりした不連続部分(切断部分)で、不連続部分が染色分体の幅以上である場合、あるいは切断片が染色分体の長軸線上から外れている場合に染色分体切断として判定した。

・染色分体交換(cte: chromatid exchange)

染色分体の2ヵ所以上の切断部位が相互に交換(結合反応)しているものを染色分体交換として判定した。

・染色体切断(csb: chromosome break)

両方の染色分体の同じ位置に切断が生じている場合に、染色体切断として判定した。切断の判定基準は、染色分体切断に準じた。

・染色体交換(cse: chromosome exchange)

両方の染色分体の同じ位置で同じ方向に交換が生じている場合に、染色体交換として判定した。

・その他(others)

その他の構造異常として、断片化(fragmentation)がある。一つの分裂中期像のほとんど全ての染色体に切断やギャップが現れ、交換型の異常が含まれていない場合に断片化として判定した。

②ギャップ(gap)

染色分体あるいは染色体上に生じた非染色部分(染色性が全くみられない部分)で、非染色部分の幅が染色分体の幅より狭い場合にギャップとして判定した。

③数的異常(numerical aberration)

・倍数体(poly: polyploid)

染色体数(25 ± 2)が倍化し、三倍体、四倍体等になったものを倍数体として判定した。

・その他(others)

その他の数的異常として核内倍加がある。倍加した染色体が分離せずに平行に並んでいる場合に核内倍加(end: endoreduplication)と判定し、倍数体とは区別した。

11) 観察結果の集計方法

プレート毎に次頁の細胞出現数を求め、試験群毎にその合計値を算出した。更に、構造異常および数的異常の total については、それぞれ出現率(%)を求めた。出現率(%)は、観察した細胞数(分裂中期像の数)に対する出現数の百分率で算出した。

①構造異常について

- ・ ctb: 染色分体切断をもつ細胞数
- ・ cte: 染色分体交換をもつ細胞数
- ・ csb: 染色体切断をもつ細胞数
- ・ cse: 染色体交換をもつ細胞数
- ・ others: その他の構造異常をもつ細胞数
- ・ total: 何らかの構造異常をもつ細胞数

②ギャップについて

- ・ gap: ギャップをもつ細胞数

③数的異常について

- ・ poly: 倍数体の細胞数
- ・ others: その他の数的異常をもつ細胞数
- ・ total: 何らかの数的異常をもつ細胞数

9. 試験結果の評価

構造異常または数的異常の total の出現率(%)が10%以上増加し、その出現様式に用量依存性がみられる場合、あるいは5%以上増加する結果について確認試験により再現性がみられる場合を陽性、それ以外を陰性とし、統計学的手法は用いなかった。

D₂₀ 値(細胞の20%に異常が認められる濃度)については、連続処理法の24-0 h 処理による場合の1用量で数的異常に5%以上の出現がみられたものの、陰性と判断したことから算出はしなかった。

成績

1. 予備試験

細胞増殖率、被験物質による析出および培養液 pH への影響の結果を Table 1 に、細胞増殖率への影響の結果を Figure 1 に示す。

短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合の各系列において、950 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で細胞増殖抑制が認められた。各系列とも 50%以上の細胞増殖抑制がみられ、 IC_{50} はそれぞれ 947、1290 および 1222 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

被験物質の析出は観察されなかった。

培養液 pH の上昇が、処理開始時では各系列の 59.4 あるいは 119 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量で観察され、最高用量の培養液 pH は 13~14 の範囲であった。処理終了時では、各系列の 1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で pH の上昇が観察され、その培養液 pH はいずれも 7.8 であった。

2. 本試験

本試験、再試験および再試験 2 の細胞増殖率、被験物質による析出および培養液 pH への影響の結果を、それぞれ Table 2、3 および 4 に示す。染色体異常誘発性の評価結果を Table 5-1~5-3 に示す。

染色体異常誘発性と同時に評価したサテライト群の細胞増殖への影響の検討では、本試験、再試験および再試験 2 のいずれの系列においても 50%以上の細胞増殖抑制がみられた。連続処理法の 24-0 h 処理による場合の再試験では、細胞増殖率は 633 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で 50%未満となったがより高用量では上昇し、2 相性の細胞増殖抑制が認められた。再試験 2 においても、細胞増殖率は 713 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で 50%未満となったがより高用量では上昇し、2 相性の細胞増殖抑制が認められた。

染色体異常誘発性の評価用量における細胞増殖率の最も低い値は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 36.5% (本試験: 1267 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、短時間処理法の代謝活性化による場合が 34.0% (本試験: 1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 33.5% (再試験 2: 713 $\mu\text{g}/\text{mL}$) であった。

被験物質の析出は観察されなかった。

培養液 pH の上昇が、処理開始時では、本試験、再試験および再試験 2 の全ての用量で観察され、最高用量の培養液の pH は 12~14 の範囲であった。処理終了時では、培養液 pH の上昇が、

本試験の短時間処理法の代謝活性化によらない場合の 1267 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量、本試験の短時間処理法の代謝活性化による場合の 1583 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量、本試験、再試験および再試験 2 の連続処理法の 24-0 h 処理による場合の 1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で観察された。各系列の最高用量の培養液の pH は、7.4~7.6(短時間処理法の代謝活性化によらない場合および連続処理法の 24-0 h 処理による場合)あるいは 7.6~7.8(短時間処理法の代謝活性化による場合)であった。

染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合(713、950 および 1267 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、短時間処理法の代謝活性化による場合(1267、1583 および 1900 $\mu\text{g}/\text{mL}$)ならびに連続処理法の 24-0 h 処理による場合(357、475、594、713、831 および 950 $\mu\text{g}/\text{mL}$)のいずれの用量においても 5%未満であった。数的異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合では、いずれの用量も 5%未満であった。連続処理法の 24-0 h 処理による場合では、713 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量において 7.9%と軽度の増加が認められた。

陽性対照群の染色体の構造異常の出現率は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合が 42.0%、短時間処理法の代謝活性化による場合が 37.5%および連続処理法の 24-0 h 処理による場合が 45.0%であった。

考 察

一けい酸四ナトリウム n 水和物の *in vitro* における染色体異常誘発性を、チャイニーズハムスター肺由来細胞 (CHL/IU 細胞) を用いて検討した。

予備試験の結果、各系列で 50% を超える細胞増殖抑制が認められ、本試験では各系列とも IC₅₀ 値より高用量を最高用量とした試験群を設定した。本試験の結果、連続処理法の 24-0 h 処理による場合には、細胞増殖率が 50% 以上の用量においても分裂中期像が少なく評価可能な 3 用量を得ることができなかったことから、用量間隔を狭めた再試験を実施した。再試験では 2 相性の細胞増殖抑制がみられ、再び評価可能な 3 用量を得ることができず、用量間隔をさらに狭めた再試験 2 を実施した。従って、染色体異常誘発性は、短時間処理法の代謝活性化によらない場合および代謝活性化による場合には本試験の標本を、連続処理法の 24-0 h 処理による場合には再試験 2 の標本を使用し評価した。なお、各系列とも細胞増殖抑制が認められた用量の培養液の処理開始時の pH は全て 12 以上で、用量の増加に伴う pH の上昇が認められた。処理終了時では、各系列の最高用量の培養液の pH は、7.4~7.8 の範囲であり緩衝作用が認められた。

染色体異常誘発性は、各系列とも細胞増殖率が 50% 未満の用量を含む連続した 3 用量あるいは 6 用量で評価した。その結果、構造異常の出現率は各系列のいずれの用量においても 5% 未満で、用量に関連した増加もみられず、結果は陰性であった。数的異常の出現率は、連続処理法の 24-0 h 処理による場合において 713 µg/mL の用量で 7.9% と軽度の増加がみられた。しかし、公比が 1.17 あるいは 1.20 となる狭い用量間隔で設定した前後の用量では増加はみられず、用量との関連性がないことから結果は陰性と判断した。

陽性対照群における染色体の構造異常の出現率は各系列において明確な陽性値を示し、本試験系が適切な感受性を有していたことが確認された。

以上のことから、一けい酸四ナトリウム n 水和物は、本試験条件においてほ乳類の培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと判断した。

Table 1 Effects of tetrasodium monosilicate *n*-hydrate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (preliminary test)

Growth rate (% to the control)				
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 hr (Mean)	6-18 hr (Mean)	24-0 hr (Mean)
Control ^a	–	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Tetrasodium monosilicate <i>n</i> -hydrate	7.42	101 , 107 (104.0)	99 , 99 (99.0)	98 , 103 (100.5)
	14.8	99 , 102 (100.5)	93 , 95 (94.0)	98 , 98 (98.0)
	29.7	97 , 105 (101.0)	92 , 93 (92.5)	96 , 100 (98.0)
	59.4	101 ⁺ , 106 ⁺ (103.5)	92 , 94 (93.0)	101 ⁺ , 100 ⁺ (100.5)
	119	96 ⁺ , 98 ⁺ (97.0)	91 ⁺ , 92 ⁺ (91.5)	102 ⁺ , 101 ⁺ (101.5)
	238	93 ⁺ , 97 ⁺ (95.0)	90 ⁺ , 92 ⁺ (91.0)	94 ⁺ , 98 ⁺ (96.0)
	475	94 ⁺ , 96 ⁺ (95.0)	96 ⁺ , 95 ⁺ (95.5)	86 ⁺ , 87 ⁺ (86.5)
	950	39 ⁺ , 40 ⁺ (39.5)	77 ⁺ , 80 ⁺ (78.5)	73 ⁺ , 72 ⁺ (72.5)
	1900	17 [*] , 13 [*] (15.0)	13 [*] , 15 [*] (14.0)	11 [*] , 10 [*] (10.5)
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)		947	1290	1222

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

⁺ : Increase of pH in culture medium at just the treatment.

^{*} : Increase of pH in culture medium at just and the end of treatment.

Precipitation of test substance was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

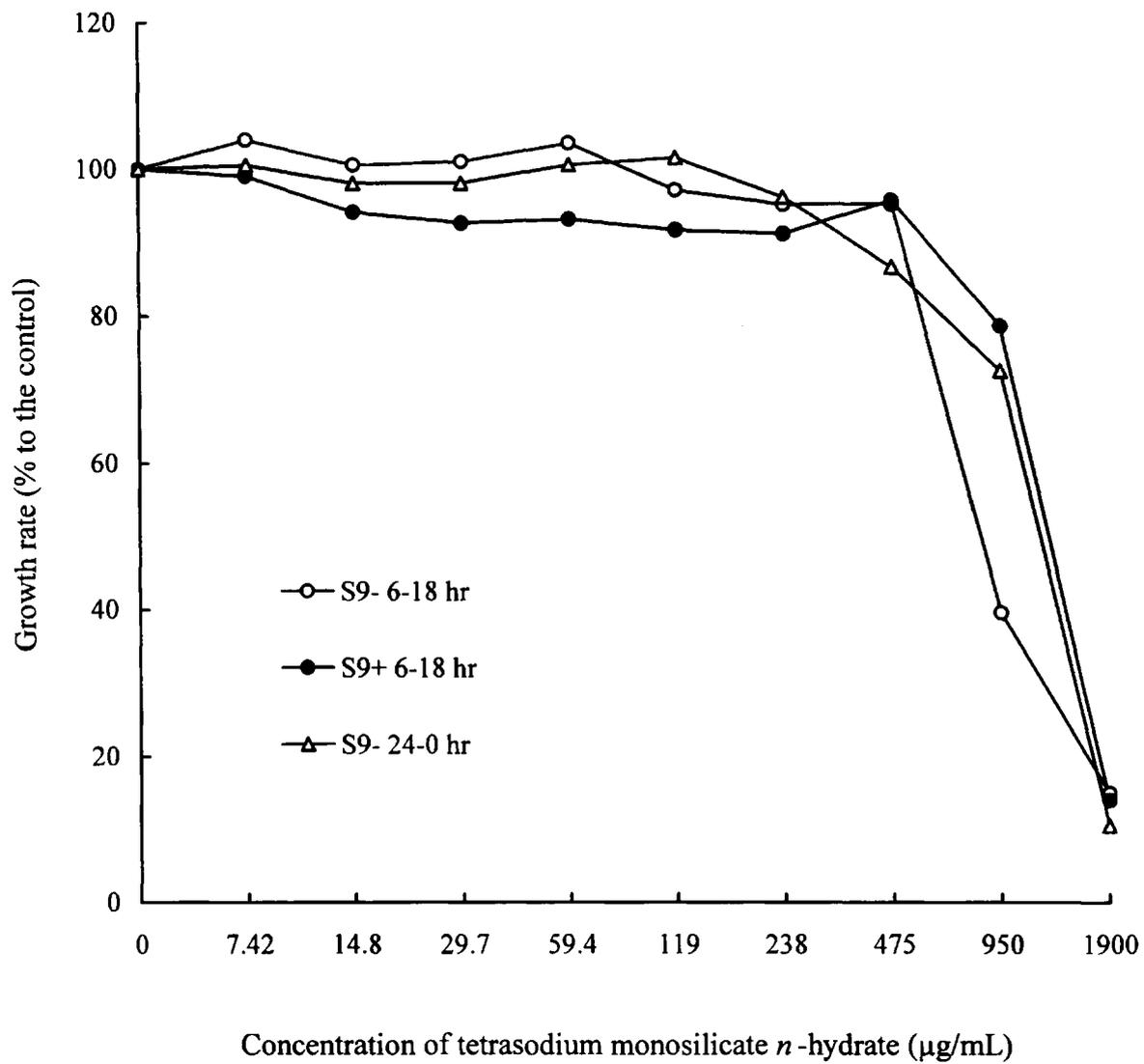


Figure 1 Effects of tetrasodium monosilicate *n*-hydrate on growth rate of CHL/TU with or without metabolic activation (preliminary test)

Each point represents mean value (n=2).

Table 2 Effects of tetrasodium monosilicate *n*-hydrate on growth rate of CHL/IU with or without metabolic activation (chromosomal aberration test)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-	S9+	S9-
		6-18 hr (Mean)	6-18 hr (Mean)	24-0 hr (Mean)
Control ^a	-	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)	100 , 100 (100.0)
Tetrasodium monosilicate <i>n</i> -hydrate	119	90 ⁺ , 90 ⁺ (90.0)	-	-
	238	98 ⁺ , 97 ⁺ (97.5)	103 ⁺ , 98 ⁺ (100.5)	90 ⁺ , 96 ⁺ (93.0)
	475	87 ⁺ , 91 ⁺ (89.0)	110 ⁺ , 112 ⁺ (111.0)	94 ⁺ , 96 ⁺ (95.0)
	713	82 ⁺ , 88 ⁺ (85.0)	-	-
	950	60 ⁺ , 59 ⁺ (59.5)	94 ⁺ , 92 ⁺ (93.0)	64 ⁺ , 60 ⁺ (62.0)
	1267	37 [*] , 36 [*] (36.5)	74 ⁺ , 71 ⁺ (72.5)	56 ⁺ , 56 ⁺ (56.0)
	1583	-	127 [*] , 126 [*] (126.5)	24 ⁺ , 19 ⁺ (21.5)
	1900	-	32 [*] , 36 [*] (34.0)	23 [*] , 22 [*] (22.5)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

⁺ : Increase of pH in culture medium at just the treatment.

^{*} : Increase of pH in culture medium at just and the end of treatment.

Precipitation of test substance was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

Table 3 Effects of tetrasodium monosilicate *n*-hydrate on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (chromosomal aberration test, retest)

Growth rate (% to the control)		
Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-
		24-0 hr (Mean)
Control ^a	—	100 ⁺ , 100 ⁺ (100.0)
Tetrasodium monosilicate <i>n</i> -hydrate	238	103 ⁺ , 96 ⁺ (99.5)
	475	70 ⁺ , 73 ⁺ (71.5)
	633	31 ⁺ , 29 ⁺ (30.0)
	792	53 ⁺ , 50 ⁺ (51.5)
	950	70 ⁺ , 64 ⁺ (67.0)
	1267	35 ⁺ , 34 ⁺ (34.5)
	1583	40 ⁺ , 42 ⁺ (41.0)
	1900	32 ⁺ , 27 ⁺ (29.5)

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

⁺ : Increase of pH in culture medium at just the treatment.

* : Increase of pH in culture medium at just and the end of treatment.

Precipitation of test substance was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

Table 4 Effects of tetrasodium monosilicate *n*-hydrate on growth rate of CHL/IU without metabolic activation (chromosomal aberration test, retest 2)

Growth rate (% to the control)

Group	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S9-
		24-0 hr (Mean)
Control ^a	—	100 ⁺ , 100 (100.0)
Tetrasodium monosilicate <i>n</i> -hydrate	238	94 ⁺ , 94 ⁺ (94.0)
	357	88 ⁺ , 86 ⁺ (87.0)
	475	77 ⁺ , 73 ⁺ (75.0)
	594	52 ⁺ , 49 ⁺ (50.5)
	713	34 ⁺ , 33 ⁺ (33.5)
	831	49 ⁺ , 55 ⁺ (52.0)
	950	67 ⁺ , 62 ⁺ (64.5)
	1267	59 ⁺ , 58 ⁺ (58.5)
	1583	33 ⁺ , 37 ⁺ (35.0)
1900	29 [*] , 28 [*] (28.5)	

a : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

⁺ : Increase of pH in culture medium at just the treatment.

^{*} : Increase of pH in culture medium at just and the end of treatment.

Precipitation of test substance was not observed.

The figure in parentheses represents mean value of two plates.

Table 5-1 Results of the chromosomal aberration test of tetrasodium monosilicate *n*-hydrate (6 hours treatment without metabolic activation)

Time schedule ^a (hours)	S9	Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c			
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)				
6-18	-	Control ^b	—	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)				
				Tetrasodium monosilicate <i>n</i> -hydrate	119	90.0	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			238		97.5	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			475		89.0	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			713		85.0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
						200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	1	1	0	1 (0.5)			
			950		59.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2		-
						100	1	0	0	0	0	1	0	7	0	7			
						200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	9	0	9 (4.5)			
			1267	36.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4	-		
					100	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3				
					200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	7	0	7 (3.5)				
	Mitomycin C	0.1		100	14	37	0	2	0	48	0	0	0	0	+				
				100	11	31	1	0	0	36	0	0	0	0					
				200	25	68	1	2	0	84 (42.0)	0	0	0	0 (0.0)					

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

Table 5-2 Results of the chromosomal aberration test of tetrasodium monosilicate *n*-hydrate (6 hours treatment with metabolic activation)

Time schedule ^a (hours)	S9	Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c				
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)					
6-18	+	Control ^b	—	100.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-			
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
					200	1	0	0	0	0	1 (0.5)	0	1	0	1 (0.5)					
		Tetrasodium monosilicate <i>n</i> -hydrate	10	/	238	100.5	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
					475	111.0	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
					950	93.0	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
					1267	72.5	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0		2
							100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
							200	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	2	0	2 (1.0)			
					1583	126.5	100	1	3	0	0	0	0	3	0	1	0	1		
							100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1			
							200	1	3	0	0	0	3 (1.5)	0	2	0	2 (1.0)			
		1900	34.0	100	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0					
				100	1	3	0	0	0	4	0	0	0	0						
				200	1	4	0	0	0	5 (2.5)	0	0	0	0 (0.0)						
Benzo[a]pyrene	10	/	100	10	30	0	0	0	36	0	0	1	1							
			100	9	35	1	0	0	39	0	0	0	0							
			200	19	65	1	0	0	75 (37.5)	0	0	1	1 (0.5)							

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water for injection (Japanese pharmacopocia)

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive

Table 5-3 Results of the chromosomal aberration test of tetrasodium monosilicate *n*-hydrate (24 hours treatment without metabolic activation)

Time schedule ^a (hours)	S9	Compound	Concentration (µg/mL)	Growth rate (%)	Number of metaphase observed	Structural aberrations						Gap	Numerical aberrations			Judgment ^c					
						ctb	cte	csb	cse	others	total (%)		poly	others	total (%)						
24-0	-	Control ^b	—	100.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-				
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
					200	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0		0 (0.0)			
		-	-	Tetrasodium monosilicate <i>n</i> -hydrate	-	238	94.0	Not observed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
						357	87.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0		0	
								100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
								200	1	0	0	0	0	0	1 (0.5)	0	0	0		0 (0.0)	
						475	75.0	100	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0		0	
								100	2	0	0	0	0	0	2	1	1	0		1	
						594	50.5	100	1	1	0	0	0	0	1	0	3	0		3	
								100	1	1	0	0	0	0	2	0	1	0		1	
						713	33.5	100	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0		2	
								27	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0		2	
						831	52.0	100	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0		2	
								89	2	0	0	0	0	0	2	0	4	0		4	
						950	64.5	100	3	0	0	0	0	0	3 (1.0)	0	8	0		8 (2.7)	
								84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
						1267	58.5	75	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0		2	
								75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	
						1583	35.0	96	2	0	1	0	0	0	2	0	2	0		2	
								330	2	1	1	0	0	0	3 (0.9)	0	4	0		4 (1.2)	
						1900	28.5	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	
								100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	
						Mitomycin C	0.05	100	13	38	0	0	0	0	49	0	0	0		0	
								100	12	32	0	0	0	0	41	0	1	0		1	
								200	25	70	0	0	0	0	90 (45.0)	0	1	0		1 (0.5)	+

ctb, chromatid break cte, chromatid exchange csb, chromosome break cse, chromosome exchange poly, polyploid

a : Time schedule ; treatment time-recovery time

b : Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

c : Judgment was made according to the total (%) of structural aberrations and numerical aberrations ; -, negative +, positive