# 最終報告書

表 題:ペルフルオロヘキサデカン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号: SR06202

株式会社 化合物安全性研究所

# 陳述書

表題:ペルフルオロヘキサデカン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号: SR06202

- 1. 本試験は GLP 基準「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について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号・平成 15・11・17 製局第 3 号・環保企発第 031121004 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および『「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について」の一部改正について』(平成 20 年 7 月 4 日薬食発第 0704001 号・平成20・06・30 製局第 2 号・環保企発第 080704001 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)に従い、試験方法は「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号・平成15・11・13 製局第 2 号・環保企発第 031121002 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)、『「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について』(平成 18 年 11 月 20 日薬食発第 1120001 号・平成18・11・13 製局第 2 号・環保企発第 061120001 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および 0ECD 試験法ガイドライン(0ECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)に基づいて実施したものであります。
- 2. 本試験は、試験計画書に従って実施し、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因は認められませんでした。

# 信頼性保証書

表題:ペルフルオロヘキサデカン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号: SR06202

本試験は、株式会社 化合物安全性研究所 QAUによって、下記のとおり査察された。

査	察	段	階	査	察	目	試験責任者への報告日	運営管理者への報告日
試験計	画書			2008	年7月	28 日	2008年7月28日	2008年7月28日
試験計画	画書変更書(	No. 1)		2008	年 8 月	4 日	2008年8月4日	2008年8月4日
被験物質	質の受入・家	表示・保存	_	2008	年7月	28 日	2008年7月28日	2008年7月28日
被験物質	質の調製			2008	年 8 月	19 日	2008年8月19日	2008年8月19日
試験の	 実施			2008	年 8 月	19 日	2008年8月19日	2008年8月19日
観察・	コロニー計》	 則	,	2008	年 8 月	21 日	2008年8月25日	2008年8月21日
生データ	タ			2010	年 2 月	22 日	2010年2月22日	2010年2月22日
最終報	告書(草案)	: 図表		2010	年 2 月	22 日	2010年2月22日	2010年2月22日
最終報信	告書(草案)	: 本文		2010	年 2 月	22 日	2010年2月22日	2010年2月22日
最終報信	告書			2010	年9月	29 日	2010年9月29日	2010年9月29日

- 1. 本試験は、「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について」(平成15年11月21日薬食発第1121003号・平成15・11・17製局第3号・環保企発第031121004号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)、『「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について」の一部改正について』(平成20年7月4日薬食発第0704001号・平成20・06・30製局第2号・環保企発第080704001号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)、「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日薬食発第1121002号・平成15・11・13製局第2号・環保企発第031121002号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)、『「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正について』(平成18年11月20日薬食発第1120001号・平成18・11・13製局第2号・環保企発第061120001号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および0ECD試験法ガイドライン(0ECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)に従い実施された。
- 2. 本試験は、試験計画書に従って実施され、また、本報告書には当該試験に使用した方法および手順が正確に記載されており、試験成績には当該試験の実施過程において得られた生データが正確に反映していることを確認した。

株式会社 化合物安全性研究所

QAU責任者							
		2010	年	9 1	] .	29	日

# 目 次

	頁
表紙	
陳述書	$\cdots \cdots $
信頼性保証書	<del>*</del> ·····3
目次	$\cdots$
表題・試験番	号・試験目的・試験実施基準および試験法ガイドライン・試験委託者… 6
試験施設・診	⊀験責任者・試験従事者およびその業務分担・試験期間⋯⋯⋯⋯7
要約	8
緒言	9
材料および力	7法 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
成績	
考察	
試験成績の信	f頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因······20
資料の保存・	20
試験責任者の	)記名なつ印 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20
Tables	
Table 1	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvrA without metabolic
	activation (dose-finding test) (SR06202)······21
Table 2	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvrA with metabolic
	activation (dose-finding test) (SR06202)······22
Table 3	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvrA without metabolic
	activation (main test) (SR06202)······23
Table 4	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvrA with metabolic
	activation (main test) (SR06202)··································

Figures	
Figure 1-1	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA 100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · 25
Figure 1-2	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA 100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · · 26
Figure 2-1	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · · 27
Figure 2-2	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · · 28
Figure 3-1	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Escherichia coli WP2uvrA
	without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · · 29
Figure 3-2	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Escherichia coli WP2uvrA
	with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · 30
Figure 4-1	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · · 31
Figure 4-2	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · 32
Figure 5-1	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · · 33
Figure 5-2	Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium
	TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202) · · · · · · · · · 34
Appendices	
Appendix 1	CERTIFICATE OF ANALYSIS·······35
Appendix 2	Historical control data for reverse mutation test · · · · · · · · · · · · 36

表類

: ペルフルオロヘキサデカン酸の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験番号

: SR06202

試験目的

:Salmonella typhimuriumおよび Escherichia coli を用いて、ペ ルフルオロヘキサデカン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発 性を検討することを目的とした。

#### 試験実施基準および試験法ガイドライン

試験実施基準(GLP) :「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に ついて」(平成 15年 11月 21日薬食発第 1121003号・平成 15・11・ 17 製局第 3 号·環保企発第 031121004 号 厚生労働省医薬食品局 長・経済産業省製造産業局長・環境省総合環境政策局長連名通 知)および『「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に 関する基準について」の一部改正について』(平成20年7月4日 薬食発第 0704001 号・平成 20・06・30 製局第 2 号・環保企発第 080704001 号 厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業局 長·環境省総合環境政策局長連名通知)

試験法ガイドライン :「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121002 号・平成 15・11・13 製局第 2 号・環保企発 第 031121002 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産業 局長・環境省総合環境政策局長連名通知)、『「新規化学物質等に 係る試験の方法について」の一部改正について』(平成 18 年 11 月 20 日薬食発第 1120001 号・平成 18・11・13 製局第 2 号・環保企 発第 061120001 号厚生労働省医薬食品局長・経済産業省製造産 業局長・環境省総合環境政策局長連名通知)および OECD 試験法 ガイドライン(OECD Guideline for Testing of Chemicals; Bacterial Reverse Mutation Test (471), 21st July 1997)

# 試験委託者

名称

: 厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

所在地

:東京都千代田区霞が関 1-2-2(〒100-8916)

### 試験施設

名称

: 株式会社 化合物安全性研究所

所在地

: 札幌市清田区真栄 363 番 24(〒004-0839)

運営管理者

試験責任者

氏名

:

所属

: 株式会社 化合物安全性研究所 安全性研究部門

# 試験従事者およびその業務分担

被験物質管理

.

試験操作

### 試験期間

試験開始日

: 2008年7月28日

被験物質受入

: 2008年5月13日

実験開始日

: 2008年8月19日

用量設定試験

前培養開始

: 2008年8月18日

被験物質処理

: 2008年8月19日

コロニー計数

: 2008年8月21日

本試験

前培養開始

: 2008年8月26日

被験物質処理

: 2008年8月27日

コロニー計数

: 2008年8月29日

実験終了日

: 2008年8月29日

試験終了日

: 2010年9月29日

# 要 約

ペルフルオロヘキサデカン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性を検討する目的で、Salmonella typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 および Escherichia coli WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験を実施した。試験は代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法で実施した。

用量設定試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比約 3 で低下させた計 7 用量(5~5000 μg/plate)の試験群を設定した。試験の結果、各試験系列のいずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株の 1500 μg/plate 以上の用量で観察された。生育阻害は各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

本試験では、直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 1500 µg/plate とし、以下公比 2 で低下させた計 5 用量 (93.8~1500 µg/plate)の試験群を設定した。試験の結果、各試験系列のいずれの菌株においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が 1500 µg/plate の用量において観察された。生育阻害は各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。また、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、それぞれにおける陰性対照群の値の 2 倍以上の明確な増加を示した。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、ペルフルオロヘキサデカン酸は、当該試験条件下において試験菌株に 対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

# 緒 言

ペルフルオロヘキサデカン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性を、Salmonella typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 および Escherichia coli WP2uvrA を用いる復帰突然変異試験により検討した。試験は、代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)ならびに存在下(代謝活性化法)において、プレインキュベーション法で実施した。

# 材料および方法

### 1. 被験物質

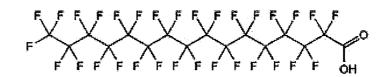
名称 :ペルフルオロヘキサデカン酸

英名 : Perfluorohexadecanoic acid

CAS No. : 67905-19-5

官報公示整理番号 : 2-2658

構造式:



分子式 : C<sub>16</sub>HF<sub>31</sub>O<sub>2</sub>

分子量 : 814.13

物理化学的性質 : 外観 ; 固体、白色(目視確認)

融点 ; 154~155℃ 沸点 ; 211℃/100mm

溶解性;試験施設において、蒸留水、ジメチルスルホキシドお

よびアセトンに対する溶解性を事前確認した。確認内

容を、2. 被験物質の調製(10頁)に記載した。

ロット番号 : 10A-86

純度 : 97.3% (Appendix 1)

不純物の名称およびその濃度:不明(データなし)

製造者

:名称 ; Apollo Scientific Limited

入手量

: 25 g

安定性

:通常の条件下で安定。

保存場所

:検体保存室および変異原性試験室

保存条件

: 密閉、冷所(実測範囲:2~9℃)

オリジナル容器のみにて保存。

保存期間

: 2008年5月13日(受入)~2008年8月27日(最終使用日)

取扱上の注意

:粉塵除去フィルター付の呼吸保護具、手袋、密閉性の良い安全

ゴーグルならびに保護着を着用した。

残余被験物質の処置 :焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

#### 2. 被験物質の調製

試験施設における溶解性確認において、被験物質は蒸留水(日本薬局方注射用水、50 mg/mL の濃度まで検討)に懸濁し反応性はみられなかった。ジメチルスルホキシド(50 mg/mL の濃度まで検討)では、反応性はみられなかったが、懸濁溶液に被験物質塊と泡 が残り調製不可であった。アセトン(500 mg/mL の濃度まで検討)では、250 mg/mL の濃 度で均一な懸濁状態が得られ反応性もみられなかったが、静置による被験物質の沈降 が早かった。以上のことから、当該試験の溶媒として日本薬局方注射用水を選択した。

被験物質を精秤し、日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場) を用いて懸濁および希釈し、所定の濃度に調製した。

用量設定試験では、50 mg/mL 調製液から公比約 3 で段階希釈し 15、5、1.5、0.5、 0.15 および 0.05 mg/mL 調製液を調製した。

本試験では、15 mg/mL 調製液から公比 2 で段階希釈し 7.5、3.75、1.88 および 0.938 mg/mL 調製液を調製した。

調製液の安定性では、用量設定試験および本試験ともに、被験物質調製時の目視確 認において媒体との反応性(変色、発熱、発泡等)はみられなかった。

被験物質調製液は、用量設定試験は調製後 2.5 時間以内に、本試験は調製後 2.1 時 間以内に試験に使用した。

調製液はクリーンベンチ内で用事に調製し、調製に際しては、粉塵除去フィルター 付の呼吸保護具、手袋、密閉性の良い安全ゴーグルおよび白衣を着用し、吸引または 眼、皮膚および衣類に触れないようにして取扱った。

残余調製液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

#### 3. 陰性対照物質

陰性対照物質として、被験物質の調製媒体である日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場)を、原液のまま使用した。

#### 4. 陽性対照物質およびその調製

陽性対照物質として、次表の既知変異原物質を使用した。これらの陽性対照物質は、 遮光および冷所で保存した。

陽性対照物質は、含量補正をせずにそれぞれ次表の濃度に調製し、分注後-20℃以下で凍結保存したものを解凍後 2.6 時間以内に使用した。調製液は、調製日より 10 ヵ月以内(使用期限:調製後 1 年)に使用した。

陽性対照物質	調製濃度	調製媒体
2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル) アクリルアミド(含量 98.3%) ロット番号 SDJ4376 和光純薬工業株式会社	0.1および 1 μg/mL	ジメチルスルホキシドロット番号 VV035株式会社同仁化学研究所
アジ化ナトリウム(純度 99.8%) ロット番号 SDH6348 和光純薬工業株式会社	5 μg/mL	日本薬局方注射用水 ロット番号 7F74 株式会社大塚製薬工場
9-アミノアクリジン塩酸塩水和物 (含量 99.9%) ロット番号 S32398-347 Sigma-Aldrich Corporation	800 μg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 VV035 株式会社同仁化学研究所
2-アミノアントラセン (含量 97.2%) ロット番号 TSP5974 和光純薬工業株式会社	5、10、20 および 100 µg/mL	ジメチルスルホキシド ロット番号 VV035 株式会社同仁化学研究所

#### 5. 試験菌株

試験には、Salmonella typhimurium TA100、TA1535、TA98、TA1537 ならびに Escherichia coli WP2uvrA を使用した。これらの菌株は、1991 年 10 月 18 日に国立衛生試験所(現 国立医薬品食品衛生研究所)より分与された。また、これらの菌株は遺伝毒性を有する化学物質の検索に適した細菌として広く受け入れられていることから選択した。

各菌株は、培養液 8 mL に対しジメチルスルホキシド(ロット番号 VV035、株式会社同仁化学研究所) 0.7 mL を加え、試験チューブに分注後-80℃以下で凍結保存した。各菌

株の培養液の一部を用いて、菌株の特性(アミノ酸要求性、膜変異 rfa 特性、紫外線感受性および薬剤耐性)ならびに陰性対照物質および陽性対照物質に対する感受性の検査を行い、これらの特性が正常に保持されていることが確認された菌株を試験に使用した。

#### 6. 培地

## (1) 前培養用培地

前培養用のニュートリエントプロス培地として、ニュートリエントプロス(OXOID NUTRIENT BROTH No. 2、ロット番号 464616、OXOID LTD.)を日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場)を用いて 25 g/L に調製した。S. typhimurium TA98 および TA100 の培地には、使用時にアンピシリンナトリウム(ロット番号 M8B0619、ナカライテスク株式会社)を 25  $\mu$ g/mL となるように添加した。

#### (2) 試験用培地(最少グルコース寒天培地)

試験用培地として使用した最少グルコース寒天培地(バイタルメディア AMT-0 培地、ロット番号 DZL95902 (2008 年 5 月 9 日製造) 極東製薬工業株式会社) 1000 mL 中の組成は次表の通りである。

試験用培地 1000 mL 中の組成		
硫酸マグネシウム・7 水塩	0. 2	g
クエン酸・1 水塩	2.0	g
リン酸二カリウム・無水塩	10.0	g
リン酸一アンモニウム	1. 92	g
水酸化ナトリウム	0, 66	g
ブドウ糖	20.0	g
寒天末[0X0ID AGAR No.1、ロット番号 997531-02]	15.0	g

#### (3) 重層用培地

次頁の表の組成のソフトアガーおよびアミノ酸溶液を蒸留水を用いて調製し、使用時に(A): (B)=10:1 の容量比で混合した。S. typhimurium には L-ヒスチジンおよび D-ビオチンのアミノ酸溶液を、E. coli には L-トリプトファンのアミノ酸溶液を使用した。

重層用培地の組成	
(A) ソフトアガー	
Bacto <sup>TM</sup> Agar	0.6 %
(ロット番号 6228088、Becton,Dickinson and Company)	
塩化ナトリウム	0.5 %
(ロット番号 611F1714、関東化学株式会社)	
(B) アミノ酸溶液	
L-ヒスチジンおよび D-ビオチン溶液	各々 0.5 mmol/L
(L-ヒスチジン、ロット番号 ASP6644、和光純薬工業株式会社)	
(D-ビオチン、ロット番号 WKL1618、和光純薬工業株式会社)	
または	
L-トリプトファン溶液	0.5  mmol/L
(L-トリプトファン、ロット番号 ASG2385、和光純薬工業株式会社)	

#### 7. S9 mix

S9 mix は、S9(ロット番号 RAA-575、2008 年 4 月 11 日製造、キッコーマン株式会社)、S9 mix 用 Cofactor (Cofactor-I、ロット番号 999704、オリエンタル酵母工業株式会社) および日本薬局方注射用水(ロット番号 7K81、株式会社大塚製薬工場)を用いて用時調製した。

S9 は、購入後-80℃以下で保存し、製造日より 5 ヵ月以内(使用期限:製造後 6 ヵ月)に使用した。この S9 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 S1c:SD 系ラット(雄、7 週齢)の肝ホモジネートより調製された。

S9 mix 1 mL 中の組成は次表の通りである。

S9 mix 1 mL 中の組成		
S9	0. 1	mL
塩化マグネシウム	8	$\mu\text{mol}$
塩化カリウム	33	$\mu mol$
グルコースー6ーリン酸	5	$\mu mol$
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)	4	$\mu \text{mol}$
還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)	4	μmol
リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4	100	μmo1

### 8. 試験群

### (1) 用量設定試験

各菌株につき代謝活性化系 S9 mix の非存在下(直接法)および存在下(代謝活性化法)で試験を実施した。

直接法および代謝活性化法ともに被験物質の最高用量を 5000  $\mu$ g/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群 (5000、1500、500、150、50、15 および 5  $\mu$ g/plate)を設定した。

#### (2) 本試験

各菌株につき直接法および代謝活性化法で試験を実施した。

用量設定試験の結果、直接法および代謝活性化法いずれにおいても被験物質による陽性反応は認められなかった。また、菌株の生育阻害は観察されず、被験物質の析出が  $1500~\mu g/plate$  以上の用量で観察された。これらのことから、本試験では、被験物質の最高用量を  $1500~\mu g/plate$  とし、以下公比  $2~\sigma$ 低下させた計  $5~\pi$ 量( $1500~\tau$ 50、 $375~\tau$ 5、 $188~\tau$ 3  $3.8~\tau$ 9  $3.8~\tau$ 9 3

### (3) 陰性対照群および陽性対照群

用量設定試験および本試験いずれにおいても、試験系列毎に陰性対照群(日本薬局 方注射用水)および次表の陽性対照群を設定した。

供試菌株		陽性対照物質(用量:μg/plate)				
	直	直接法		代謝活性化法		
S. typhimurium TA100	AF-2	(0.01)	2-AA	(1)		
S. typhimurium TA1535	$NaN_3$	(0.5)	2-AA	(2)		
E. coli WP2uvrA	AF-2	(0.01)	2-AA	(10)		
<i>S. typhimurium</i> TA98	AF-2	(0.1)	2-AA	(0.5)		
S. typhimurium TA1537	9-AA	(80)	2-AA	(2)		

AF-2:2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド

NaN<sub>3</sub>:アジ化ナトリウム、 9-AA:9-アミノアクリジン塩酸塩水和物

2-AA: 2-アミノアントラセン

### (4) プレート数およびプレートの識別

プレート数は、各試験群ともに3枚とした。

プレートには、識別のための試験番号および試験群を記載したラベルを貼付した。

#### 9. 試験方法

#### (1) 試験菌株の前培養

容量約 40 mL の L 字管に前培養用培地 (ニュートリエントブロス培地) 12 mL を入れ、解凍した保存菌を 12 μL 接種し、37℃、振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX、タイテック株式会社) で 10 時間の往復振盪培養を行った。 なお、菌株の接種後、L 字管は振盪培養開始まで冷却 (氷冷) した。培養終了時に、得られた菌培養液の 0D<sub>660nm</sub> を比色計 (mini photo 518、タイテック株式会社) で測定し、各菌株の生菌数 - 0D<sub>660nm</sub> 相関式より生菌数を算出した。生菌数が 1×10<sup>9</sup> cells/mL より多く、十分に菌が生育していることが確認された菌培養液を試験に使用した。

各培養液の生菌数(計算値)は次表の通りであった。

	生菌数(計算值)(×10 <sup>9</sup> cells/mL)			
供試菌株	用量設定試験	本試験		
S. typhimurium TA100	3. 01	2, 62		
S. typhimurium TA1535	3, 39	2. 95		
S. typhimurium TA98	3. 99	3. 81		
S. typhimurium TA1537	1.89	1. 59		
E. coli WP2uvrA	4.63	4.08		

#### (2) 被験物質および対照物質調製液の処理

被験物質および対照物質調製液の処理を、プレインキュベーション法で行った。

蓋付きのポリエチレン製チューブ (5 mL 容量) を使用して、被験物質あるいは対照物質調製液 0.1 mL を、直接法の場合は 0.1 mol/L Na-リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5 mL と、代謝活性化法の場合は S9 mix 0.5 mL と、それぞれ混合した。その混合液に菌培養液 0.1 mL を加え、37  $^{\circ}$   $^{\circ}$  振幅 40 mm、振盪速度 100 回/分に設定した振盪恒温槽 (Personal-11・EX、タイテック株式会社)で 20 分間振盪培養 (プレインキュベーション) した。プレインキュベーション終了後、S. typhimurium には 0.05 mmol/L L-ヒスチジンおよび 0.05 mmol/L D-ビオチンを含む重層用培地 2 mL を、E. coli には 0.05 mmol/L L-トリプトファンを含む重層用培地 2 mL を、それぞれ加えて混和し、最少グルコース寒天培地 (プレート) に重層した。平坦な場所で重層用培地を固化させた後、プレートを 37  $^{\circ}$   $^{\circ}$ 

用量設定試験および本試験それぞれにおいて、試験に使用した被験物質調製液の最高濃度および S9 mix 調製液について無菌試験を行い、雑菌の混入の有無を確認した。

#### (3) 観察

各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群について、プレートでの生育阻害の有無を実体顕微鏡(SZ6045TR、オリンパス光学工業株式会社)で確認するとともに、被験物質処理群について、プレートでの被験物質の析出の有無を目視確認した。次に、各菌株の陰性対照群、被験物質処理群および陽性対照群の各プレートについて、コロニーアナライザー(CA-11D、システムサイエンス株式会社)を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。なお、被験物質の析出がコロニーアナライザー計数に影響すると考えられるプレートについては、実体顕微鏡を用いて復帰変異コロニー数の計測を行った。

菌株の生育阻害の有無の判定は標準操作手順書に基づき以下の基準(0~4)で行い、 基準1以上を生育阻害有りとした。

0:生育阻害が認められない。

微細なバックグラウンドコロニー(50 倍程度の倍率で観察可能)が培地 一面に観察され、陰性対照群のバックグラウンドコロニーとの差が認めら れない場合。

1:わずかな生育阻害が認められる。

陰性対照群に比べ、バックグラウンドコロニーが減少して個々のコロニーの大きさが大きくなっている場合。

2:中程度の生育阻害が認められる。

隆起した大きな復帰変異コロニーと、平坦で小さなバックグラウンドコロニーが並存している場合。

3:強い生育阻害が認められる。

バックグラウンドコロニーが復帰変異コロニーと同程度の大きさまで 成長し、両者の判別が困難である場合。

4: 生存菌が全く認められない。

#### (4) 観察結果の集計方法

各試験群の復帰変異コロニー数の平均値±標準偏差を求めた。

#### 10. 試験結果の評価

#### (1) 試験系の感度確認

各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値が、それぞれ試験施設の背景 データに基づく管理値の範囲内であり、かつ、各菌株の陽性対照群の復帰変異コロ ニー数の平均値が陰性対照群の値の 2 倍以上である場合に、試験系が適切な感度を 有しているものと判断した。

## (2) 試験結果の判定基準

被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値が陰性対照群の値の 2 倍以上となり、かつ用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加が、再現性を持って認められた場合に陽性であるとした。試験結果の判定にあたって、統計学的手法は用いなかった。

# 成績

用量設定試験の復帰変異コロニー数の計測結果を Table 1 および 2 に、本試験の復帰変 異コロニー数の計測結果を Table 3 および 4 に示す。また、用量設定試験および本試験に おける被験物質用量と復帰変異コロニー数の用量-反応曲線を Figure 1-1~5-2 に示す。

用量設定試験(5~5000 μg/plate)の結果、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の2倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株の1500 μg/plate以上の用量で観察された。生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

本試験 (93.8~1500 µg/plate) の結果、各菌株の被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の 2 倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加もみられなかった。被験物質の析出が、各菌株において 1500 µg/plate の用量で観察された。生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験いずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値(Appendix 2)の範囲内であり、また、陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て陰性対照群の値の2倍以上であった。

用量設定試験および本試験いずれの無菌試験においても、被験物質調製液の最高濃度および S9 mix に雑菌の混入はみられなかった。

# 考 察

ペルフルオロヘキサデカン酸の細菌における遺伝子突然変異誘発性の有無を、S. *typhimurium* TA100、TA1535、TA98、TA1537 および *E. coli* WP2*uvr*A を用いる復帰突然変異試験により検討した。

用量設定試験は、被験物質の最高用量を 5000 μg/plate とし、以下公比約 3 で用量を低下させた計 7 用量の試験群で実施した。本試験は、用量設定試験の結果に基づき、被験物質の最高用量を 1500 μg/plate とし、以下公比 2 で用量を低下させた計 5 用量の試験群で実施した。

試験の結果、用量設定試験および本試験ともに、各菌株の直接法および代謝活性化法のいずれの試験系列においても、被験物質処理群の復帰変異コロニー数の平均値は陰性対照群の値の2倍未満であり、用量の増加にともなう復帰変異コロニー数の増加も認められず、当該被験物質の遺伝子突然変異誘発性は陰性であった。また、用量設定試験および本試験いずれにおいても、被験物質の析出が、各菌株における直接法および代謝活性化法の高用量(用量設定試験:1500、5000 μg/plate、本試験:1500 μg/plate)で観察された。プレートでの生育阻害は、各試験系列のいずれの菌株においても観察されなかった。

用量設定試験および本試験のいずれにおいても、各菌株の陰性対照群の復帰変異コロニー数の平均値は、全て試験施設の背景データに基づく管理値の範囲内であった。各菌株の陽性対照群の復帰変異コロニー数の平均値には、それぞれの陰性対照群の値と比較して 2倍以上の明確な増加が認められた。これらの結果から、各菌株が変異原物質に対し適切な感度を有していたことが確認された。

以上のことから、ペルフルオロヘキサデカン酸は、当該試験条件下において試験菌株に 対する遺伝子突然変異誘発性を有しないと判断した。

# 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

### 資料の保存

- 1. 資料保存施設および保存資料
  - 以下の資料を、株式会社 化合物安全性研究所の資料保存室に保存する。
  - (1) 試験計画書、試験計画書変更書
  - (2) 生データその他の記録文書
  - (3) 最終報告書
- 2. 保存期間

試験終了後10年間保存し、その後の保存については試験委託者との協議により決定する。

# 試験責任者の記名なつ印

)010 年9月29日

Table 1 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvr A without metabolic activation (dose-finding test) (SR06202)

Compound	Concentration	Revertants per plate (Mean±S.D.)  S9 (-)						
	(μg/plate)							
#		TA100	TA1535	WP2 <i>uvr</i> A	TA98	TA1537		
Control <sup>a</sup>		126 , 115 89 (110±19)	8 , 7 13 (9±3)	26 , 22 26 (25±2)	20 , 18 13 (17±4)	8 , 11 7 (9±2)		
Perfluorohexadecanoic acid	5	137 , 146 128 (137±9)	14 , 7 12 (11±4)	19 , 34 21 (25±8)	26 , 16 18 (20±5)	9 , 13 6 (9±4)		
	15	120 , 108 122 (117±8)	6 , 4 8 (6±2)	15 , 15 24 (18±5)	15 , 11 16 (14±3)	5 , 8 4 (6±2)		
	50	125 , 115 113 (118±6)	3 , 11 12 (9±5)	21 , 25 23 (23±2)	15 , 17 16 (16±1)	8 , 10 4 (7±3)		
	150	115 , 126 116 (119±6)	7 , 5 10 (7±3)	16 , 19 20 (18±2)	17 , 18 13 (16±3)	9 , 16 12 (12±4)		
	500	135 , 138 125 (133±7)	11 , 8 3 (7±4)	21 , 16 19 (19±3)	19 , 16 14 (16±3)	9 , 8 7 (8±1)		
	1500	113 #, 115 # 113 # (114±1)	12 *, 5 * 6 * (8±4)	26 #, 26 # 21 # (24±3)	17 #, 12 # 15 # (15±3)	8 #, 9 # 7 # (8±1)		
	5000	121 # , 116 # 139 # (125±12)	8 #, 8 # 10 # (9±1)	19 #, 33 # 18 # (23±8)	6 *, 11 * 10 * (9±3)	13 #, 9 # 8 # (10±3)		
		AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	. 9-AA		
Positive control	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80		
	Rev./plate	714 , 737 732	194 , 228 217	84 , 88 99	406 , 407 382	220 , 198 143		
	(Mean±S.D.)	(728±12)	(213±17)	(90±8)	(398±14)	(187±40)		

a: Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

<sup>9-</sup>AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev.: Revertants

<sup>#:</sup> Precipitation at the end of treatment

Table 2 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvr A with metabolic activation (dose-finding test) (SR06202)

Compound	Concentration	S9 (+)						
	(μg/plate)							
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537		
Control <sup>a</sup>		158 , 154 134 (149±13)	8 , 14 9 (10±3)	21 , 17 16 (18±3)	26 , 31 38 (32±6)	13 , 12 12 (12±1)		
Perfluorohexadecanoic acid	5	154 , 137 152 (148±9)	10 , 11 10 (10±1)	24 , 28 25 (26±2)	31 , 34 33 (33±2)	16 , 11 13 (13±3)		
	15	157 , 149 148 (151±5)	7 , 9 8 (8±1)	17 , 26 20 (21±5)	23 , 29 34 (29±6)	14 , 23 14 (17±5)		
	50	163 , 155 146 (155±9)	14 , 8 11 (11±3)	31 , 22 28 (27±5)	25 , 29 32 (29±4)	14 , 13 12 (13±1)		
	150	151 , 150 159 (153±5)	14 , 10 15 (13±3)	23 , 29 17 (23±6)	36 , 33 28 (32±4)	16 , 10 12 (13±3)		
	500	133 , 132 140 (135±4)	5 , 4 10 (6±3)	20 , 12 16 (16±4)	34 , 18 31 (28±9)	10 , 18 23 (17±7)		
	1500	154 # , 112 # 131 # (132±21)	10 *, 6 * 10 * (9±2)	29 #, 24 # 22 # (25±4)	33 *, 20 * 34 * (29±8)	12 *, 13 * 13 * (13±1)		
	5000	128 *, 113 * 145 * (129±16)	14 #, 8 # 9 # (10±3)	28 *, 21 * 25 * (25±4)	31 *, 31 * 35 * (32±2)	20 *, 15 * 11 * (15±5)		
		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA		
Positive control	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2		
	Rev./plate	1658 , 1671 1510	415 , 402 401	1101 , 1114 1220	303 , 275 324	383 , 415 362		
	(Mean±S.D.)	(1613±89)	(406±8)	(1145±65)	(301±25)	(387±27)		

a: Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

Rev.: Revertants

<sup>2-</sup>AA: 2-Aminoanthracene

<sup>#:</sup> Precipitation at the end of treatment

Table 3 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvr A without metabolic activation (main test) (SR06202)

Compound	Concentration	Revertants per plate (Mean±S.D.) S9 (-)							
	(μg/plate)								
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537			
Control <sup>a</sup>		108 , 108 134 (117±15)	8 , 16 11 (12±4)	13 , 16 10 (13±3)	16 , 15 11 (14±3)	18 , 13 15 (15±3)			
Perfluorohexadecanoic acid	93.8	123 , 116 128 (122±6)	11 , 15 5 (10±5)	23 , 13 10 (15±7)	10 , 17 11 (13±4)	15 , 16 8 (13±4)			
	188	111 , 135 132 (126±13)	12 , 8 11 (10±2)	7 , 17 13 (12±5)	11 , 18 12 (14±4)	10 , 20 19 (16±6)			
	375	107 , 129 124 (120±12)	4 , 10 9 (8±3)	20 , 17 25 (21±4)	21 , 13 21 (18±5)	7 , 12 18 (12±6)			
	750	98 , 117 103 (106±10)	13 , 11 13 (12±1)	18 , 20 15 (18±3)	17 , 8 16 (14±5)	10 , 12 18 (13±4)			
	1500	130 # , 120 # 109 # (120±11)	11 #, 13 # 10 # (11±2)	16 *, 17 * 23 * (19±4)	28 *, 25 * 16 * (23±6)	12 <sup>#</sup> , 12 <sup>#</sup> 3 <sup>#</sup> (9±5)			
		AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA			
Positive control	Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80			
	Rev./plate	669 , 714 692	213 , 245 244	86 , 89 86	340 , 378 375	124 , 267 179			
	(Mean±S.D.)	(692±23)	(234±18)	(87±2)	(364±21)	(190±72)			

a: Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

NaN<sub>3</sub>: Sodium azide

<sup>9-</sup>AA: 9-Aminoacridine hydrochloride hydrate

Rev.: Revertants

<sup>#:</sup> Precipitation at the end of treatment

Table 4 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537 and Escherichia coli WP2uvr A with metabolic activation (main test) (SR06202)

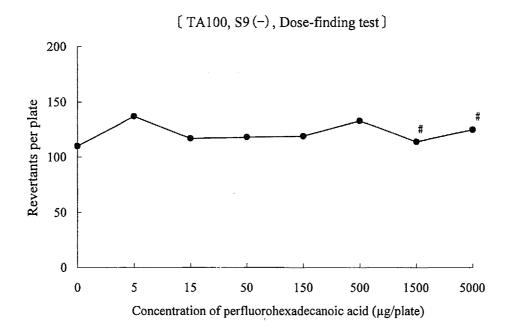
Compound	Concentration	Revertants per plate (Mean±S.D.) S9 (+)								
	(μg/plate)									
		TA100	TA1535	WP2uvr A	TA98	TA1537				
Control <sup>a</sup>		168 , 115 127 (137±28)	7 , 12 15 (11±4)	15 , 24 17 (19±5)	38 , 35 35 (36±2)	22 , 15 13 (17±5)				
Perfluorohexadecanoic acid	93.8	139 , 152 142 (144±7)	12 , 9 12 (11±2)	33 , 18 21 (24±8)	32 , 39 26 (32±7)	13 , 10 11 (11±2)				
	188	138 , 142 141 (140±2)	10 , 10 9 (10±1)	17 , 22 11 (17±6)	41 , 40 29 (37±7)	14 , 8 17 (13±5)				
	375	117 , 113 141 (124±15)	8 , 13 19 (13±6)	21 , 29 21 (24±5)	36 , 28 27 (30±5)	16 , 14 13 (14±2)				
	750	118 , 130 156 (135±19)	8 , 12 10 (10±2)	17 , 17 18 (17±1)	26 , 33 31 (30±4)	17 , 11 13 (14±3)				
	1500	125 *, 148 * 110 * (128±19)	10 *, 15 * 14 * (13±3)	29 * , 19 * 19 * (22±6)	32 *, 34 * 27 * (31±4)	16 *, 8 * 17 * (14±5)				
		2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA				
Positive control	Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2				
	Rev./plate	1736 , 1459 1466	373 , 370 349	977 , 1119 1111	359 , 386 356	444 , 446 417				
	(Mean±S.D.)	(1554±158)	(364±13)	(1069±80)	(367±17)	(436±16)				

a: Water for injection (Japanese pharmacopoeia)

Rev.: Revertants

<sup>2-</sup>AA: 2-Aminoanthracene

<sup>#:</sup> Precipitation at the end of treatment



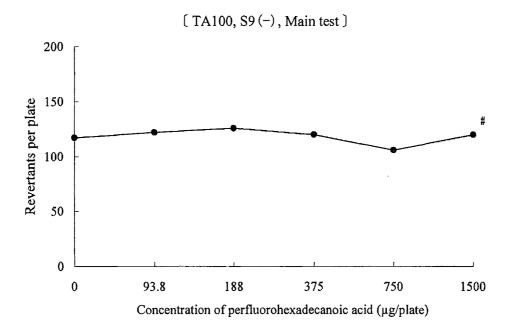
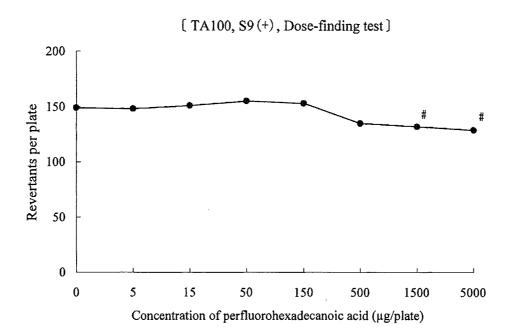


Figure 1-1 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)



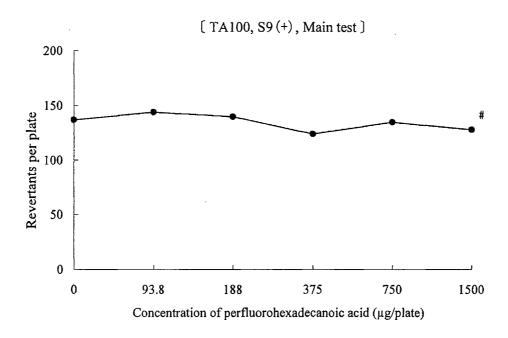
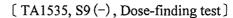
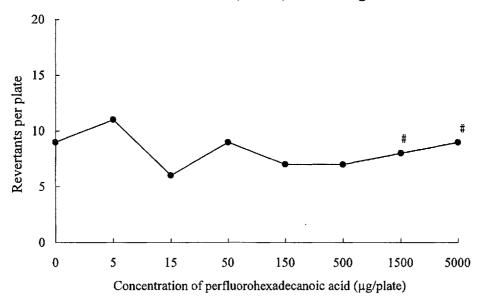


Figure 1-2 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA100 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)





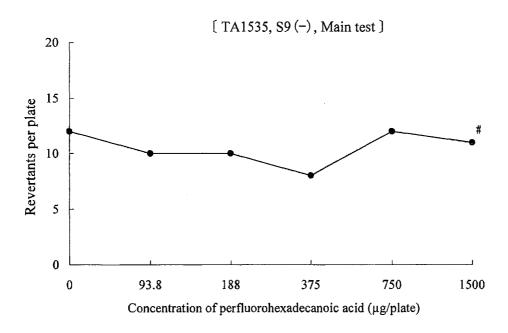
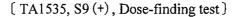
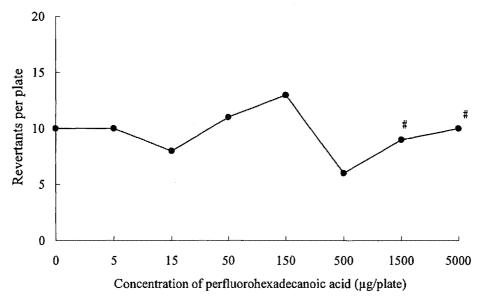


Figure 2-1 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1535 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)





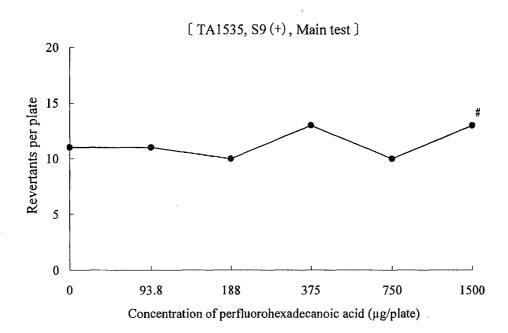
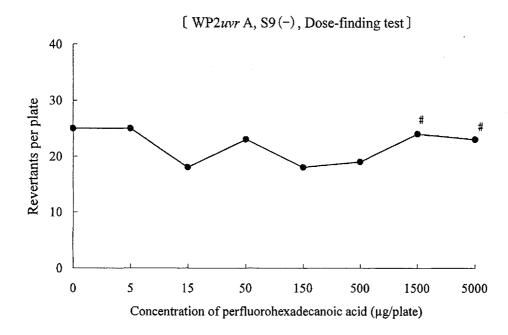


Figure 2-2 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1535 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)



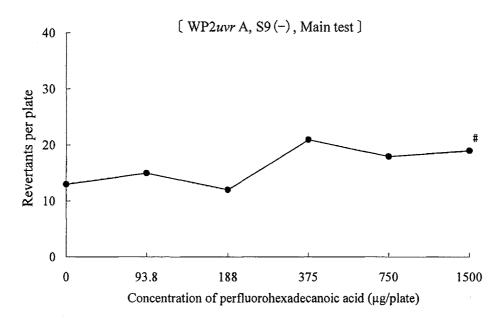
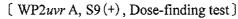
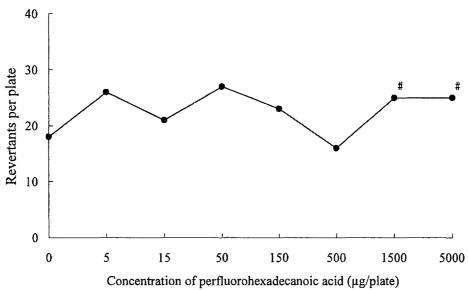


Figure 3-1 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Escherichia coli* WP2*uvr* A without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)





[ WP2uvr A, S9(+), Main test]

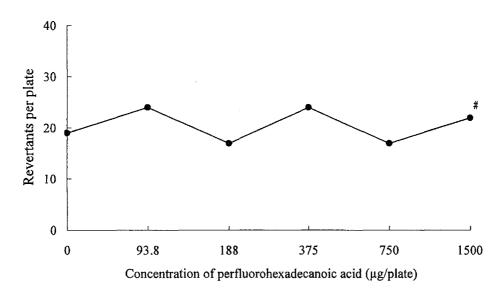
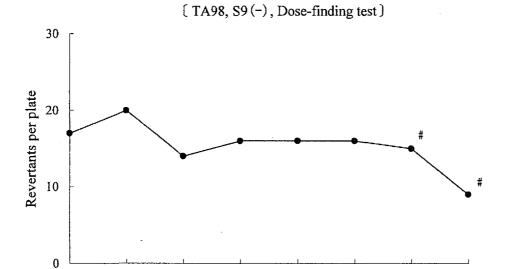


Figure 3-2 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Escherichia coli* WP2*uvr* A with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)



Concentration of perfluorohexadecanoic acid (µg/plate)

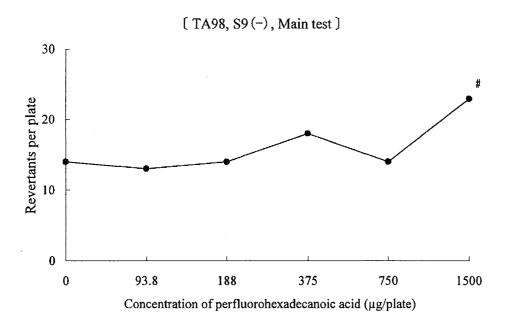
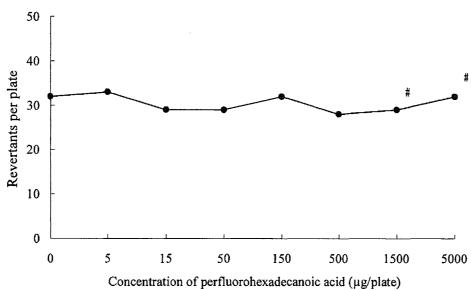


Figure 4-1 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA98 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)





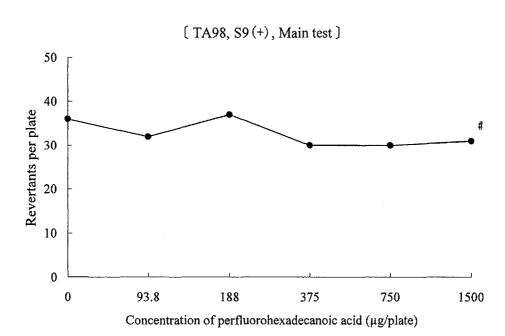
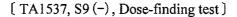
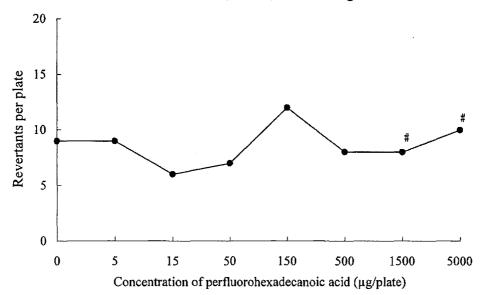


Figure 4-2 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA98 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)





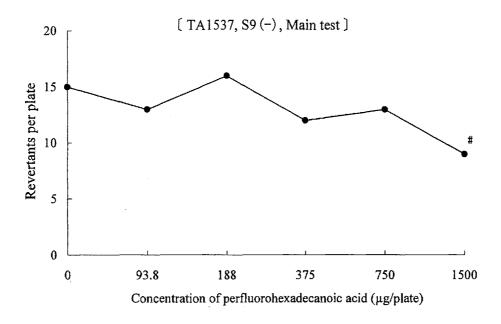
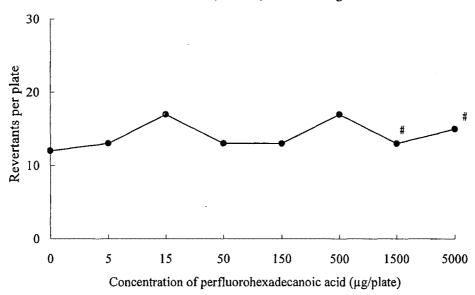


Figure 5-1 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1537 without metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)





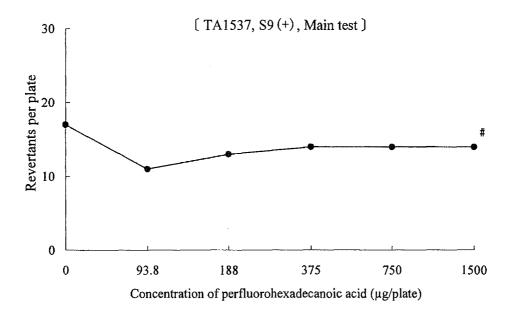


Figure 5-2 Reverse mutation test of perfluorohexadecanoic acid in *Salmonella typhimurium* TA1537 with metabolic activation (dose-response curves) (SR06202)

Apollo Scientific Ltd Whitefield Road, Bredbury, Stockport, SK6 2QR, UK. Tel: 44(0)161 406 0505 Fax: 44(0)161 406 0506

e-mail: sales@apolloscientific.co.uk



For the attention of: KK From: David Parton Date: 11<sup>th</sup> March 2008

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product:

Perfluorohexadecanoic acid

Code No:

PC6066

Cas No:

67905-19-5

Formula:

 $C_{16}HF_{31}O_{2}$ 

Batch No:

10A-86

Purity:

97.3% by HPLC

Verified by:

David Parton

Signed:

Date:

11th March 2008

## Historical control data for reverse mutation test

Control data (Date: 2005.4~2008.7)										
Strain	TA100		TA1535		WP2uvr A		TA98		TA1537	
Metabolic activation	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	Š9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
No. of data	n = 181	n = 181	n = 176	n = 176	n = 172	n = 174	n = 184	n = 183	n = 178	n = 179
Mean ± S.D.	123 ± 13	138 ± 13	9 ± 2	10 ± 2	18 ± 3	21 ± 3	16 ± 3	28 ± 4	11 ± 3	15 ± 5
Maximum	147	166	13	14	28	28	25	39	20	26
Minimum	96	109	6	6	11	12	10	18	4 .	2
X-R-Rs a	88 ~ 158	101 ~ 175	4~14	5~15	7 ~ 29	10 ~ 32	8~24	17 ~ 39	3 ~ 19	4~26

Positive control of	data (Date	: 2005.4~20	08.7)
---------------------	------------	-------------	-------

Strain	TA	100	TA	1535	WP2	uvr A	TA	. 89	TA	1537
Metabolic activation	S9 (-)	89 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
Compound	AF-2	2-AA	NaN <sub>3</sub>	2-AA	AF-2	2-AA	AF-2	2-AA	9-AA	2-AA
Concentration (µg/plate)	0.01	1 .	0.5	2	0.01	10	0.1	0.5	80	2
No. of data	n = 181	n = 181	n = 176	n = 176	n = 172	n = 174	n = 184	n = 183	n = 178	n = 179
Mean ± S.D.	769 ± 109	1258 ± 207	284 ± 43	298 ± 52	106 ± 15	912 ± 113	341 ± 74	267 ± 45	263 ± 64	211 ± 65
Maximum	1158	2111	379	633	158	1277	594	396	471	558
Minimum	543	851	165	203	84	638	214	171	122	124
X-R-Rs a	570 ~ 969	867 ~ 1649	196 ~ 372	200 ~ 396	85 ~ 127	673 ~ 1151	205 ~ 477	182 ~ 352	103 ~ 423	113 ~ 309

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> X-R-Rs =X±2.66Rs

X =Mean

Rs = Mean of (Xi - Xi-1)