

最終報告書

リグノスルホン酸のカルシウム塩の 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

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

〒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 G-15-026

被験物質 リグノスルホン酸のカルシウム塩

試験項目 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

試験開始日 2015年12月17日

実験開始日 2015年12月18日

実験終了日 2016年2月12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 

本試験は、「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、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、環境企発第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、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、環境企発第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3月25日

試験責任者  

試験従事者

試験責任者

試験担当主任者

試験担当者

培養

検体調製および細胞処理

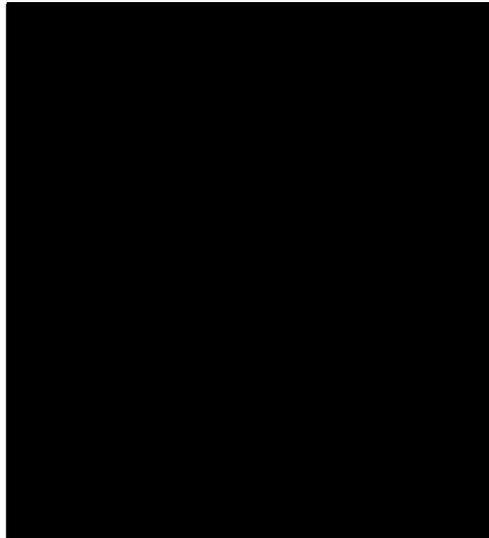
細胞数測定用サンプル作製

細胞数測定

染色体標本作製

染色体分析

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. 細胞と培養条件	7
4. S9 反応液	7
5. 被験物質調製液の調製	8
6. 細胞毒性試験	8
7. 染色体異常試験	9
8. 染色体分析	9
9. 試験成立条件	10
10. 判定	10
予見することができなかつ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 わなかつたこと	10
試験成績および考察	10
参考文献	11
Figure	12
Tables	13
Appendices	16

(最終ページ:17 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 CHL/IU 細胞(チャイニーズ・ハムスター、雌肺由来)を用いる染色体異常試験を実施し、その染色体異常誘発性を調べた。

用量設定のために細胞毒性試験を行った結果、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した場合、5.0 mg/mL の濃度においても 50%を超える細胞毒性作用は認められなかったが、24 時間連続処理した場合、50%の増殖抑制濃度は 4.5 mg/mL と推定された。なお、短時間処理では 5.0 mg/mL の濃度で、24 時間連続処理では 2.5 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められた。また、2.5 mg/mL ないし 5.0 mg/mL の濃度では被験物質の色によると考えられる培養液の色の変化(黄色ないし茶色)が認められた。

以上の結果をもとに、すべての処理条件において 5.0 mg/mL の濃度を最高処理濃度とし、公比 1.5 で 6 濃度群(0.66、0.99、1.5、2.2、3.3、5.0 mg/mL)を設定して染色体異常試験を実施した。なお、短時間処理では 5.0 mg/mL の濃度で、24 時間連続処理では 3.3 mg/mL 以上の濃度で培養液中に沈殿が認められた。

染色体分析に先立ち実施した分裂指数の分析の結果、分析可能な最高濃度は S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理ではともに 5.0 mg/mL、24 時間連続処理では 2.2 mg/mL となったことから、分析可能な最高濃度とそれより低い 2 濃度を含む以下の 3 濃度を観察対象群とし、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理:2.2、3.3、5.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理:2.2、3.3、5.0 mg/mL

24 時間連続処理:0.99、1.5、2.2 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した 5.0 mg/mL の濃度でのみ構造異常を有する細胞の統計学的有意差(出現率:15.0%)が認められ、傾向性検定においても有意となった。一方、倍数性細胞については、すべての処理条件で被験物質処理群に倍数性細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、リグノスルホン酸のカルシウム塩は本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体の構造異常を誘発すると結論した。

試験目的

リグノスルホン酸のカルシウム塩の染色体異常誘発作用を調べるため、その CHL/IU 細胞を用いる染色体異常試験を実施した。

試験ガイドラインと GLP

本試験は、「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、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、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、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知)を遵守して実施した。

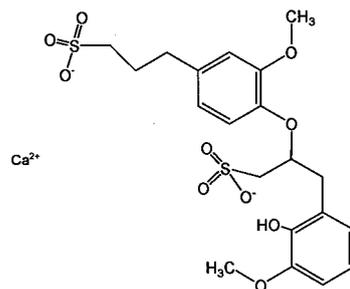
材料と方法

1. 被験物質

被験物質の情報を、下記および Appendix 1、Appendix 2 に示す。

- | | |
|------------------|--|
| 1) 名称 | リグノスルホン酸のカルシウム塩 |
| 2) 化学名 (IUPAC 名) | カルシウム; 3-(2-ヒドロキシ-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 |
| 3) 別名 | リグニンスルホン酸カルシウム塩 |
| 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

S9 mix 非存在下の短時間処理および 24 時間連続処理用の陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC、ロット番号:572ADD、協和発酵キリン)を用いた。また、S9 mix 存在下の短時間処理用の陽性対照物質としてシクロホスファミド(CP、ロット番号:SLBG4216V、Sigma Chemical)を用いた。

試験には、これらの陽性対照物質を日局注射用水(ロット番号:K4D76、大塚製薬工場)に溶かし、凍結保存(-30°C)した原液(MMC:20 µg/mL、CP:1 mg/mL、調製日:MMC および CPともに 2015 年 9 月 30 日)を用時解凍して、調製後 6 か月以内に試験に用いた。

3. 細胞と培養条件

CHL/IU 細胞は、染色体数のモードが 25 本で、我が国においては染色体異常の検出に常用されている。この細胞を JCRB 細胞バンクより入手(1988 年 2 月 10 日入手、入手時の継代数 4)し、継代後、液体窒素(気相)中に凍結保存(現在の継代数 23)した。その細胞(倍加時間約 15 時間、マイコプラズマの汚染なし)を、解凍後、継代 10 代(細胞毒性試験)、4 代(染色体異常試験)で試験に用いた。

培養には、仔牛血清(CS、ロット番号:990250、Gibco)を 10 vol%添加したイーグル MEM 培養液(10%CS/MEM)を用い、CO₂ インキュベーター(5%CO₂、37°C の加湿条件下)内で培養した。イーグル MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末(日水製薬)4.7 g に精製水を 500 mL 加えて溶解し、高圧蒸気滅菌(121°C、15 分)したものに、L-グルタミン(日水製薬)を約 0.15 g、10 w/v%NaHCO₃水溶液を約 10 mL 無菌的に添加して調製した。

4. S9 反応液

S9(ロット番号:RAA201508A、2015 年 8 月 21 日製造および RAA201510A、2015 年 10 月 9 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と 5,6-ベンゾフラボンを投与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラット(体重:199~237 g および 203~238 g)の肝臓から調製したものを購入し、使用時まで超低温槽(-80°C)に保管し、製造後 6 か月以内に使用した。グルコース-6-リン酸(G-6-P、Sigma)、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(β-NADP⁺、オリエンタル酵母工業)および KCl を精製水に溶かし、混合液として超低温槽(-80°C)に保管し、使用時(調製後 6 か月以内に使用)はこれに S9、MgCl₂ および HEPES(pH 7.2)を加え、S9 mix とした。試験には 10%CS/MEM:S9 mix を 22:5 の割合で混合した S9 反応液を用いた(各成分の最終濃度:5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP⁺、0.83 mmol/L MgCl₂、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

5. 被験物質調製液の調製

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ることから、媒体として日局注射用水(ロット番号:K5C00、大塚製薬工場)を用いた。

被験物質を秤量したのち、媒体(日局注射用水)を加えて原液(細胞毒性試験および染色体異常試験ともに 5.00 mg/mL)を用時調製した。その原液を媒体で希釈して下記の濃度の被験物質調製液を調製し、これらの調製液を 10 vol%添加して処理を行った。

細胞毒性試験:0.781、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0 mg/mL(公比 2)

染色体異常試験:6.58、9.88、14.8、22.2、33.3、50.0 mg/mL(公比 1.5)

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. 細胞毒性試験

染色体異常試験に用いる被験物質の処理濃度を決定するため、試験法ガイドラインに従って 5.0 mg/mL を最高処理濃度とする 7 濃度群(0.078~5.0 mg/mL、公比 2)を設定して細胞毒性試験を実施した。

CHL/IU 細胞を 0.25%トリプシン溶液を用いてはがした後、 8×10^3 個/mL の細胞懸濁液とし、その 5 mL (4×10^4 個)をプラスチックディッシュ(直径 6 cm)に播種した。培養開始 3 日目に以下の手順で短時間処理および連続処理を行った。各群 2 枚のディッシュを用いた。

S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理する場合、各ディッシュの培養液をそれぞれ 10%CS/MEM または S9 反応液と交換(2.7 mL/ディッシュ)したのち、媒体(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 10 vol%添加(300 μ L/ディッシュ)し、6 時間処理した。処理後、MEM(血清不含)で洗浄し、10%CS/MEM(5 mL/ディッシュ)でさらに 18 時間培養した。

連続処理する場合は、各ディッシュの培養液を 10%CS/MEM と交換(4.5 mL/ディッシュ)したのち、媒体(陰性対照)または各濃度の被験物質調製液を 10 vol%添加(500 μ L/ディッシュ)し、24 時間処理した。

なお、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了後、培養液を捨て、5 mL の 0.02 w/v%EDTA 含有 PBS(Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含)を加えたのち、ピペッティングにより細胞を剥がして細胞懸濁液とした。細胞懸濁液を遠沈管に移した後、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON® II (Beckman Coulter)に加え、コールターカウンター(Z2, Beckman Coulter)で各ディッシュの細胞数を測定した。

細胞数の測定結果をもとに陰性対照群に対する相対細胞数(%)を算出し、細胞毒性の指標とした。

7. 染色体異常試験

細胞毒性試験とはほぼ同じ試験条件で染色体異常試験を行った。

細胞毒性試験の結果、24 時間連続処理した 5.0 mg/mL の濃度で 42%の相対細胞数を示したが、それ以外は 50%を超える細胞毒性作用は認められなかったことから、5.0 mg/mL を最高濃度とし、公比 1.5 で計 6 濃度群を設定して染色体異常試験を実施した。

陽性対照群については、培養液を 10%CS/MEM または S9 反応液と交換したのち、日局注射用水を 10 vol% 加え、さらに MMC (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を S9 mix 非存在下の短時間処理では 15 $\mu\text{L}/\text{ディッシュ}$ (最終濃度: 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、連続処理では 12.5 $\mu\text{L}/\text{ディッシュ}$ (最終濃度: 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加し、S9 mix 存在下の短時間処理では CP (1 mg/mL) を 30 $\mu\text{L}/\text{ディッシュ}$ (最終濃度: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加した。なお、MMC および CP はこれらの濃度で染色体の構造異常を誘発することが知られている。また、陰性対照群および被験物質処理群については、処理開始時および処理終了時に培養液中の沈殿の有無を肉眼で調べた。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した。培養終了後、培養液を捨てたのち 0.02 w/v% EDTA 含有 PBS (Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含) をディッシュあたり 5 mL 加え、ピペッティングにより細胞を剥がして細胞懸濁液とした。細胞懸濁液を遠沈管に移したのち、陽性対照群を含むすべての処理群について、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON® II に加え、コールターカウンターで細胞数を測定した。

残りの細胞懸濁液については遠沈 (1400 rpm、5 分) し、上清を捨てた後、3 mL の低張液 (0.075 mol/L KCl 水溶液) を加え、30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 (メタノール: 氷酢酸=3:1 (v/v)) を 6 mL 加えて静かに攪拌し、遠沈した。その後、上清を捨て、再び新鮮な固定液を加えて遠沈した。この固定操作をさらに 1 または 2 回行った後、少量の固定液を加えて細胞を懸濁し、その少量をスライドグラス (あらかじめフロスト部分に試験番号、コード番号およびスライド番号を記入) 上に滴下し、そのまま風乾した。1 ディッシュあたり 6 枚のスライド標本作製した。

作製したスライド標本を 70 vol% メタノールに軽く浸漬したのち、3 vol% ギムザ液 (pH 6.8 の 1/15 mol/L リン酸緩衝液で希釈調製) で 8 分染色後、水道水ですすいで風乾した。

8. 染色体分析

染色体分析に先立ち、1 ディッシュから得られた 1 枚の標本を用いて濃度の高い方から分裂指数の分析 (500 細胞/標本) を行い、0.5% 未満の分裂指数を示した場合は染色体分析不能と判断し、分析可能な最高濃度とそれより低い 2 濃度を加えた計 3 濃度を観察対象群とした。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がそれぞれ処理条件が分からない状態で分析した。染色体がよく広がり、かつ散逸していない分裂中期像を探し、1 群あたり 200 個 (100 細胞/ディッシュ、25 細胞/標本) の分裂中期細胞 (染色体数: 23~27 本) について構造異常の種類と数を、1 群あたり 800 個 (400 細胞/ディッシュ、100 細胞/標本) の分裂中期細胞について倍数性細胞 (染色体数が 38 本以上) の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断を除く構造異常の分類は、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会¹⁾による分類法に基づいて行った。ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、

それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

9. 試験成立条件

以下の基準に合致した場合、該当した処理条件については試験不成立とし、再試験を実施するか、試験不成立としない理由を報告書に記載することとした。

- 1) 処理した最高濃度が試験法ガイドラインの基準を満たしていない場合
- 2) 分析可能な被験物質処理群が各試験条件で3群得られない場合
- 3) 陰性対照群の構造異常を有する細胞の出現率が5.0%を超えた場合
- 4) 陽性対照群の構造異常を有する細胞の出現率が20%未満の場合

10. 判定

染色体の構造異常(ギャップを除く)を有する細胞および倍数性細胞の出現数について、陰性対照群と被験物質処理群間および陽性対照群間で、フィッシャーの直接確率法($p < 0.01$ 、片側)により有意差検定を実施した。また、有意差が認められた処理条件については、その用量依存性に関して、コ克蘭・アーミテッジの傾向性検定($p < 0.01$ 、片側)を行った。これらの検定結果を参考とし、生物学的な観点からの判断を加味して染色体異常誘発性の評価を総合的に行った。

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

本試験期間中に、「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。

試験成績および考察

用量設定のために実施した細胞毒性試験の結果、24時間連続処理した5.0 mg/mLの濃度で42%の相対細胞数を示したが、それ以外はいずれの処理条件においても50%を超える細胞毒性作用は認められなかった。また、S9 mix 非存在下および存在下で短時間処理した5.0 mg/mL、24時間連続処理した2.5 mg/mL以上の濃度で肉眼観察において培養液中に沈殿が認められたほか、それらの濃度では被験物質調製液の色(茶色)の影響と考えられる培養液の色の変化(やや黄色ないし茶色化)が認められた(Figure 1)。

以上の結果をもとに、すべての処理条件において5.0 mg/mLの濃度を最高処理濃度とし、公比1.5で6濃度群(0.66、0.99、1.5、2.2、3.3、5.0 mg/mL)を設定して染色体異常試験を実施した。なお、短時間処理では5.0 mg/mLの濃度で、24時間処理では3.3 mg/mL以上の濃度で肉眼観察により培養液中に沈殿が認められた。また、細胞毒性試験と同様に、3.3 mg/mL以上の濃度で培養液がやや黄色ないし茶

色となった。

分裂指数分析の結果、S9 mix 非存在下および存在下の短時間処理では 5.0 mg/mL、24 時間連続処理では 2.2 mg/mL の濃度が分析可能な最高濃度であったことから、この濃度を含む以下の 3 濃度を観察対象群として、染色体分析を行った。

S9 mix 非存在下の短時間処理: 2.2、3.3、5.0 mg/mL

S9 mix 存在下の短時間処理: 2.2、3.3、5.0 mg/mL

24 時間連続処理: 0.99、1.5、2.2 mg/mL

染色体分析の結果、S9 mix 非存在下で短時間処理した 5.0 mg/mL の濃度でのみ構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加(出現率: 15.0%)が認められ、傾向性検定においても有意となったが、それ以外は、いずれの処理条件の被験物質処理群においても構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 1、Table 2、Table 3)。倍数性細胞については、すべての処理条件の被験物質処理群で統計学的に有意な増加は認められなかった(Table 1、Table 2、Table 3)。

陽性の結果が得られた構造異常の D_{20} 値²⁾を算出した結果、S9 mix 非存在下の短時間処理における D_{20} 値は 14 mg/mL であった。

陽性対照物質として用いた MMC は、S9 mix 非存在下の短時間処理および連続処理において染色体の構造異常を誘発し(Table 1、Table 3)、CP は S9 mix 存在下の短時間処理において染色体の構造異常を誘発した(Table 2)。これらの結果より、本実験系の成立が確認された。

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細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号: M-15-072)で陰性の結果が得られている。また、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³⁾。

以上の結果より、リグノスルホン酸のカルシウム塩は、本試験条件下で CHL/IU 細胞に染色体の構造異常を誘発すると結論した。

参考文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編:「化学物質による染色体異常アトラス」, 朝倉書店, 東京(1988)
- 2) 祖父尼俊雄 監修, 染色体異常試験データ集, 株式会社エル・アイ・シー, 東京 (1999)
- 3) 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)

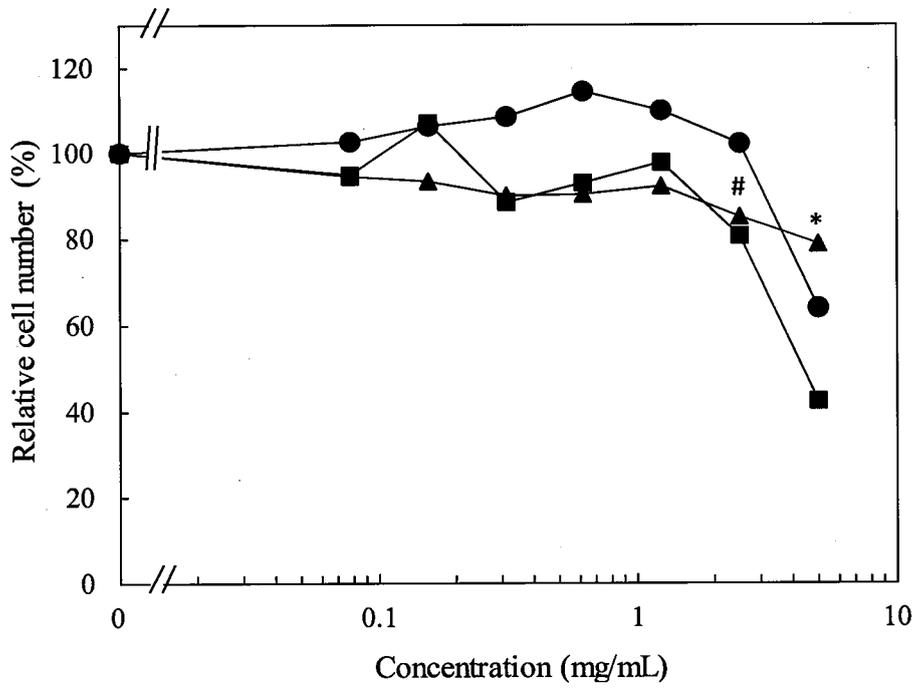


Figure 1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with lignosulfonic acid calcium salt

- : Short-term treatment without S9 mix
- ▲: Short-term treatment with S9 mix
- : 24-h continuous treatment

Precipitation was observed in the medium at 5.0 mg/mL (*) in the short-term treatment with and without S9 mix, and at 2.5 mg/mL (#) or more in the continuous treatment by the naked eye at the end of the treatment.

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with lignosulfonic acid calcium salt (LSCa) for 6 hours without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Relative ²⁾ cell number (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Type and number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with structural aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	-	6 - (18)	100	NA	100	0	2	0	0	1	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	1 (0.3)		
						100	1	2	1	0	0	4	1	4 (4.0)	3 (3.0)	2 (0.5)			
						200	1	4	1	0	1	7	1	7 (3.5)	6 (3.0)	3 (0.4)			
LSCa	0.66	-	6 - (18)	105	NA								NA						
LSCa	0.99	-	6 - (18)	108	NA								NA						
LSCa	1.5	-	6 - (18)	103	NA								NA						
LSCa	2.2	-	6 - (18)	93	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
						100	1	2	4	3	1	0	11	0	10 (10.0)	9 (9.0)	1 (0.3)		
						200	2	3	4	3	1	0	13	0	12 (6.0)	10 (5.0)	3 (0.4)		
LSCa	3.3	-	6 - (18)	87	NA	100	1	1	1	1	0	0	4	0	4 (4.0)	3 (3.0)	0 (0.0)	+	NA
						100	0	2	3	0	0	0	5	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
						200	1	3	4	1	0	0	9	0	7 (3.5)	6 (3.0)	0 (0.0)		
LSCa	5.0 ^{pe}	-	6 - (18)	70	2.6, 2.4	100	1	4	9	4	0	10	28	0	13 (13.0)	12 (12.0)	3 (0.8)		
						100	1	10	23	0	2	0	36	0	19 (19.0)	18 (18.0)	0 (0.0)		
						200	2	14	32	4	2	10	64	0	32 (16.0)	30 *(15.0)	3 (0.4)		
MMC	0.1 µg/mL	-	6 - (18)	86	NA	100	2	25	52	1	0	0	80	0	50 (50.0)	49 (49.0)	0 (0.0)		
						100	7	31	49	6	0	0	93	0	52 (52.0)	50 (50.0)	0 (0.0)		
						200	9	56	101	7	0	0	173	0	102 (51.0)	99 *(49.5)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed.

1) Distilled water for injection JP was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

pe, Precipitation was observed at the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with lignosulfonic acid calcium salt (LSCa) for 6 hours with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Relative ²⁾ cell number (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Type and number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with structural aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	+	6 - (18)	100	NA	100	2	0	0	0	1	0	3	0	3 (3.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						100	0	1	4	0	0	0	5	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						200	2	1	4	0	1	0	8	0	5 (2.5)	3 (1.5)	1 (0.1)		
LSCa	0.66	+	6 - (18)	99	NA								NA						
LSCa	0.99	+	6 - (18)	104	NA								NA						
LSCa	1.5	+	6 - (18)	103	NA								NA						
LSCa	2.2	+	6 - (18)	100	NA	100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	1 (0.3)		
						100	0	2	0	1	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	4 (1.0)		
						200	0	2	1	1	0	0	4	0	4 (2.0)	4 (2.0)	5 (0.6)		
LSCa	3.3	+	6 - (18)	96	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (1.0)		
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	4 (1.0)	NA	NA
						200	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	8 (1.0)		
LSCa	5.0 ^{pe}	+	6 - (18)	86	8.6, 4.6	100	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	4 (1.0)		
						100	0	1	0	0	0	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	2 (0.5)		
						200	0	2	1	0	0	0	3	1	3 (1.5)	3 (1.5)	6 (0.8)		
CP	10 µg/mL	+	6 - (18)	84	NA	100	3	14	46	0	0	0	63	0	41 (41.0)	40 (40.0)	2 (0.5)		
						100	2	24	26	0	0	0	52	0	38 (38.0)	36 (36.0)	0 (0.0)		
						200	5	38	72	0	0	0	115	0	79 (39.5)	76 *(38.0)	2 (0.3)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed.

1) Distilled water for injection JP was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

pe, Precipitation was observed at the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with lignosulfonic acid calcium salt (LSCa) for 24 hours without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S 9 mix	Time of exposure (hrs)	Relative cell number (%) ²⁾	Mitotic index (%) ³⁾	Number of cells analyzed	Type and number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with structural aberrations		Number of polyploid cells (%) ⁶⁾	Trend test ⁷⁾	
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL
Negative ¹⁾	0	-	24	100	NA	100	0	1	1	0	1	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)		
						100	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)			
						200	0	1	1	0	1	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)		
LSCa	0.66	-	24	93	NA		NA												
LSCa	0.99	-	24	99	NA	100	0	4	0	0	0	0	4	0	4 (4.0)	4 (4.0)	1 (0.3)		
						100	2	2	0	0	0	0	4	0	4 (4.0)	2 (2.0)	3 (0.8)		
						200	2	6	0	0	0	0	8	0	8 (4.0)	6 (3.0)	4 (0.5)		
LSCa	1.5	-	24	89	NA	100	1	1	0	0	0	0	2	1	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	NA	NA
						100	3	3	0	0	1	0	7	0	6 (6.0)	4 (4.0)	1 (0.3)		
						200	4	4	0	0	1	0	9	1	8 (4.0)	5 (2.5)	1 (0.1) ⁸⁾		
LSCa	2.2	-	24	88	3.0, 1.6	100	1	1	3	1	0	0	6	0	5 (5.0)	5 (5.0)	2 (1.0)		
						100	3	2	0	0	0	0	5	0	4 (4.0)	2 (2.0)	2 (0.5)		
						200	4	3	3	1	0	0	11	0	9 (4.5)	7 (3.5)	4 (0.7) ⁹⁾		
LSCa	3.3 ^{pe}	-	24	67	1.0, 1.8		not observed due to the small number of metaphases												
LSCa	5.0 ^{pe}	-	24	38	Tox, Tox		not observed due to extreme cytotoxicity												
MMC	0.05 µg/mL	-	24	84	NA	100	3	16	28	2	0	0	49	1	38 (38.0)	37 (37.0)	0 (0.0)		
						100	1	20	26	2	0	0	49	2	35 (35.0)	34 (34.0)	0 (0.0)		
						200	4	36	54	4	0	0	98	3	73 (36.5)	71 *(35.5)	0 (0.0)		

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed; Tox, cytotoxic.

1) Distilled water for injection JP was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% to each dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter.

3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations.

5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group.

7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side). 8) Six hundred and eighty-seven cells were analyzed. 9) Five hundred and ninety cells were analyzed.

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

pe, Precipitation was observed at the end of the treatment in the medium by the naked eye.

Appendix 1

SIGMA-ALDRICH

sigmaaldrich.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 Mw =18,000, average Mn =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% H ₂ O	5.25 %
ICP Major Analysis	Confirmed	Conforms
Confirms Calcium Component		


 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

Appendix 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-ヒドロキシ-3-メキシフェニル)-2-[2-メキシ-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		
C A S 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%として試験を行う。		
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)。
	D M S O	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。

信頼性保証書

表題 リグノスルホン酸のカルシウム塩のチャイニーズ・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

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17日	2015年12月17日
試験計画書変更書		
G-15-026-No.1	2016年1月7日	2016年1月7日
G-15-026-No.2	2016年1月25日	2016年1月25日
被験物質調製液の調製および細胞処理	2016年1月14日	2016年1月14日
標本観察	2016年2月10日	2016年2月10日
報告書草案および生データ	2016年3月23日	2016年3月23日
最終報告書	2016年3月25日	2016年3月25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25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 