試験番号 M-15-072

最終報告書

リグノスルホン酸のカルシウム塩の
細菌を用いる復帰突然変異試験

厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課　化学物質安全対策室　委託

試験施設

一般財団法人食品薬品安全センター　秦野研[redacted]

〒257-8523　神奈川県秦野市落合 729 番地の 5

TEL　0463-82-4751

試験委託者	厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課　化学物質安全対策室 (東京都千代田区霞が関 1-2-2)
試験番号	M-15-072
被験物質	リグノスルホン酸のカルシウム塩
試験項目	細菌を用いる復帰突然変異試験
試験開始日	2015 年 12 月 18 日
実験開始日	2016 年 1 月 5 日
実験終了日	2016 年 1 月 28 日
試験終了日	試験責任者の押印日
試資料保管場所	秦野研究所資料保存施設
保管期間	試験終了後 10 年間 その後の保管については試験委託者と協議する。
運営管理者	一般財団法人食品薬品安全センター　秦野研究所 所長 [redacted]

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知) に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知) を遵守して実施したものである。

2016 年 03 月 22 日

試験責任者 [redacted]

試験従事者

試験責任者	[redacted]
試験担当者	
検体調製	
試験操作	
被験物質管理	

目次

要約 5
試験目的 5
試験ガイドラインと GLP 5
材料と方法 6
1. 被験物質 6
2. 陽性対照物質 7
3. 検定菌 7
4. 試験材料 8
5. 被験物質調製液の調製 9
6. 試験操作 10
7. 結果の表示 11
8. 判定 12
予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと 12
試験成績と考察 12
1. 用量設定試験 12
2. 本試験 12
参考文献 13
表 14
図 17
資料 19
(最終ページ: 21 ページ)

信頼性保証書

要約

リグノスルホン酸のカルシウム塩の遺伝子突然変異誘発性の有無を調べるため、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、プレインキュベーション法により、S9 mix 非存在下および存在下で試験を行った。

5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 µg/plate の 7 用量を設定して用量設定試験を行ったところ、S9 mix 非存在下および存在下ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。

用量設定試験の結果に基づき、すべての検定菌について、313、625、1250、2500 および 5000 µg/plate の 5 用量を設定して、2 回の本試験（本試験 I および II）を行った。その結果、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果に基づき、リグノスルホン酸のカルシウム塩は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない（陰性）と判定した。

試験目的

生物学的安全性の情報を得るために、リグノスルホン酸のカルシウム塩の細菌を用いる復帰突然変異試験をプレインキュベーション法 [1] により実施し、リグノスルホン酸のカルシウム塩の遺伝子突然変異誘発性（変異原性）の有無を検討した。

試験ガイドラインと GLP

この試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 7 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 5 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331009 号環境省総合環境政策局長通知）に準拠し、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環保企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知）を遵守して実施した。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質の情報を、下記および資料 1、資料 2に示す。

1) 名称　リグノスルホン酸のカルシウム塩

2) 別名　リグニンスルホン酸カルシウム塩

3) 化学名（IUPAC 名）　カルシウム; 3-(2-ハイドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-[2-メトキシ-4-(3-スルフォネートプロピル)フェノキシ]プロパン-1-スルフォネート

4) 英名　Lignosulfonic acid calcium salt

5) 略称　LSCa

6) CAS 番号　8061-52-7

7) 分子式　$C_{20}H_{24}CaO_{10}S_2$を基本とする天然高分子

8) 分子量　重量平均分子量（Mw): ～18,000、数平均分子量（Mn): ～2,500

9) 物理化学的性質　性状: 暗い黄色の粉末

融点: 130°C

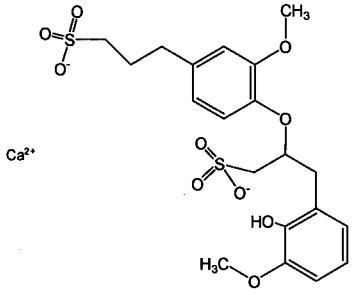
沸点: 購入元からのデータなし

1-オクタノール/水分配係数: 購入元からのデータなし

蒸気圧: 購入元からのデータなし

溶解性: 可溶(製品安全データシートより)

10) 構造式



11) ロット番号　MKBF9990V

12) 含量（主要元素分析値）炭素: 39.8%、硫黄: 4.0%、カルシウム（ICP): 約 5%

13) 不純物（既知物質）　還元糖: 約 16%、水分（カールフィッシャー法): 5.25%

本被験物質は、天然物由来であることから、Sigma-Aldrich で販売されている製品を 100%として試験を行った。

14) 安定性　当試験施設において、本被験物質を用いる各種毒性試験の実験開始前と終了後に性状の確認および赤外吸収スペクトルを測定し、色調や性状、スペクトルに変化がないことを確認した（試験番号: Q-15-004)。

15) 保管条件　冷蔵（1-15°C、実測値: 3～6°C)、密閉

16) 購入元　Sigma-Aldrich

2. 陽性対照物質

用いた陽性対照物質および調製法は以下のとおりである。

名称	略称	ロット番号（購入日）	製造者	純度
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド	AF-2	PDG6230 (2014 年 8 月 13 日)	和光純薬工業	100.1%
アジ化ナトリウム	SA	YSM7891 (2014 年 8 月 13 日)	和光純薬工業	100.3%
9-アミノアクリジン	9AA	BCBM9887V (2014 年 8 月 19 日)	Sigma-Aldrich	100.0%
ベンゾ[a]ピレン	B[a]P	I12Y023 (2014 年 5 月 27 日)	Alfa Aesar	97%
2-アミノアントラセン	2AA	TLH6618 (2014 年 8 月 13 日)	和光純薬工業	98.7%

AF-2、9AA、B[a]P および 2AA はジメチルスルホキシド（DMSO、ロット番号: KPG6099 および ECJ2132、和光純薬工業）に、SA は日局注射用水（製造番号: K3I73、大塚製薬工場）に溶解して所定の濃度に調製したものを、冷凍保存（設定温度: -20°C）して、調製後 6 か月以内に用時解凍して用いた。各陽性対照物質調製液の調製濃度および添加量を以下に示す。

	S9 mix 非存在下				S9 mix 存在下			
菌株	物質名	調製濃度 (μg/mL)	添加量 (μL/plate)	用量 (μg/plate)	物質名	調製濃度 (μg/mL)	添加量 (μL/plate)	用量 (μg/plate)
Salmonella typhimurium								
TA100	AF-2	0.1	100	0.01	B[a]P	50	100	5
TA1535	SA	5	100	0.5	2AA	100	20	2
TA98	AF-2	1	100	0.1	B[a]P	50	100	5
TA1537	9AA	800	100	80	B[a]P	50	100	5
Escherichia coli								
WP2 *uvrA*	AF-2	0.1	100	0.01	2AA	100	100	10

各検定菌に用いた陽性対照物質は、当試験施設で十分な蓄積データが得られている物質および用量とした。

3. 検定菌

「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、試験には、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）TA100、TA1535、TA98、TA1537 および大腸菌（*Escherichia coli*）WP2 *uvrA* を用いた。

S. typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 の 4 菌株は 1997 年 8 月 7 日に、*E. coli* WP2 *uvrA* 株は 1997 年 4 月 9 日に、いずれも日本バイオアッセイ研究センターの[redacted]より分与された。*S. typhimurium* の 4 菌株を用いる試験は、ヒスチジン要求性から非要求性への復帰突然変異 [2]、*E. coli*

WP2 *uvrA* 株を用いる試験は、トリプトファン要求性から非要求性への復帰突然変異[3]を指標とした遺伝子突然変異誘発性の検出系である。

検定菌は冷凍保存（設定温度: -80°C）したもの（凍結保存菌）を、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。凍結保存菌は、液体培地にて37°Cで静止期の初期まで培養した菌液0.8 mLに対し、滅菌 DMSO を 0.07 mL の割合で加えて混合したものをプラスチックチューブに分注し、急速凍結して調製したものであり、調製時に、アミノ酸要求性、UV 感受性、膜変異（*rfa*）、アンピシリン耐性因子 pKM101（プラスミド）の有無および陰性対照と陽性対照の変異コロニー数について調べ、特性が適正であることが確認されている。

4. 試験材料

1) 最少グルコース寒天平板培地

最少グルコース寒天平板培地（ロット番号: DZAGA601、2015 年 10 月 6 日製造、極東製薬工業）を購入して用いた。なお、培地 1 L あたりの組成は以下のとおりで、径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 mL を流して固めたものである。

硫酸マグネシウム・七水和物	0.2 g
クエン酸・一水和物	2 g
リン酸水素二カリウム	10 g
リン酸二水素アンモニウム	1.92 g
水酸化ナトリウム	0.66 g
グルコース	20 g
大洋寒天（ロット番号:BM-M5-260、SSK セールス）	15 g

2) トップアガー

①の水溶液をオートクレーブ滅菌後、フィルター滅菌した②または③を容量比 10:1 の割合で混合して用いた。

①	バクトアガー（Difco）	0.6 w/v%
	塩化ナトリウム	0.5 w/v%
②	*S. typhimurium* 用	
	L-ヒスチジン	0.5 mmol/L
	D-ビオチン	0.5 mmol/L
③	*E. coli* 用	
	L-トリプトファン	0.5 mmol/L

3) S9 mix の組成および調製

S9 mix 1 mL あたりの組成は以下のとおりで、用時氷冷下で混合して調製した。

成分	S9 mix 1 mL 中の量	濃度
S9*1	0.1 mL	10 vol%
0.2 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 mL	100 μmol/mL
補酵素溶液*2	0.38 mL	———
塩化カリウム	———	33 μmol/mL
グルコース-6-リン酸	———	5 μmol/mL
NADH	———	4 μmol/mL
NADPH	———	4 μmol/mL
0.4 mol/L 塩化マグネシウム溶液	0.02 mL	8 μmol/mL

NADH, Nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt
NADPH, Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetrasodium salt

*1, S9 (ロット番号: RAA201509A、2015 年 9 月 11 日製造、キッコーマンバイオケミファ) は、フェノバルビタール (PB) および 5,6-ベンゾフラボン (BF) を腹腔内投与 (1 日目 PB 30 mg/kg、2 日目 PB 60 mg/kg、3 日目 PB 60 mg/kg+BF 80 mg/kg、4 日目 PB 60 mg/kg) した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラット (体重: 184～243 g) の肝臓から調製したものを購入後、冷凍保存 (設定温度: -80°C) して、製造後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

*2, 補酵素溶液は、上記の成分を混合してフィルター滅菌したのち、冷凍保存 (設定温度: -80°C) し、調製後 6 か月以内に用時解凍して試験に用いた。

5. 被験物質調製液の調製

溶解性の予備検討の結果、被験物質は試験に必要な濃度で水、DMSO およびアセトンに不溶であるが、水中で均一性の良好な懸濁液となった。したがって、媒体には日局注射用水を用いた。

試験に際しては、秤量した被験物質を、THERMO MIXER を用いて日局注射用水 (製造番号: K5C00、製造元: 大塚製薬工場) に懸濁して最高濃度 (50.0 mg/mL) の被験物質調製液を調製し [調製量: (用量設定試験) 3.0 mL 以上、(本試験 I および II) 5.0 mL 以上]、以下同媒体で段階希釈した。被験物質調製液は用時調製し、媒体添加後 19 分以内 (室温: 23～24°C、用量設定試験)、24 分以内 (室温: 20°C、本試験 I) および 23 分以内 (室温: 22°C、本試験 II) に使用した。被験物質調製液は使用時、均一であることを確認した。被験物質調製液の調製濃度を以下に示す。

用量設定試験: 0.0500、0.150、0.500、1.50、5.00、15.0 および 50.0 mg/mL

本試験 I および II: 3.13、6.25、12.5、25.0 および 50.0 mg/mL

媒体中での被験物質の安定性については、当試験施設において室温、遮光下で保管した 0.02 mg/mL および 50 mg/mL の濃度の試験液について、調製後 4 時間の安定性が確認されている (試験番号: Q-15-004)。また、被験物質調製液 (原液) の調製時に目視により、発熱、発泡などの変化がないことを確認した。

含量試験については、「医薬品・化学物質 GLP 解説 (2002)、薬事日報社」に基づき実施しなかった。

6. 試験操作

1) 試験菌液の作製

ニュートリエントブロス No. 2（ロット番号: 941971、Oxoid）を 12 mL 入れた L 字型試験管（容積: 29 mL）に解凍した凍結保存菌 24 µL（TA100、TA1535、TA98、TA1537 および WP2 *uvrA*）をすみやかに接種し、4°C で保冷後、37°C で 10 時間、往復振とう培養したものを試験菌液とした。振とうには DOUBLE SHAKER NR-3（TAITEC）を用い、振幅は 25 mm、振とう回数は毎分 100 回とした。検定菌の増殖を確認するため、レシオビーム分光光度計（日立 U-1900 形、HITACHI）により、試験菌液の吸光度を 660 nm で測定した。また、段階希釈法により生菌数を求めた。660 nm の吸光度の測定値および生菌数を以下に示す。

試験の種類		検定菌				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	TA98	TA1537
用量設定試験	OD_{660}	1.823	1.871	1.921	1.888	1.830
	生菌数（$\times 10^9$ cells/mL）	2.75	2.94	4.54	2.51	1.26
本試験 I	OD_{660}	1.782	1.859	1.874	1.892	1.830
	生菌数（$\times 10^9$ cells/mL）	2.57	3.14	4.55	2.87	1.83
本試験 II	OD_{660}	1.825	1.859	1.897	1.917	1.829
	生菌数（$\times 10^9$ cells/mL）	2.44	3.04	4.38	2.85	1.52

各試験菌液の 660 nm の吸光度の測定値は、2014 年度の背景データ（当試験施設）の平均値の 90% 以上であった。また、各試験菌液の生菌数は 1×10^9 cells/mL 以上であった。

2) 試験法

Ames らの標準法[2]を参考にして、プレインキュベーション法[1]により、1 回の用量設定試験と 2 回の本試験を実施した。試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 非存在下、および哺乳動物（ラット）のもつ薬物代謝酵素によって産生される被験物質の代謝物の遺伝子突然変異誘発性を試験する S9 mix 存在下で行った。

小試験管中に、被験物質調製液 0.1 mL、S9 mix 非存在下では 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL、S9 mix 存在下では S9 mix 0.5 mL、試験菌液 0.1 mL を混合し、37°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガーを加えて混和し、最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。また、被験物質調製液のかわりに使用媒体 0.1 mL または陽性対照物質溶液を加えて、それぞれ陰性対照および陽性対照とした。

培養は 37°C で 48 時間行い、出現した変異コロニー数を、コロニーアナライザー（CA-11、システムサイエンス、面積補正有り）または目視により計測した。被験物質に由来する沈殿の有無は、目視により観

察した。また、生育阻害の有無については、目視あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌叢の状態から判断した。平板は各用量につき用量設定試験では 1 枚、本試験では 2 枚を使用し、陰性および陽性対照では、各試験とも 2 枚を使用した。陰性対照および陽性対照の変異コロニー数の平均値を、それぞれ陰性対照値および陽性対照値とした。

3) 試験用量

用量設定試験においては、「新規化学物質等に係る試験の方法について」に従い、5.00、15.0、50.0、150、500、1500 および 5000 μg/plate の 7 用量を設定した。

本試験 I および II においては、313、625、1250、2500 および 5000 μg/plate の 5 用量を設定した。

4) 無菌試験

小試験管中に、最高用量の被験物質調製液 0.1 mL と 0.1 mol/L ナトリウム-リン酸緩衝液（pH 7.4）0.5 mL、あるいは S9 mix 0.5 mL のみを入れ、37°C で 20 分間プレインキュベーションしたのち、2 mL のトップアガー(*S. typhimurium* 用）を加えて混合し、それぞれ最少グルコース寒天平板培地上に流して固めた。37°C で 48 時間培養後、雑菌の混入の有無を調べた。なお、用量設定試験および本試験 I における S9 mix の無菌試験については、同日に実施した他の試験と共通に用いた。

5) 識別法

平板側面に識別番号を記載した。S9 mix 非存在下は黒、S9 mix 存在下は赤の色で識別した。菌の識別は、TA100 は 0、TA1535 は 5、TA98 は 9、TA1537 は 7、WP2 *uvrA* は W とした。用量の識別は、菌の識別番号の右に用量の低いものから 1、2、3、・・・と記入した。陰性対照および陽性対照は、菌の識別番号の右に各々0 および P と記入して識別した。試験の識別は、試験番号のかわりに、菌の識別番号の左に 2（用量設定試験）あるいは 1（本試験 I および II）と記入した。生菌数測定における平板の識別は、菌の識別番号の左に VC と記入した。無菌試験における平板の識別は、被験物質については 2（用量設定試験）あるいは 1（本試験 I および II）のみを記入し、S9 mix については S9 と記入した。

6) 背景データによる管理

陰性対照値および陽性対照値が、当試験施設における背景データの変動範囲内（平均値±3×標準偏差）から外れた場合には、該当する検定菌について再度、同一用量を用いて試験を実施し、再試験のデータを採用することとした。なお、2014 年度に実施した各試験の陰性対照値および陽性対照値を背景データとした（資料 3)。

当該試験においては、再試験は実施しなかった。

7. 結果の表示

結果の表示は、各々の平板における変異コロニー数の実測値とその平均値（小数点以下第一位を四捨五入）を示し、用量－反応曲線の図を添付した。また、被験物質に由来する沈殿および生育阻害が認められた場合は、その旨表示することとした。

8. 判定

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌のS9 mix非存在下あるいはS9 mix存在下において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、陰性対照値の 2 倍以上に増加し、かつ、その増加に用量依存性あるいは再現性が認められた場合に、当該試験系において遺伝子突然変異誘発性を有する（陽性）と判定することとした。なお、結果の判定に統計学的手法は用いなかった。

予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験期間中に、「予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと」はなかった。

試験成績と考察

1. 用量設定試験

リグノスルホン酸のカルシウム塩について、5.00、15.0、50.0、150、500、1500および5000 µg/plateの7用量を設定して用量設定試験を行った（表 1)。その結果、S9 mix非存在下および存在下ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下においては500 µg/plate以上の用量で認められたが、S9 mix存在下においてはいずれの用量においても認められなかった。

以上の結果から、2 回の本試験（本試験 I および II）における最高用量を、すべての検定菌で5000 µg/plateとした。

2. 本試験

用量設定試験の結果に基づき、すべての検定菌について、313、625、1250、2500 および5000 µg/plateの5用量を設定して、本試験IおよびIIを行った（本試験I: 表 2および図 1、本試験II: 表 3および図 2)。2 回の本試験の結果、S9 mix 非存在下および存在下ともに、用いたいずれの検定菌においても生育阻害は認められなかった。被験物質に由来する沈殿は、S9 mix 非存在下においては625 µg/plate 以上の用量で認められたが、S9 mix 存在下においてはいずれの用量においても認められなかった。また、2 回の本試験ともに、用いたいずれの検定菌においても、S9 mix の有無にかかわらず、陰性対照値の2倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

すべての試験において、用いた最高用量の被験物質調製液および S9 mix への雑菌の混入は認められなかった。また、いずれの検定菌においても陽性対照物質の遺伝子突然変異誘発性が検出され、陽性対照値および陰性対照値は、ともに背景データの変動範囲内（平均値±3×標準偏差）であったこと

から、当該試験系の妥当性が確認された。

リグノスルホン酸のカルシウム塩については、当試験施設で実施したチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験（試験番号：G-15-026）で、陽性の結果が得られている。なお、当該被験物質の関連物質である Lignosulfonic acid, sodium salt に関しては、復帰突然変異試験で陰性の結果が報告されている [4)]。

以上の結果から、リグノスルホン酸のカルシウム塩は、用いた試験系において遺伝子突然変異誘発性を有しない（陰性）と判定した。

参考文献

1) Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, M.: Factors modulating mutagenicity in microbial tests. in "Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens" Norpoth, K. H., Garner, R. C. eds, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1980) pp. 273-285

2) Maron, D. M., Ames, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215 (1983)

3) Green, M. H. L.: Mutagen testing using Trp^+ reversion in *Escherichia coli*. in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C. eds, Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 161-187

4) Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., and Zeiger, E.: Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ. Mutagen 5 (suppl 1): 3-142 (1983)

表 1　リグノスルホン酸のカルシウム塩の細菌を用いる復帰突然変異試験（用量設定試験）

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/plate)	試験実施期間: 2016年1月5日より2016年1月8日 復帰変異数 (コロニー数/plate) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (−)	0 (陰性対照)	132 121 (127)	12 17 (15)	32 38 (35)	18 20 (19)	15 5 (10)
	5.00	132	10	25	25	11
	15.0	134	9	33	23	8
	50.0	129	9	37	27	9
	150	132	10	30	20	3
	500 †	148	14	37	10	8
	1500 †	137	10	23	16	7
	5000 †	144	12	38	16	14
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	133 136 (135)	11 13 (12)	36 37 (37)	31 23 (27)	16 12 (14)
	5.00	156	9	32	27	15
	15.0	118	9	24	15	15
	50.0	122	11	34	30	21
	150	150	9	27	25	14
	500	182	13	33	33	14
	1500	165	10	29	32	14
	5000	189	11	43	38	20
陽性対照 S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
	用量 (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/plate	570 531 (551)	562 585 (574)	123 123 (123)	495 561 (528)	542 422 (482)
陽性対照 S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/plate)	5	2	10	5	5
	コロニー数/plate	1241 1119 (1180)	340 349 (345)	478 500 (489)	368 362 (365)	153 156 (155)

( ) 内の数値はコロニー数の平均値を示す。
陰性対照, 日局注射用水
AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene
†, 沈殿が認められた。

表 2　リグノスルホン酸のカルシウム塩の細菌を用いる復帰突然変異試験（本試験 I）

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/plate)	試験実施期間: 2016年1月18日より2016年1月21日 復帰変異数 (コロニー数/plate) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	139 110 (125)	15 6 (11)	22 18 (20)	26 28 (27)	6 7 (7)
	313	154 164 (159)	14 8 (11)	24 17 (21)	22 28 (25)	6 6 (6)
	625 †	136 134 (135)	8 15 (12)	22 21 (22)	20 27 (24)	5 7 (6)
	1250 †	146 112 (129)	11 7 (9)	18 22 (20)	19 24 (22)	5 8 (7)
	2500 †	152 152 (152)	10 12 (11)	21 19 (20)	16 29 (23)	9 7 (8)
	5000 †	150 161 (156)	9 12 (11)	16 24 (20)	20 29 (25)	8 9 (9)
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	140 147 (144)	9 13 (11)	25 27 (26)	32 27 (30)	16 16 (16)
	313	148 142 (145)	8 12 (10)	20 21 (21)	34 40 (37)	14 15 (15)
	625	158 152 (155)	8 6 (7)	25 24 (25)	31 44 (38)	9 13 (11)
	1250	132 147 (140)	14 13 (14)	31 20 (26)	38 36 (37)	12 14 (13)
	2500	159 153 (156)	11 18 (15)	19 23 (21)	44 45 (45)	20 15 (18)
	5000	148 155 (152)	16 11 (14)	21 31 (26)	47 40 (44)	22 15 (19)
陽性対照 S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
	用量 (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/plate	505 464 (485)	552 559 (556)	122 114 (118)	613 562 (588)	718 439 (579)
陽性対照 S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/plate)	5	2	10	5	5
	コロニー数/plate	1165 1073 (1119)	378 356 (367)	310 370 (340)	424 355 (390)	145 165 (155)

( ) 内の数値はコロニー数の平均値を示す。

陰性対照, 日局注射用水

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

表 3　リグノスルホン酸のカルシウム塩の細菌を用いる復帰突然変異試験（本試験 II）

代謝活性化系の有無	被験物質用量 (μg/plate)	試験実施期間: 2016年1月25日より2016年1月28日 復帰変異数 (コロニー数/plate) 塩基対置換型 TA100	TA1535	WP2 *uvrA*	フレームシフト型 TA98	TA1537
S9 mix (-)	0 (陰性対照)	108 128 (118)	19 19 (19)	23 29 (26)	17 26 (22)	7 7 (7)
	313	160 138 (149)	8 8 (8)	27 23 (25)	13 25 (19)	9 7 (8)
	625 †	121 115 (118)	9 14 (12)	27 25 (26)	16 14 (15)	7 6 (7)
	1250 †	113 116 (115)	6 16 (11)	22 15 (19)	22 18 (20)	5 4 (5)
	2500 †	115 146 (131)	9 10 (10)	20 26 (23)	23 18 (21)	8 9 (9)
	5000 †	148 136 (142)	11 8 (10)	22 30 (26)	17 19 (18)	11 11 (11)
S9 mix (+)	0 (陰性対照)	146 158 (152)	14 13 (14)	24 27 (26)	27 30 (29)	13 16 (15)
	313	170 166 (168)	16 19 (18)	24 31 (28)	19 35 (27)	16 14 (15)
	625	144 173 (159)	16 17 (17)	31 25 (28)	37 33 (35)	9 8 (9)
	1250	168 182 (175)	12 19 (16)	17 29 (23)	35 35 (35)	12 14 (13)
	2500	169 174 (172)	11 21 (16)	21 27 (24)	40 43 (42)	10 15 (13)
	5000	153 168 (161)	15 12 (14)	27 37 (32)	37 36 (37)	18 16 (17)
陽性対照 S9 mixを必要としないもの	名称	AF-2	SA	AF-2	AF-2	9AA
	用量 (μg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	コロニー数/plate	555 559 (557)	612 556 (584)	135 150 (143)	566 552 (559)	520 740 (630)
陽性対照 S9 mixを必要とするもの	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 (μg/plate)	5	2	10	5	5
	コロニー数/plate	1133 1220 (1177)	345 385 (365)	365 355 (360)	437 376 (407)	161 156 (159)

( ) 内の数値はコロニー数の平均値を示す。

陰性対照, 日局注射用水

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; SA, Sodium azide; 9AA, 9-Aminoacridine; B[a]P, Benzo[a]pyrene; 2AA, 2-Aminoanthracene

†, 沈殿が認められた。

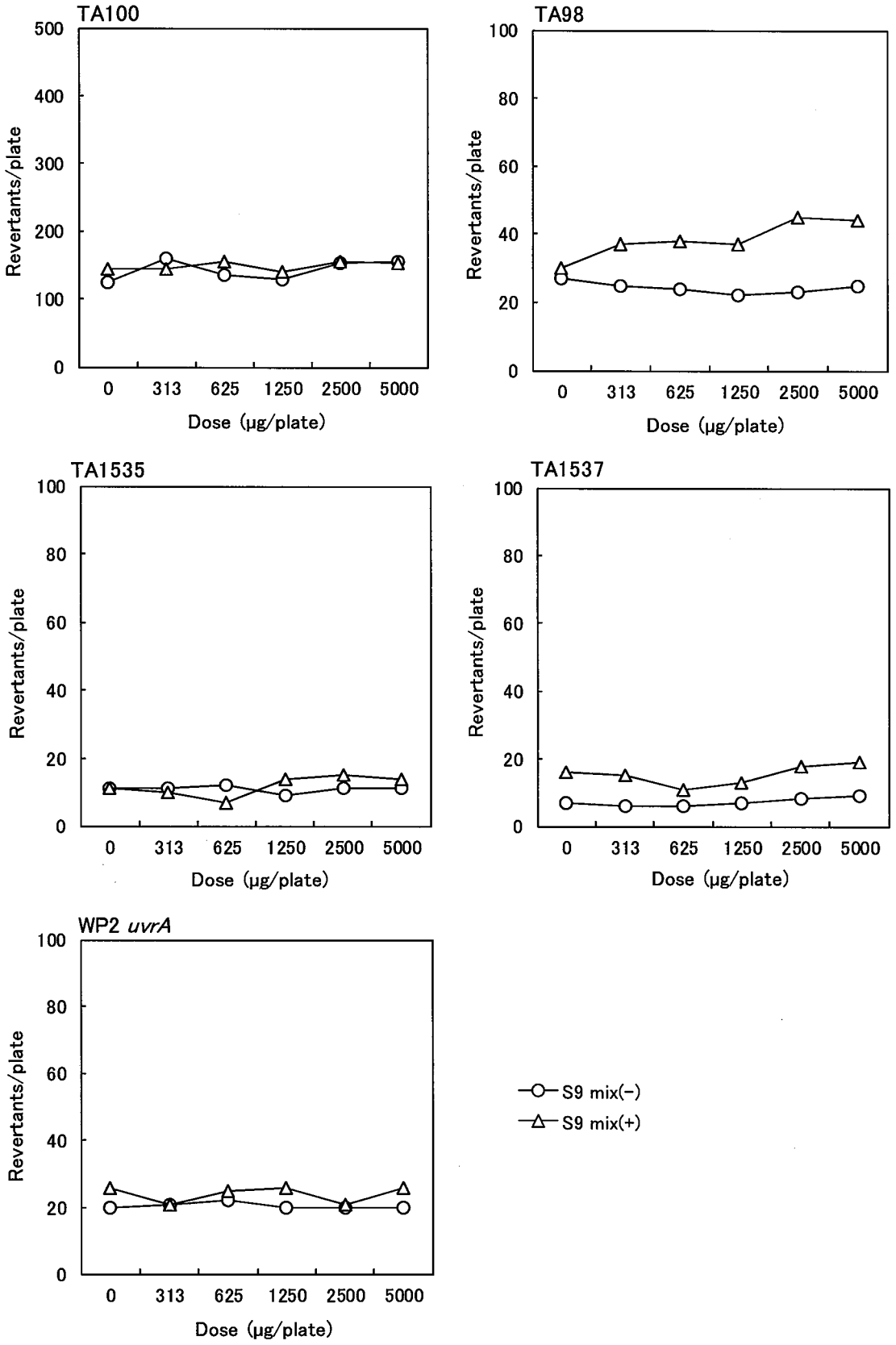


図 1　リグノスルホン酸のカルシウム塩の細菌を用いる復帰突然変異試験（本試験 I）

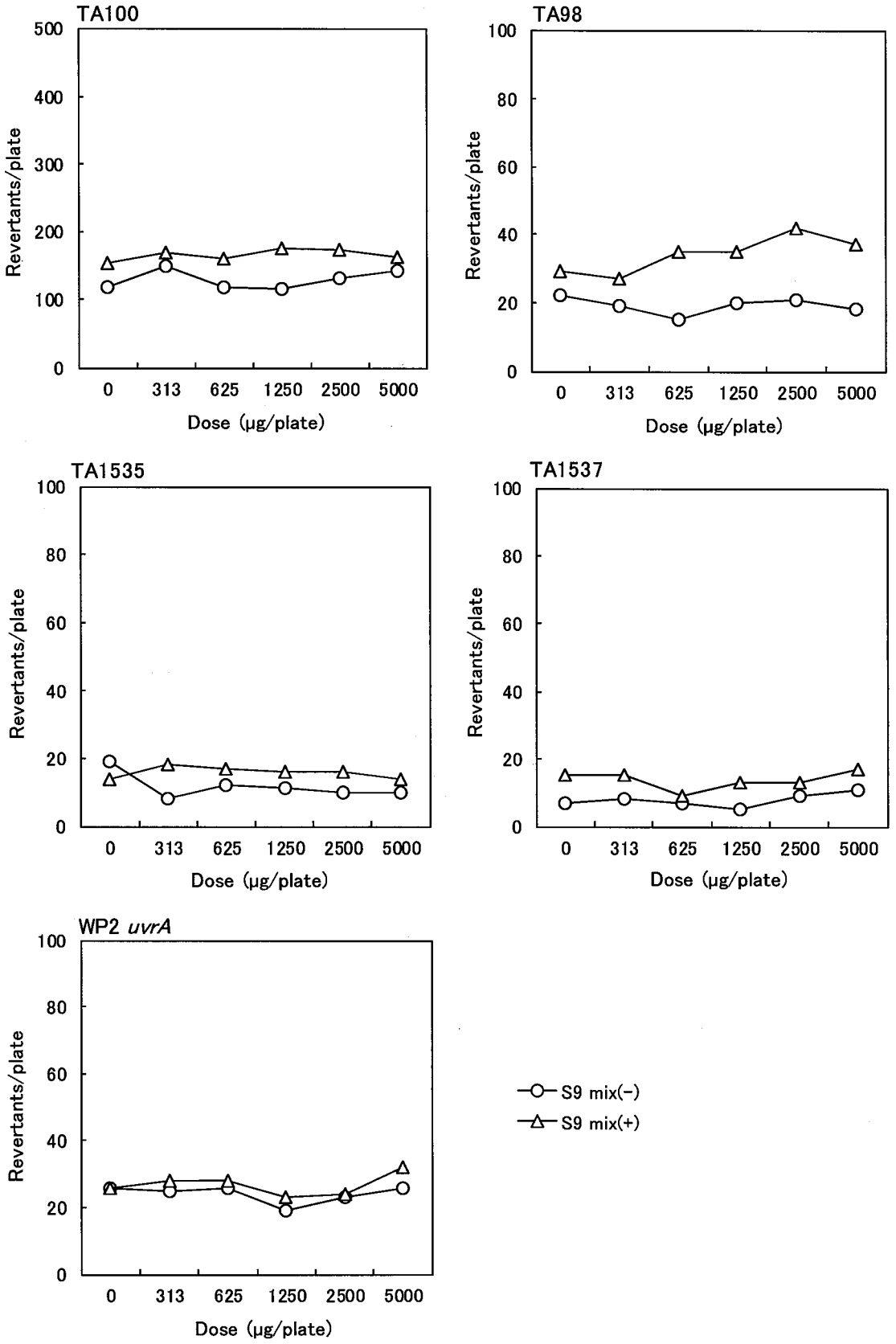


図 2　リグノスルホン酸のカルシウム塩の細菌を用いる復帰突然変異試験（本試験 II）

資料 1

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street,Saint Louis,MO 63103,USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Lignosulfonic acid calcium salt average M_w ~18,000, average M_n ~2,500

Product Number:	**471054**
Lot Number:	**MKBF9990V**
Brand:	ALDRICH
CAS Number:	8061-52-7
MDL Number:	MFCD00163202
Quality Release Date:	10 JAN 2011

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Dark Yellow to Very Dark Yellow and Orange to Very Dark Orange and Brown to Dark Brown and Yellow-Brown and Orange-Brown	Dark Yellow
Appearance (Form)	Powder	Powder
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Carbon Typically 38% - 42%		39.8 %
Sulfur (S) Typically 4% - 6%		4.0 %
Water (by Karl Fischer) Typically 2% - 8% H2O		5.25 %
ICP Major Analysis Confirms Calcium Component	Confirmed	Conforms

[redacted]
[redacted] Manager
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin US

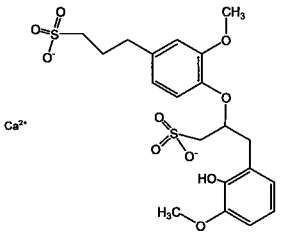
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 2

Page 1 of 1

資料 2

被験物質の一般的事項

新規化学物質等の名称（IUPAC 命名法による）	カルシウム；3-(2-ハイドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-[2-メトキシ-4-(3-スルフォネートプロピル)フェノキシ]プロパン-1-スルフォネート		
別名	リグノスルホン酸のカルシウム塩、リグニンスルホン酸カルシウム塩		
CAS 番号	8061-52-7		
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）			
分子量	重量平均分子量（Mw）：～18,000、数平均分子量（Mn）：～2,500		
試験に供した新規化学物質の純度（%）	含量（主要元素分析値）：炭素 39.8%、硫黄 4.0%、カルシウム（ICP）約 5% 被験物質は天然物由来であることから、Sigma-Aldrich で販売されている製品を 100%として試験を行った。		
試験に供した新規化学物質のロット番号	MKBF9990V		
不純物の名称及び含有率	既知物質として、還元糖：約 16%、水分（カールフィッシャー法）：5.25%		
蒸気圧	――		
対水溶解度	可溶*		
1-オクタノール／水分配係数	――		
融点	130°C		
沸点	――		
常温における性状	暗い黄色の粉末		
安定性	――		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度**	溶媒中の安定性**
	水	50 mg/mL で不溶	50 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。調製後 4 時間の安定性（0.02 mg/mL および 50 mg/mL、室温、遮光保管）を確認した（試験番号：Q-15-004）。
	DMSO	50 mg/mL で不溶	50 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。
	アセトン	100 mg/mL で不溶	100 mg/mL の濃度では、調製時に発熱、発泡および変色は認められなかった。

〔備考〕物理化学的性状は、可能な限り記入すること。
1.「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2.「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3.「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。
*:製品安全データシートより。
**: 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所において確認した。

資料 3

試験に用いた検定菌の復帰変異コロニー数の背景データ（プレインキュベーション法）

（2014 年 4 月～2015 年 3 月）

	陰性対照値		陽性対照値	
	(− S9 mix)	(+ S9 mix)	(− S9 mix)	(+ S9 mix)
TA100	111 ± 17* (n=174)	119 ± 18 (n=180)	434 ± 53 (**AF-2**, 0.01 μg/plate) (n=139)	1113 ± 89 (**B[a]P**, 5 μg/plate) (n=122)
TA1535	11 ± 3 (n=151)	11 ± 3 (n=153)	492 ± 57 (**SA**, 0.5 μg/plate) (n=126)	437 ± 56 (**2AA**, 2 μg/plate) (n=128)
WP2 *uvrA*	28 ± 6 (n=153)	30 ± 6 (n=155)	123 ± 23 (**AF-2**, 0.01 μg/plate) (n=128)	615 ± 112 (**2AA**, 10 μg/plate) (n=130)
TA98	20 ± 4 (n=176)	30 ± 5 (n=181)	490 ± 82 (**AF-2**, 0.1 μg/plate) (n=147)	356 ± 51 (**B[a]P**, 5 μg/plate) (n=122)
TA1537	8 ± 3 (n=226)	18 ± 4 (n=216)	374 ± 140 (**9AA**, 80 μg/plate) (n=198)	174 ± 24 (**B[a]P**, 5 μg/plate) (n=111)

*, 平均値の平均 ± 標準偏差
n, 試験数

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide
SA, Sodium azide
9AA, 9-Aminoacridine
B[a]P, Benzo[a]pyrene
2AA, 2-Aminoanthracene

信頼性保証書

表題　　リグノスルホン酸のカルシウム塩の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号　　M-15-072

この試験に関する信頼性保証部門による査察および監査状況等は下記のとおりであった。

査察・監査項目	査察・監査年月日	運営管理者および試験責任者への報告年月日
試験計画書	2015 年 12 月 18 日	2015 年 12 月 18 日
被験物質調製液の調製および検定菌処理	2016 年 1 月 19 日	2016 年 1 月 19 日
コロニー数の計測	2016 年 1 月 21 日	2016 年 1 月 21 日
報告書草案および生データ	2016 年 2 月 23 日	2016 年 2 月 23 日
最終報告書	2016 年 3 月 22 日	2016 年 3 月 22 日

試験は、「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号)を遵守して実施され、また、この報告書は試験に使用された方法および手順を正確に記載し、記載された結果は試験の生データを正確に反映していることを保証する。

2016 年 3 月 22 日

一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所
信頼性保証部門責任者 [redacted]