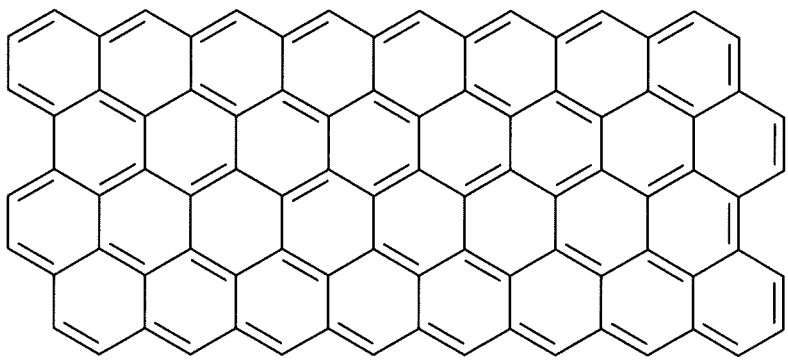


## 微生物を用いる変異原性試験結果報告書

### 1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	グラフェン		
別名			
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合はその製法の概要)			
試験に供した新規化学物質の純度	100%として試験を実施した。	試験に供した新規化学物質の Lot No.	SSXCA
不純物の名称及び濃度			
CAS 番号	1034343-98-0	蒸気圧	
分子量	12.00000	分配係数	
融点		常温における性状	固体
沸点			
安定性	適切な条件下においては安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中での安定性
	水	50 mg/mL では不溶	
	DMSO	50 mg/mL では不溶	発熱、ガスの発生等の反応性なし
	アセトン	100 mg/mL では不溶	
	その他		

(備考) 上記被験物質情報は、製造元及び職場のあんぜんサイトからの情報による。なお、溶解性及び溶媒中での安定性については、株式会社ボゾリサーチセンターで実施した溶解性試験の結果である。

## 2. 試験に用いた菌株

菌株名	入手先	入手年月日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日
<i>Escherichia coli</i> WP2uvrA	国立医薬品食品衛生研究所	2017年4月12日

## 3. S9 Mix

### (1) S9の入手方法等

自製・購入の別	1.自製 <input type="checkbox"/> 2. <input checked="" type="checkbox"/> 購入 (製造元: キッコーマンバイオケミファ株式会社)
製造年月日	2017年11月10日
購入の場合 Lot No.	RAA201711A
保存温度	-86.1~-80.2°C (保存期間: 2017年11月29日~2018年1月12日)

### (2) S9の調製方法

使用動物		誘導物質	
種・系統	ラット・SD系	名称	PB& 5,6-BF
性	雄	投与方法	腹腔内投与
週齢	7週齢	投与期間及び 投与量 (mg/kg 体重)	PB4日間連続投与: 30+60+60+60(mg/kg 体重) PB投与3日目BF投与: 80(mg/kg 体重)
体重	196-240 g		

### (3) S9Mixの組成

成分	S9Mix 1mL 中の量	成分	S9Mix 1mL 中の量
S9	0.1 mL	NADPH	4 µmol
MgCl <sub>2</sub>	8 µmol	NADH	4 µmol
KCl	33 µmol	Na-リン酸緩衝液	100 µmol
グルコース-6-リン酸	5 µmol	その他 ( )	

#### 4. 被験物質溶液の調製

使用溶媒	名称	製造元	Lot No.	グレード	純度(%)
	DMSO	和光純薬工業株式会社	TWG1529	JIS規格 試薬特級	99.0%以上
溶媒選択の理由	本被験物質は、水の 50 mg/mL、アセトンの 100 mg/mL の濃度では不溶であったが、DMSO の 50 mg/mL の濃度では、懸濁可能であり、発熱、ガスの発生等の反応性も認められなかった。また、1 時間経過後の懸濁液に色調変化は見られなかった。そのため DMSO を溶媒として試験を実施した。なお、被験液の調製には、モレキュラシーブス 4A 1/16 (和光純薬工業株式会社 ; Lot No. JPF7829) で脱水した DMSO を使用した。				
被験物質溶液の性状	溶解 <input type="checkbox"/> 懸濁 <input checked="" type="checkbox"/> その他 <input type="checkbox"/>				
被験物質が難溶性の場合における懸濁等の方法	超音波処理				
溶液の調製から使用までの保存時間と温度	用時調製・室温				
純度換算の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/>				

#### 5. 前培養の条件

##### (1) 条件

ニュートリエントブロス	名称	製造元	Lot No.
	Nutrient Broth No.2	OXOID LTD.	1554986
前培養時間	9時間		
培養容器(形状・容器)	L字管・48mL		
培養液量	10 mL	接種菌量	<i>S.typhimurium</i> 株 20 µL <i>E.coli</i> 株 10 µL

##### (2) 前培養終了時の生菌数等

菌株名		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
生菌数 ( $\times 10^9$ /mL)	用量設定試験	2.50	3.90	6.25	4.21	5.73
	本試験	2.65	3.89	6.80	4.19	6.17
測定方法		1. O.D.値より換算 2. 段階希釈法 3. その他				

6. 最小グルコース寒天平板培地

自製・購入の別	1. 自製 <input type="checkbox"/> 2. 購入 (購入元 極東製薬工業株式会社)
製造年月日	2017年11月14日
購入の場合の Lot No.	DZAIBE01
使用寒天の名称・製造・Lot No.	大洋寒天・SSK セールス株式会社・Lot No. BM-M5-268

7. 試験の方法

(1) 試験方法とその選択理由

採用した試験方法	<input checked="" type="checkbox"/> 1. プレインキュベーション法    2. プレート法 3. その他
その他の場合は その選択理由	

(2) 試験条件

組 成	菌懸濁液	0.1 mL
	被験物質溶液	0.1 mL
	Na-リン酸緩衝液 (直接法による場合)	0.5 mL
	S9Mix (代謝活性化法による場合)	0.5 mL
	トップアガー	2.0 mL
プレインキュベーション	温度	37°C
	時間	20 分間
インキュベーション	温度	37°C
	時間	48 時間

8. コロニー計測の方法

計測方法	<input checked="" type="checkbox"/> 1. マニュアル計測 <input checked="" type="checkbox"/> 2. 機器計測
補正の有無	1 無 <input checked="" type="checkbox"/> 2 有 (補正の方法 面積補正:補正值 1.21)

## 9. 試験の結果

(1) 試験の結果は別表による。

(2) 結果の判定

判定	陽性 <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">陰性</span>
<p>判定の理由</p> <p>用量設定試験の結果を別表 1 に、本試験の結果を別表 2 に示した。なお、図 1~10 は別表 2 より作成した。また、当該試験の参考データとして参照した背景データを Attached Data として添付した。</p> <p>用量設定試験及び本試験ともに代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても陰性対照値の 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。</p> <p>一方、陽性対照群では陰性対照群と比較して 2 倍以上となる復帰変異コロニー数の増加を示したことから、使用菌株の復帰突然変異誘発物質に対する反応は適切であったことが確認され、試験は適切に実施されたものと考えられた。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下においてグラフィエンは、微生物に対する遺伝子突然変異誘発能を有しない（陰性）と判定した。</p>	

(3) 参考事項

本被験物質によるプレート上の沈殿は、代謝活性化の有無にかかわらず 156 µg/plate 以上の用量で認められた。本被験物質によるプレート上の着色は、代謝活性化の有無にかかわらず 313 µg/plate 以上の用量で認められた。実体顕微鏡を用いて菌に対する生育阻害を観察した結果、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。

被験液の調製及び試験操作は、紫外線吸収膜付蛍光灯下で実施した。

(別表1)

## 試験結果表(用量設定試験)

被験物質の名称: グラフェン

No. T-2599

試験実施期間		2017年12月21日 より 2017年12月25日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	105 119 ( 112 )	8 11 ( 10 )	28 31 ( 30 )	19 13 ( 16 )	7 5 ( 6 )
	4.88	113 99 ( 106 )	5 9 ( 7 )	24 18 ( 21 )	15 19 ( 17 )	8 11 ( 10 )
	19.5	106 94 ( 100 )	8 11 ( 10 )	23 21 ( 22 )	17 20 ( 19 )	11 10 ( 11 )
	78.1	101 102 ( 102 )	11 10 ( 11 )	20 28 ( 24 )	22 14 ( 18 )	6 12 ( 9 )
	313 #	104 110 ( 107 )	12 9 ( 11 )	22 26 ( 24 )	22 22 ( 22 )	8 5 ( 7 )
	1250 #	104 114 ( 109 )	8 10 ( 9 )	25 24 ( 25 )	20 20 ( 20 )	7 6 ( 7 )
	5000 #	105 97 ( 101 )	8 3 ( 6 )	21 21 ( 21 )	18 20 ( 19 )	3 5 ( 4 )
	S9Mix (+)	陰性対照 (DMSO)	104 97 ( 101 )	12 7 ( 10 )	22 24 ( 23 )	25 25 ( 25 )
4.88		84 113 ( 99 )	8 10 ( 9 )	24 27 ( 26 )	25 24 ( 25 )	11 9 ( 10 )
19.5		124 106 ( 115 )	6 12 ( 9 )	28 24 ( 26 )	24 20 ( 22 )	10 9 ( 10 )
78.1		85 104 ( 95 )	8 10 ( 9 )	26 24 ( 25 )	29 22 ( 26 )	6 7 ( 7 )
313 #		94 96 ( 95 )	8 8 ( 8 )	28 22 ( 25 )	23 25 ( 24 )	8 6 ( 7 )
1250 #		83 102 ( 93 )	7 9 ( 8 )	22 24 ( 23 )	28 23 ( 26 )	5 6 ( 6 )
5000 #		99 109 ( 104 )	8 5 ( 7 )	18 20 ( 19 )	21 20 ( 21 )	7 8 ( 8 )
陽性対照		名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2
	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
	コロニー数/プレート	476 518 ( 497 )	257 276 ( 267 )	84 82 ( 83 )	318 358 ( 338 )	1202 1398 ( 1300 )
	名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P
	用量 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0
	コロニー数/プレート	944 957 ( 951 )	268 281 ( 275 )	642 662 ( 652 )	313 339 ( 326 )	95 119 ( 107 )

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

SAZ : アジ化ナトリウム

ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl

2AA : 2-アミノアントラセン

B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

# : 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

(別表2)

## 試験結果表 (本試験)

被験物質の名称: グラフェン

No. T-2599

試験実施期間		2018年1月11日 より 2018年1月15日				
代謝活性化系の有無	被験物質の用量 ( $\mu$ g/プレート)	復帰変異数(コロニー数/プレート)				
		塩基対置換型			フレームシフト型	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	陰性対照 (DMSO)	113 102 ( 108 )	7 14 ( 11 )	26 25 ( 26 )	18 16 ( 17 )	6 9 ( 8 )
	19.5	117 109 ( 113 )	8 7 ( 8 )	23 25 ( 24 )	16 14 ( 15 )	7 6 ( 7 )
	39.1	124 109 ( 117 )	6 11 ( 9 )	35 30 ( 33 )	14 16 ( 15 )	9 13 ( 11 )
	78.1	101 105 ( 103 )	8 8 ( 8 )	26 21 ( 24 )	16 21 ( 19 )	5 4 ( 5 )
	156 #	109 114 ( 112 )	11 8 ( 10 )	23 21 ( 22 )	18 18 ( 18 )	6 10 ( 8 )
	313 #	98 115 ( 107 )	11 6 ( 9 )	27 28 ( 28 )	14 16 ( 15 )	4 3 ( 4 )
	陰性対照 (DMSO)	129 123 ( 126 )	9 11 ( 10 )	30 25 ( 28 )	26 27 ( 27 )	9 11 ( 10 )
S9Mix (+)	19.5	92 122 ( 107 )	6 10 ( 8 )	24 29 ( 27 )	23 22 ( 23 )	10 8 ( 9 )
	39.1	103 120 ( 112 )	10 5 ( 8 )	29 22 ( 26 )	28 27 ( 28 )	11 10 ( 11 )
	78.1	110 115 ( 113 )	13 7 ( 10 )	23 28 ( 26 )	27 24 ( 26 )	10 5 ( 8 )
	156 #	93 120 ( 107 )	10 7 ( 9 )	27 21 ( 24 )	28 29 ( 29 )	6 7 ( 7 )
	313 #	115 118 ( 117 )	8 10 ( 9 )	28 26 ( 27 )	25 24 ( 25 )	7 10 ( 9 )
	名称	AF-2	SAZ	AF-2	AF-2	ICR-191
	用量 ( $\mu$ g/プレート)	0.01	0.5	0.01	0.1	1.0
コロニー数/プレート	505 517 ( 511 )	325 345 ( 335 )	91 83 ( 87 )	346 334 ( 340 )	1398 1214 ( 1306 )	
名称	B[a]P	2AA	2AA	B[a]P	B[a]P	
用量 ( $\mu$ g/プレート)	5.0	2.0	10.0	5.0	5.0	
コロニー数/プレート	1062 1131 ( 1097 )	330 358 ( 344 )	630 651 ( 641 )	394 365 ( 380 )	95 104 ( 100 )	

(備考)

AF-2 : 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド  
 SAZ : アジ化ナトリウム  
 ICR-191 : 2-メトキシ-6-クロロ-9-[3-(2-クロロエチル)アミノプロピルアミノ]アクリジン・2HCl  
 2AA : 2-アミノアントラセン  
 B[a]P : ベンゾ[a]ピレン

# : 被験物質による沈殿が認められたことを示す。

( )内は、2枚のプレートの平均値を示す。

図 1

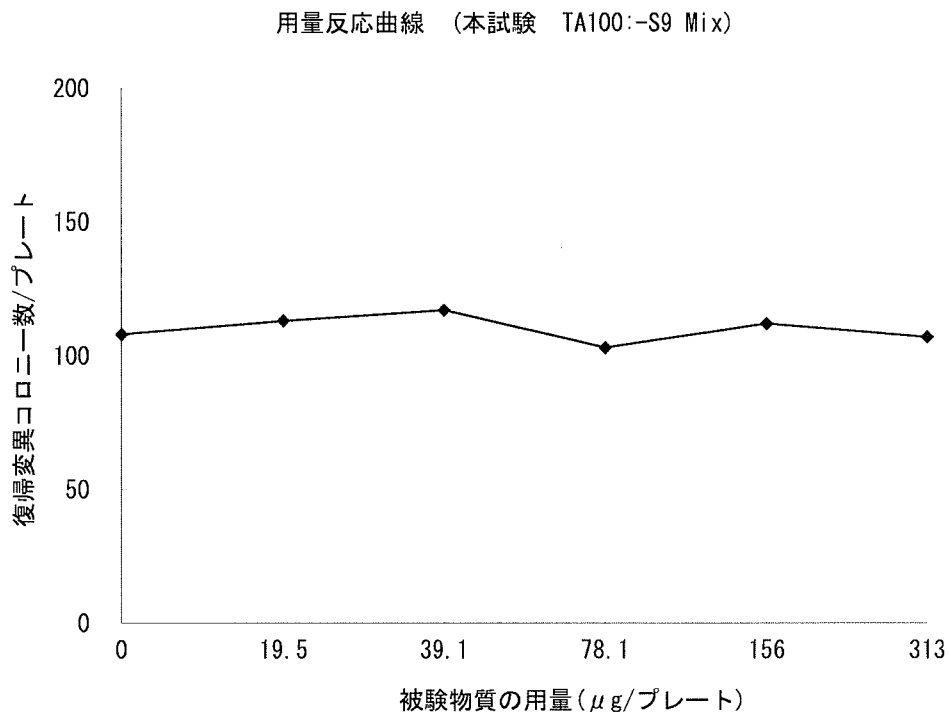


図 2

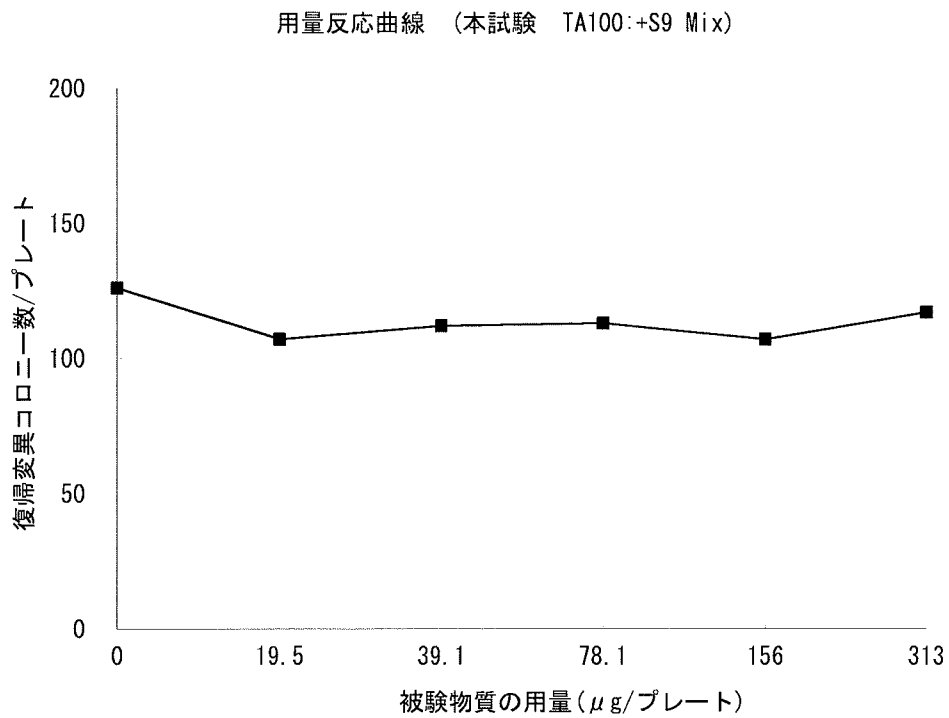




図 3

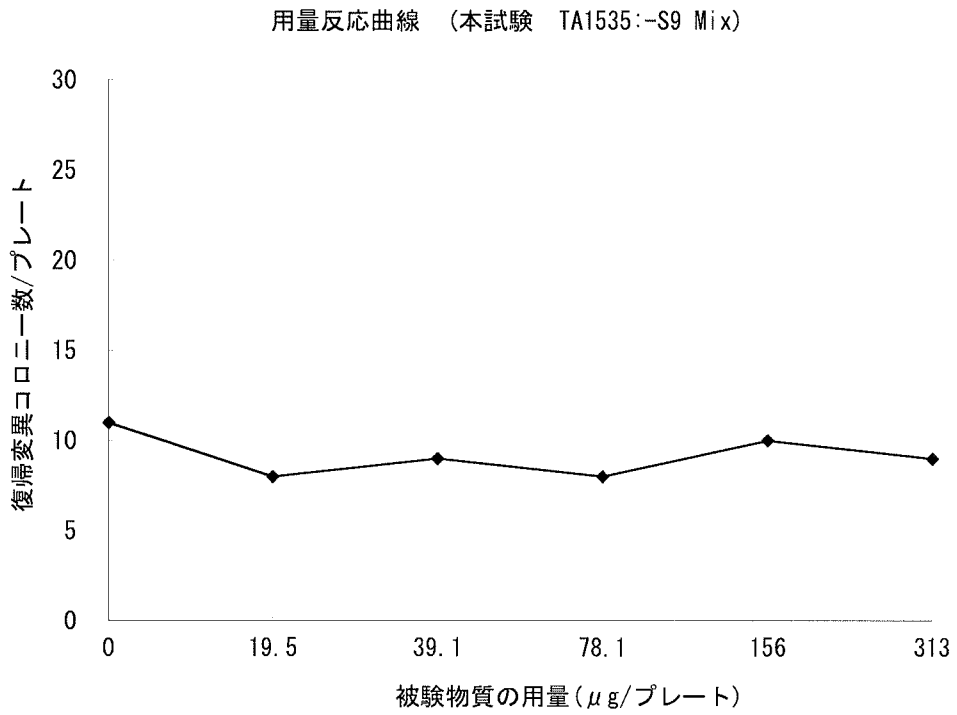


図 4

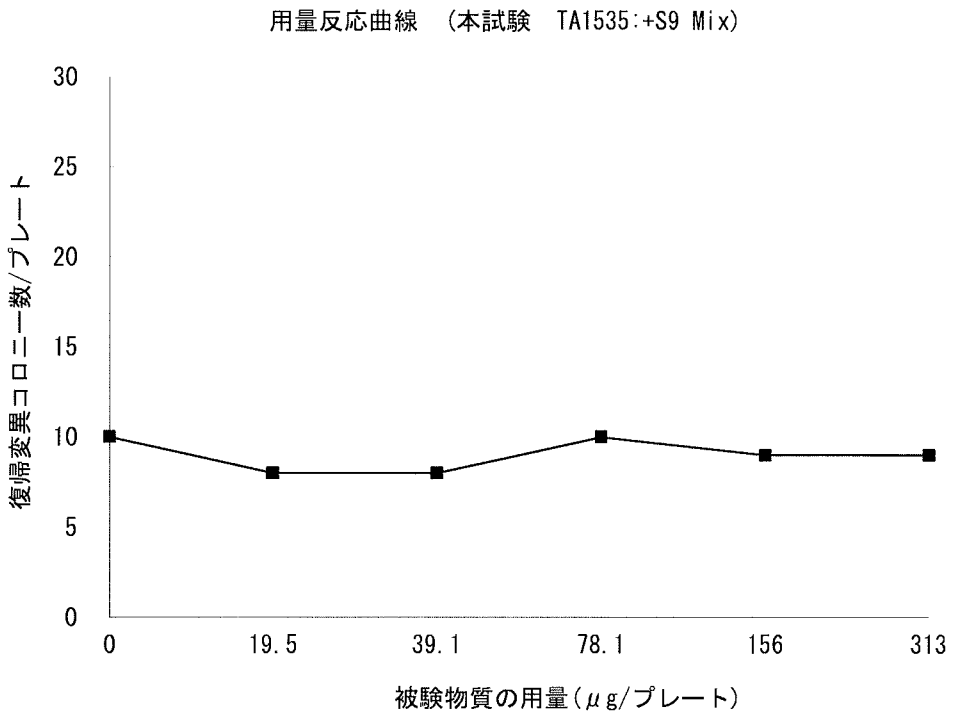


図 5

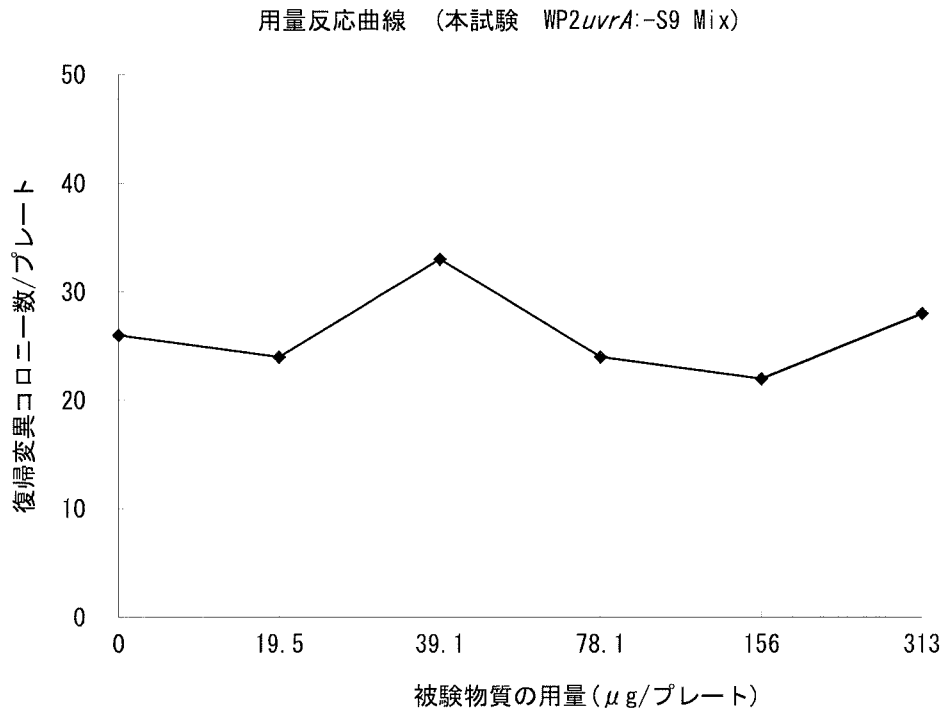


図 6

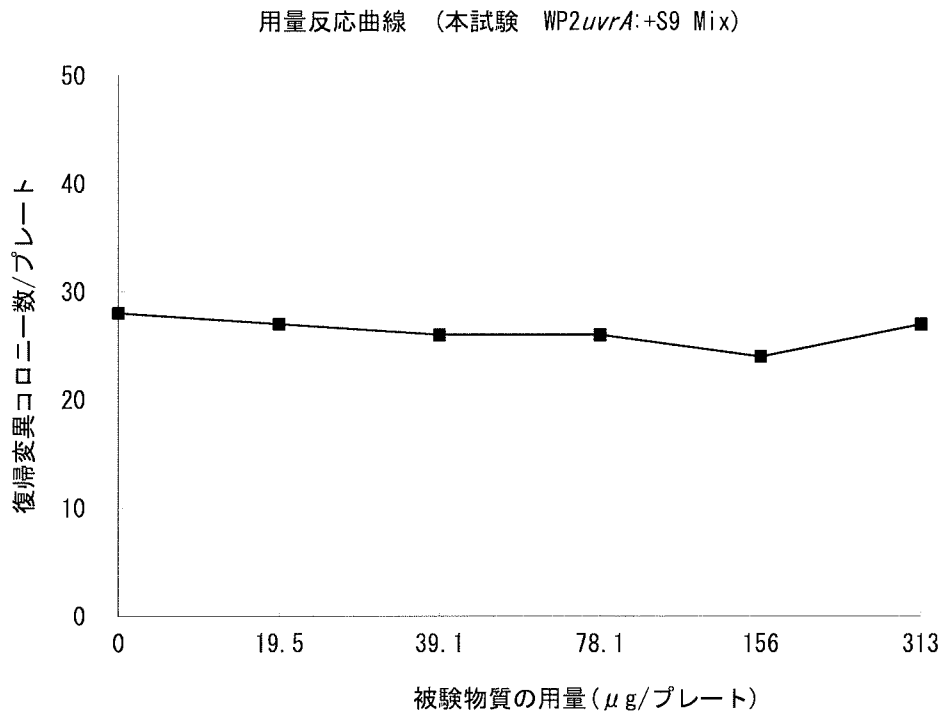


図 7

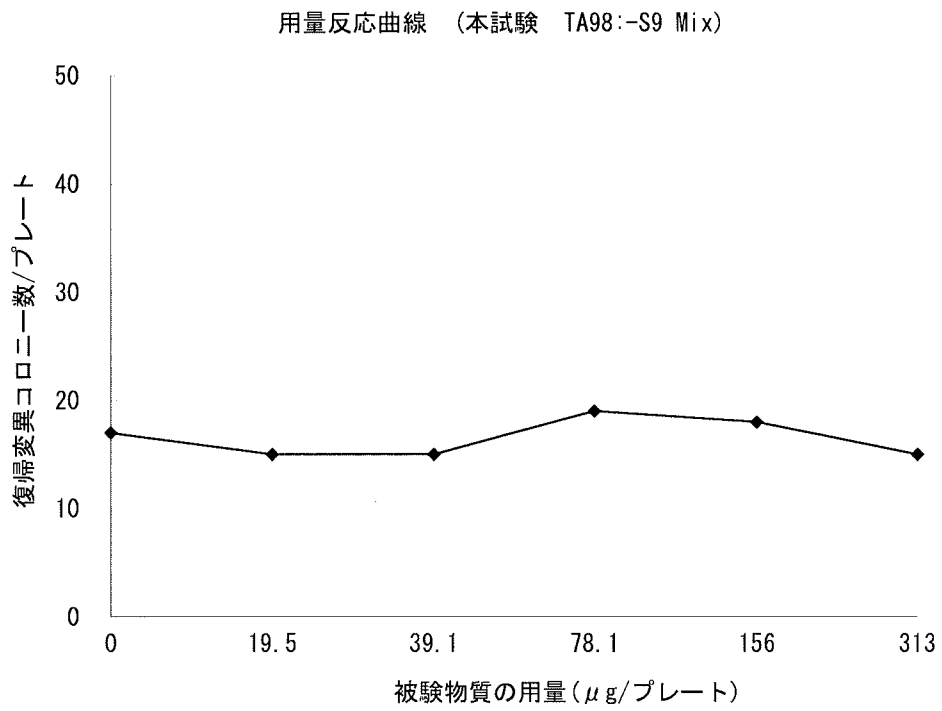


図 8

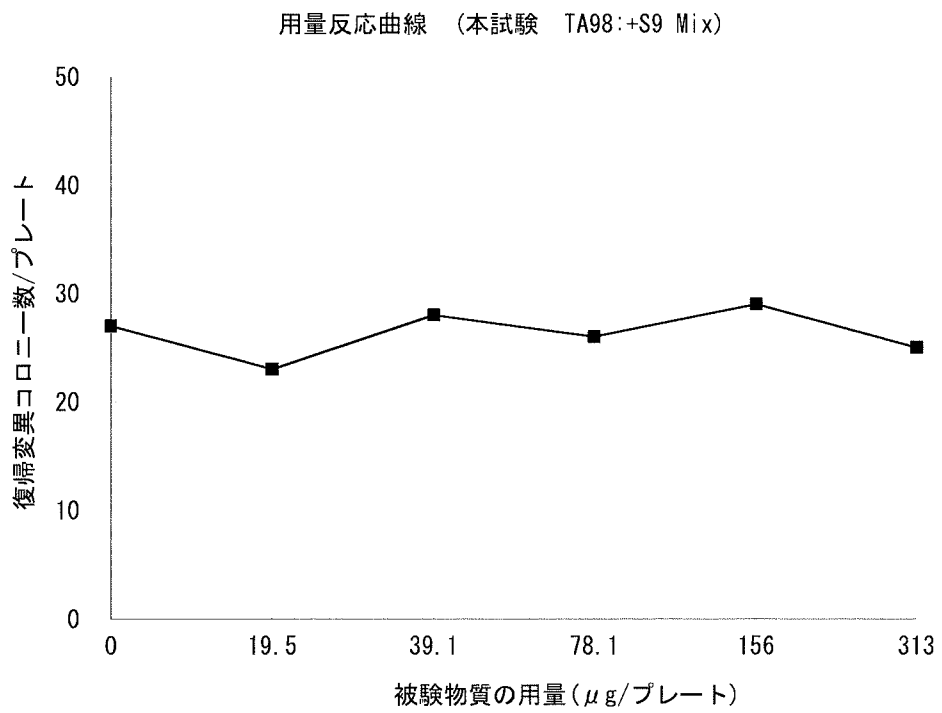


図 9

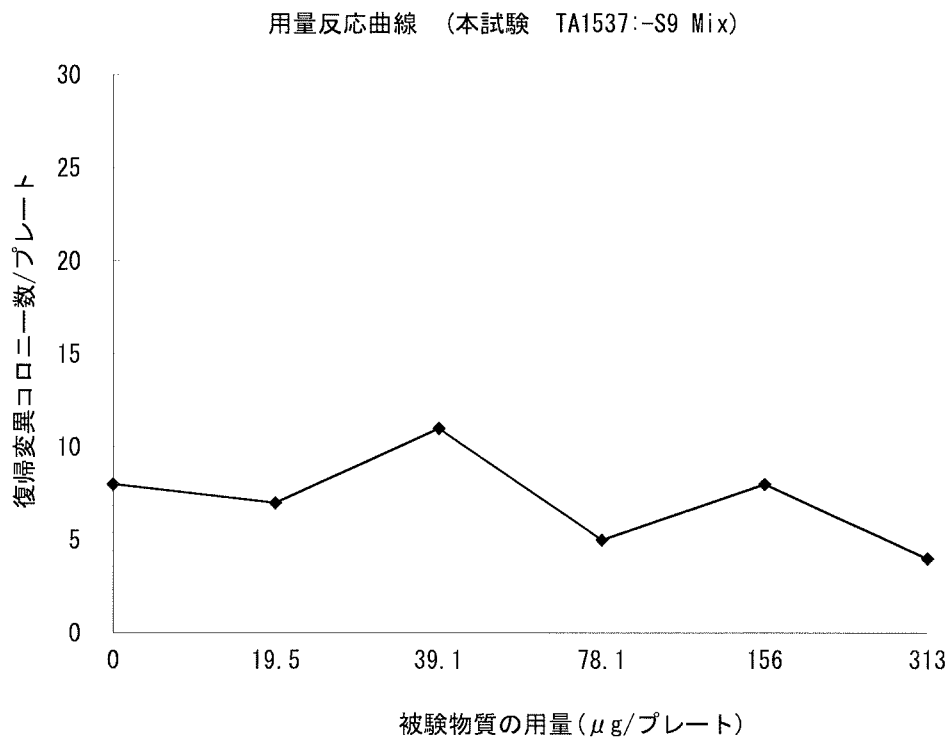
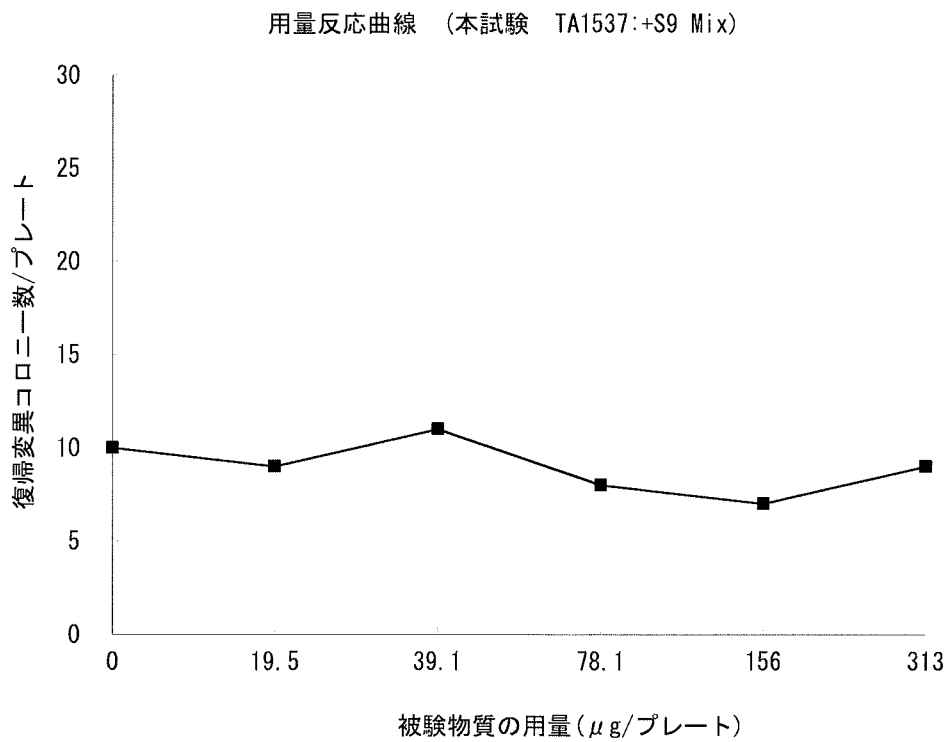


図 10



**Background Data of the reverse mutation tests in bacteria  
at the Tokyo Laboratory of the BoZo Research Center Inc.**

CODE No. :170801

Period : From July 25, 2017 to July 31, 2017

(Pre-incubation Method)

Tester Strains	S9 Mix (-) or (+)	Classification	Mean	S.D.	Management ranges		Number of plates
					Lower limit	Upper limit	
TA100	-	Solvent control	94	13.1	54	133	32
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	510	65.1	326	693	32
	+	Solvent control	114	13.6	76	152	32
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	1004	96	733	1275	32
TA1535	-	Solvent control	8	2.63	1	16	32
		Positive control SAZ(0.5µg/plate)	252	73.5	33	471	32
	+	Solvent control	9	3.14	1	18	32
		Positive control 2AA(2.0µg/plate)	267	71.5	59	475	32
WP2 <i>uvrA</i>	-	Solvent control	20	6.02	3	38	32
		Positive control AF-2(0.01µg/plate)	77	19.9	54	101	32
	+	Solvent control	20	6.20	2	39	32
		Positive control 2AA(10.0µg/plate)	611	55	464	758	32
TA98	-	Solvent control	18	4.31	2	33	32
		Positive control AF-2(0.1µg/plate)	360	51.4	252	468	32
	+	Solvent control	29	7.05	10	49	32
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	372	30.2	282	461	32
TA1537	-	Solvent control	12	3.58	1	22	32
		Positive control ICR-191(1.0µg/plate)	1067	158	427	1708	32
	+	Solvent control	13	3.18	3	22	32
		Positive control B[a]P(5.0µg/plate)	121	22.0	63	178	32

(Notice)

Solvent controls Dimethylsulfoxide(DMSO)

Positive controls AF-2 : 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

SAZ : Sodium azide

ICR-191 : 2-methoxy-6-chloro-9-[3-(2-chloroethyl)aminopropylamino]acridine·2HCl

B[a]P : Benzo[a]pyrene

2AA : 2-aminoanthracene

S9Mix (-) : without metabolic activation

(+) : with metabolic activation