

1. 藻類生長阻害試験

要 約

試験委託者：環境省

表題：クリンダマイシンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号：A191113

試験方法：本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成 23 年 3 月 31 日 薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号、最終改正：令和元年 7 月 1 日）に準拠して実施した。

本試験では被験物質として塩酸クリンダマイシン一水和物（CAS 番号 58207-19-5）を用いたが、記載する被験物質濃度は、全てクリンダマイシン（CAS 番号 8323-44-9）に換算した濃度とした。

- 1) 供試生物： 単細胞緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
- 2) 試験用水： 試験ガイドライン推奨培地
- 3) 暴露期間： 72 時間
- 4) 培養方式： 止水式（開放系）、振とう培養（100 rpm）
- 5) 初期生物量： 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
(指数増殖期の藻類乾燥重量 : 1.8×10^{-8} mg/cell, n=30)
- 6) 試験温度： 22°C（暴露期間中の変動範囲は±2°C以内）
- 7) 照明： 60~75 μ E/m²/s, 白色蛍光灯での連続照明（液面付近）
- 8) 試験濃度：

試験区	設定濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.00020
濃度区 2	0.00053
濃度区 3	0.0014
濃度区 4	0.0038
濃度区 5	0.010

公比 : 2.66

9) 分析法： 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 法

結 果：

1) 生長速度の比較による阻害濃度

阻害濃度の算出には被験物質濃度の測定値の時間加重平均値を用いた。

半数生長阻害濃度 ErC50 (0-72h) : 0.00460 mg/L

(95%信頼区間 : 0.00423～0.00500 mg/L 直線回帰分析)

最大無影響濃度 NOECr (0-72h) : 0.000439 mg/L (Williams の多重比較検定)

2) 藻類の形態観察

暴露開始後 72 時間の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全ての濃度区において、細胞形態の変化（収縮、膨張、破裂等）や細胞凝集は認められず、また、対照区との相違もなかった。

1 材料

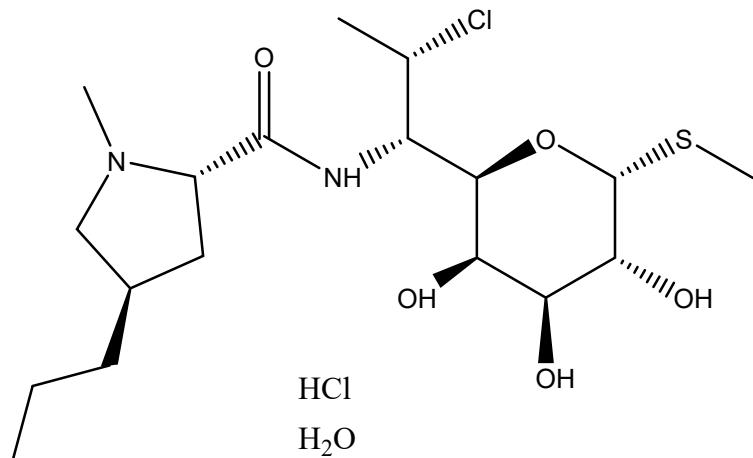
1.1 被驗物質

1.1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称^{*1}： 塩酸クリンダマイシン一水和物

CAS 番号^{*1} : 58207-19-5

構造式：



分子式^{*1*2} : C₁₈H₃₃ClN₂O₅S · HCl · H₂O (クリンダマイシンとして「C₁₈H₃₃ClN₂O₅S」)

分子量^{1*2} : 479.45 (クリンダマイシンとして「424.98」)

換算係数² : 0.886 (塩酸クリンダマイシン一水和物およびクリンダマイシンの分子

量より算出した。被験物質秤量値は塩酸クリンダマイシン一水和物としての値を用いる。)

*1：供給者提供資料

*2：株式会社L S I メディエンスにて確認、計算

1.1.2 供試試料

純度^{*1} : 100.8%

ロット番号^{*1}： WHPMD

供給者： 東京化成工業株式会社

外観^{*1}： 白色～ごくうすい黄色，結晶～粉末

*1：供給者提供資料

1.1.3 保管法および安定性の確認

試験期間中、被験物質を下記のとおり保管した。

保管条件：室温、暗所、気密

保管場所：試験物質保管用デシケータ

実験終了後に、被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは試験前に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質が保管条件下で安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料-1に示す。

(装置) フーリエ変換赤外分光分析装置：

サーモフィッシュャーサイエンティフィック製 Nicolet iS10 型

1.2 試験用水

前培養および試験ともに試験ガイドラインに示されている推奨培地を調製し、濾過滅菌（0.22 μm ）したものを使用した。組成表を付属資料-2に示す。

試験ガイドラインには、大気との平衡状態で培地の pH が 8.1（25°C）となることが記載されている。当施設での pH は 8.0 付近（7.7～8.1, 22°C）である。

1.3 供試生物

- 1) 分類： 単細胞緑藻類
- 2) 学名： *Pseudokirchneriella subcapitata*
- 3) 株名： ATCC22662
- 4) 入手先： American Type Culture Collection
- 5) 入手日： 1996 年 6 月 20 日
- 6) 入手後の管理： Gorham 培地を用い無菌的に継代培養。定期的（約 6 ヶ月毎）に細菌検査をし無菌性を確認した。
- 7) 前培養： 前培養期間；2020 年 2 月 22 日～2020 年 2 月 25 日
試験と同条件で前培養し、暴露開始時に指數増殖期になるようにした。
また、変形や異常な細胞の出現は認められなかった。

1.4 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器： 300 mL ガラス製三角フラスコ（IWAKI, 旭硝子製）（アルミ栓付）
- 2) 藻類培養試験装置： 伊藤製作所製 AGP-150RL 型
- 3) 光学顕微鏡： ニコン製 ECLIPSE TE300 型
- 4) 粒子計数装置： シスメックス製 CDA-1000 型

- 5) pH 計 : 堀場製作所製 F-71 型
- 6) 温度計 : Tasco Japan 製 TNA-120 型
- 7) 光量子計 : Apogee 製 MQ-200 型
- 8) 電子天秤 : メトラー製 AG204 型
 メトラー製 AB204-S 型
 メトラー製 PB3002 型
 メトラー・トレド製 MS3002S 型

2 方法

2.1 試験方法

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について〈藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験〉」(平成 23 年 3 月 31 日 薬食発 0331 第 7 号, 平成 23・03・29 製局第 5 号, 環保企発第 110331009 号, 最終改正: 令和元年 7 月 1 日) に準拠して実施した。

本試験では被験物質として塩酸クリンダマイシン一水和物 (CAS 番号 58207-19-5) を用いたが, 記載する被験物質濃度は, 全てクリンダマイシン (CAS 番号 8323-44-9) に換算した濃度とした。

2.1.1 試験条件

試験条件について以下に記載する。試験容器およびその他の器具は, 必要に応じて滅菌したものを使用した。また, 藻類の接種も無菌操作で行った。

- 1) 培養方式 : 止水式 (開放系), 振とう培養 (100 rpm)
- 2) 暴露期間 : 72 時間
- 3) 試験液量 : 100 mL/容器
 (被験物質の濃度分析に使用するため, 藻類接種時は 99 mL/容器とした)
- 4) 連数 : 6 容器/対照区, 3 容器/試験区
- 5) 初期生物量 : 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
 (指増殖期の藻類乾燥重量 : 1.8×10^{-8} mg/cell, n=30)
- 6) 試験温度 : 22°C (暴露期間中の変動範囲は±2°C以内)
- 7) 照明 : 60~75 μ E/m²/s, 白色蛍光灯での連続照明 (液面付近)
- 8) pH : 調整なし

2.1.2 予備試験結果

試験濃度を試験ガイドライン上限濃度 (100 mg/L) 以下とし、予備試験を実施した。結果を以下に示す。また、試験用水に対する被験物質の溶解性について評価した結果を付属資料-3 に示す。

予備試験結果 (対照区 3 連, 濃度区 1 連)

設定濃度 (mg/L)	阻害率 (%) $I_{\mu}(0-3d)^{*1}$	暴露開始時	試験液中の被験物質濃度 (設定値に対する割合, %)		
			暴露開始後 72 時間		
			藻類添加有 遠心有	藻類添加無 遠心有	藻類添加無 遠心無
対照区	--	--	N.D.	N.D.	N.D.
0.0010	7.1	93	86	87	88
0.010	91.1	118	139	108	N.A.
0.10	92.0	77	N.A.	N.A.	N.A.
1.0	92.2	86	N.A.	N.A.	N.A.

*1 : 「2.2.1 結果の算出, 2) 生長速度および生長阻害率の算出」に示した式により算出した。

-- : 計算には該当せず

N.D. : Not detected

N.A. : Not analyzed

上記の結果、阻害率が高かったため、最高濃度区を 0.00050 mg/L 以下とし、さらに予備試験を実施した。

予備試験結果 (対照区 3 連, 濃度区 1 連)

設定濃度 (mg/L)	阻害率 (%) $I_{\mu}(0-3d)^{*2}$	暴露開始時	試験液中の被験物質濃度 (設定値に対する割合, %)		
			暴露開始後 72 時間		
			藻類添加有 遠心有	藻類添加無 遠心有	藻類添加無 遠心無
対照区	--	--	N.D.	N.D.	N.D.
0.00020	0.0	81	54	60	60
0.00050	1.9	75	68	68	75

*2 : 「2.2.1 結果の算出, 2) 生長速度および生長阻害率の算出」に示した式により算出した。

-- : 計算には該当せず

N.D. : Not detected

2.1.3 試験濃度の設定

2.1.2 に示した予備試験の結果に基づき、試験濃度を次のように決定した。

試験区	設定濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.00020
濃度区 2	0.00053
濃度区 3	0.0014
濃度区 4	0.0038
濃度区 5	0.010

公比 : 2.66

2.1.4 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料-4 に示す。pH 測定および試験培養液の色調観察のための試験液（各試験区 1 連、以下予備容器とする）も調製した。

調製時の試験液の外観を観察し記録した。

2.1.5 試験液および試験培養液の分析

暴露開始時、暴露開始後 24, 48 および 72 時間に、全試験区の試験液および試験培養液中の被験物質濃度を、高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 法により分析した。分析方法の詳細を付属資料-5 に示す。

2.1.6 試験操作

1) 暴露の開始

前培養した藻類を、生物量（代替パラメータとして細胞濃度）が $5 \times 10^3 \text{ cells/mL}$ となるよう、試験液の入った容器に一定量添加した。前培養液の生物量は、粒子計数装置および血球計算盤と顕微鏡により測定した。なお、予備容器には添加しなかった。

各試験容器を培養装置に、乱数表を用いランダムに配置し、暴露を開始した。暴露開始後 24 時間毎に再配置した。予備容器も同時に培養装置に設置した。

2) 生物量の測定

暴露開始後 24, 48 および 72 時間に各試験容器より試験培養液 1.0 mL (72 時間では 0.5 mL) を採取し、粒子計数装置用電解液 9.0 mL (72 時間では 14.5 mL) と混合した後、生物量を粒子計数装置により測定した。

3) 試験培養液の色調観察および細胞形態観察

暴露開始時, 暴露開始後 24, 48 および 72 時間には試験培養液の色調を予備容器との比較で観察した。また, 暴露開始後 72 時間には細胞形態を顕微鏡により観察した。

4) 試験環境の測定

試験液および試験培養液の pH を暴露開始時および暴露開始後 72 時間に測定した。暴露開始時の pH は, 各試験区の予備容器から試験液を一部採取して測定した。暴露開始後 72 時間の pH は, 各試験区の試験容器のうち 1 容器 (No.1) の試験培養液について測定した。また, 暴露期間中, 培養装置内の温度, 照明光強度および回転数を 1 日 1 回測定した。

2.2 試験結果の評価

2.2.1 結果の算出

1) 生長曲線

対照区および各濃度区の生物量の平均値を時間に対してプロットし, 生長曲線を作成した (片対数グラフ)。この時, 対照区の生長曲線が暴露期間中を通して指数増殖期にあることを確認した。

2) 生長速度および生長阻害率の算出

指数増殖している藻類の平均生長速度 (μ_{i-j}) を次の式より算出した。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで,

μ_{i-j} : t_i 時と t_j 時の間の生長速度 (／日)

X_i : t_i 時の生物量

[暴露開始時 (t_0) の生物量については設定値を用いる]

X_j : t_j 時の生物量

t_i : 暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間 (日)

t_j : 暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間 (日)

各濃度区における各連の生長阻害率 (I_μ) は対照区の平均生長速度の平均値 (μ_c) と各濃度区での各連の平均生長速度 (μ_t) との間の差として次の式により算出した。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

ここで、

μ_c ：対照区の平均生長速度の平均値

μ_t ：各濃度区における各連の平均生長速度

3) 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度

阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値の時間加重平均値とした。

時間加重平均値は次の式より算出した。

$$Area = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} \times Hours$$

$$\overline{MC} = \frac{Total\ Areas}{Total\ Hours}$$

$ConcA_n$: n 期間の始めの測定値

(暴露開始時または暴露開始後 24, 48 時間の測定値)

$ConcB_n$: n 期間の終わりの測定値

(暴露開始後 24, 48 時間または 72 時間の測定値)

($ConcA_n$ と $ConcB_n$ の値が同じ場合は、 $Area = ConcA_n \times Hours$ とする。)

\overline{MC} : 時間加重平均値

4) 半数生長阻害濃度 (EC50) の算出

72 時間の暴露期間を通じた生長阻害率 I_μ (0-3d)を用いて、以下の方法により藻類の生長を 50% 阻害する被験物質濃度（半数生長阻害濃度 EC50）を決定した。

最高濃度区における阻害率	$\geq 50\%$	$< 50\%$
濃度－生長阻害率曲線の記載 (片対数紙にプロット)	記載	記載
EC50 の決定方法	濃度－生長阻害率曲線において直線性の認められる点を用いて直線回帰分析（最小二乗法）し、阻害率 50% との交点から算出 可能な限り 95% 信頼区間を算出	推定される濃度領域を記載
EC50 の表記方法	ErC50 (0-72h)	

5) 最大無影響濃度 (NOEC)

対照区と濃度区の生長速度 μ (0-3d)を以下の統計学的手法により比較し、有意差が認められない試験最高濃度区の時間加重平均値を最大無影響濃度（NOEC : NOECr (0-72h)と表記）とした。

多群の比較 [対照区以外に 2 群以上] Bartlett の等分散検定
等分散が認められる場合 一元配置分散分析 (ANOVA) パラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
等分散が認められない場合 Kruskal-Wallis の検定 ノンパラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
Yukms ソフトウェア Statlight 「#4 多群の比較」 (Yukms Corp, 東京)

6) 統計学的手法

試験結果の算出に用いた統計学的手法は、結果とともに示した。

2.2.2 試験の有効性

以下の条件から、本試験の有効性を判断した。

- 1) 対照区の生物量が暴露期間中に少なくとも 16 倍に増殖すること。
- 2) 対照区の毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて 35%を超えないこと。
- 3) 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数が 7%を超えないこと。

3 結果および考察

3.1 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

該当する事象はなかった。

3.2 培養試験装置内環境、試験液および試験培養液の pH、試験液の外観

暴露期間中の培養試験装置内環境（温度、照明光強度、回転数）を Table 1 に、暴露開始時の試験液および暴露開始後 72 時間の試験培養液の pH を Table 2 に、調製時の試験液の外観を Table 3 に示す。

培養試験装置内の温度は、設定範囲内（22°C、暴露期間中の変動範囲は±2°C以内）であった。pH は、暴露開始時および暴露開始後 72 時間で 7.7 であった。

調製時の試験液の外観は、全ての試験区において、けん濁物質、浮遊物質、沈殿物質は認められず、色調は無色であった。

3.3 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

試験液および試験培養液中の被験物質濃度の結果を Table 4 に、代表的な測定結果を付属資料-5 に示す。

濃度区 1～5 の暴露開始時の測定値は、0.000177, 0.000483, 0.00128, 0.00330, 0.00943 mg/L、暴露開始後 72 時間の測定値は 0.000129, 0.000394, 0.00101, 0.00307, 0.00844 mg/L であった。

暴露期間中に被験物質濃度の減少が認められた。濃度減少の理由として低濃度区で濃度減少が大きいこと、また、予備試験の暴露開始後 72 時間の分析において、藻類添加の有無および遠心分離の有無に関わらず、同程度の濃度減少がみられることから、試験容器への吸着の可能性が考えられるが、詳細は不明である。

濃度区 1～5 の測定値（時間加重平均値）は、それぞれ 0.000149, 0.000439, 0.00106, 0.00318, 0.00895 mg/L であった。

3.4 半数生長阻害濃度（EC50）および最大無影響濃度（NOEC）

暴露期間中の全試験区の生物量を Table 5 に、生長曲線を Figure 1 に示す。対照区の生長曲線が暴露期間中を通して指数増殖期にあることを確認した。

生長速度と生長阻害率を Table 6 に、半数生長阻害濃度（EC50）および最大無影響濃度（NOEC）を Table 7 に示す。濃度一阻害率曲線を Figure 2 に示す。得られた ErC50 および NOECr を次頁に示す。

ErC50 (0-72h) : 0.00460 mg/L (95%信頼区間 : 0.00423~0.00500 mg/L 直線回帰分析)

NOECr (0-72h) : 0.000439 mg/L (Williams の多重比較検定)

NOEC は、 Bartlett の等分散検定 ($\alpha=0.01$) を行い等分散性を確認後、一元配置分散分析 (1-way ANOVA, $\alpha=0.05$) および Williams の多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を用い決定した。詳細を付属資料-6 に示す。

3.5 藻類の観察結果

試験培養液の色調観察の結果、対照区および濃度区 1~3 で経時的に緑色度が増加する傾向がみられた。濃度区 4 ではわずかに色調が変化したが、緑色化することはなかった。濃度区 5 では色調に変化はみられなかった。

暴露開始後 72 時間の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全ての濃度区において、細胞形態の変化（収縮、膨張、破裂等）や細胞凝集は認められず、また、対照区との相違もなかった。

3.6 試験の有効性

対照区の生物量を Table 5 に、生長速度を Table 8 に示す。

対照区の生物量は暴露期間中に 16 倍以上増加した。また、対照区の毎日の生長速度の変動係数は暴露期間を通じて 35%を、対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数は 7%をそれぞれ超えることはなかった。

試験の有効性の条件を全て満たしたため、試験は有効であると判断した。

以 上

Table 1 Temperatures, Light Intensities and Revolutions in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity (μE/m ² /s)	Revolution (rpm)
0	22.2	65-71	100
24	22.0	66-71	100
48	21.9	65-72	100
72	22.0	69-73	100

Table 2 pH Values of Test Solutions and Test Cultures

Test Group	pH		
	0 Hour	72 Hours	(Vessel No.)
Control	7.7	7.7	(1)
Conc.1	7.7	7.7	(1)
Conc.2	7.7	7.7	(1)
Conc.3	7.7	7.7	(1)
Conc.4	7.7	7.7	(1)
Conc.5	7.7	7.7	(1)

Table 3 Appearances of Prepared Test Solutions before Inoculation

Test Group	Suspended solids	Floating solids	Precipitation	Color
Control	S-	F-	P-	C-
Conc.1	S-	F-	P-	C-
Conc.2	S-	F-	P-	C-
Conc.3	S-	F-	P-	C-
Conc.4	S-	F-	P-	C-
Conc.5	S-	F-	P-	C-

S- : Not observed (Transparent)

F- : Not observed

P- : Not observed

C- : Colorless

Table 4 Measured Concentration of the Test Substance in Test Solutions and Test Cultures

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
Control	--	<0.00009	<0.00009	<0.00009	<0.00009	----
Conc.1	0.00020	0.000177 (89)	0.000152 (76)	0.000142 (71)	0.000129 (65)	0.000149 (75)
Conc.2	0.00053	0.000483 (91)	0.000439 (83)	0.000439 (83)	0.000394 (74)	0.000439 (83)
Conc.3	0.0014	0.00128 (91)	0.00104 (74)	0.00100 (71)	0.00101 (72)	0.00106 (76)
Conc.4	0.0038	0.00330 (87)	0.00325 (86)	0.00311 (82)	0.00307 (81)	0.00318 (84)
Conc.5	0.010	0.00943 (94)	0.00921 (92)	0.00872 (87)	0.00844 (84)	0.00895 (90)

a : Time weighted mean

Table 5 Biomass of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72-Hour Exposure

Test Group	Nominal Concentration [Mean ^a Measured Concentration] (mg/L)	Vessel No.	Biomass (cells/mL)			
			0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	--	1	5000	24200	193000	1450000
		2	5000	24100	195000	1420000
		3	5000	25400	176000	1210000
		4	5000	27100	188000	1290000
		5	5000	25900	170000	1110000
		6	5000	23200	175000	1270000
		Average	5000	25000	183000	1290000
Conc.1	0.00020 [0.000149]	SD	0	1420	10500	128000
		1	5000	25000	182000	1230000
		2	5000	24700	168000	1140000
		3	5000	25700	182000	1330000
		Average	5000	25100	177000	1230000
		SD	0	513	8080	95000
Conc.2	0.00053 [0.000439]	1	5000	25200	170000	1160000
		2	5000	24000	171000	1170000
		3	5000	27100	171000	1120000
		Average	5000	25400	171000	1150000
		SD	0	1560	577	26500
Conc.3	0.0014 [0.00106]	1	5000	23900	151000	962000
		2	5000	23500	153000	922000
		3	5000	24700	150000	911000
		Average	5000	24000	151000	932000
		SD	0	611	1530	26800
Conc.4	0.0038 [0.00318]	1	5000	17700	84600	288000
		2	5000	16100	76400	210000
		3	5000	16800	75500	228000
		Average	5000	16900	78800	242000
		SD	0	802	5010	40800
Conc.5	0.010 [0.00895]	1	5000	6380	8040	9600
		2	5000	6440	7330	14900
		3	5000	6570	7390	9730
		Average	5000	6460	7590	11400
		SD	0	97	394	3020

a: Time weighted mean

SD: Standard deviation

*: Nominal initial biomass

Table 6 Growth Inhibitions (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Test Group	Nominal Concentration [Mean ^a Measured Concentration (mg/L)]	Vessel No.	Growth Rate	
			Rate ^{*1} μ (0-3d)	Inhibition(%) ^{*2} I_μ (0-3d)
Control	--	1	1.89	
		2	1.88	
		3	1.83	
		4	1.85	
		5	1.80	
		6	1.85	
		Average	1.85	-
Conc.1	0.00020 [0.000149]	SD	0.033	
		1	1.84	0.8
		2	1.81	2.2
		3	1.86	-0.6
		Average	1.84	0.8
		SD	0.026	
Conc.2	0.00053 [0.000439]	1	1.82	1.9
		2	1.82	1.7
		3	1.80	2.5
		Average	1.81	2.0
		SD	0.008	
Conc.3	0.0014 [0.00106]	1	1.75	5.2
		2	1.74	6.0
		3	1.74	6.2
		Average	1.74 **	5.8
		SD	0.010	
Conc.4	0.0038 [0.00318]	1	1.35	27.0
		2	1.25	32.7
		3	1.27	31.2
		Average	1.29 **	30.3
		SD	0.055	
Conc.5	0.010 [0.00895]	1	0.217	88.2
		2	0.364	80.3
		3	0.222	88.0
		Average	0.268 **	85.5
		SD	0.083	

a: Time-weighted mean

*1: Average and SD are calculated from original raw data, not from the rounded values (3 significant figures) presented in this table.

*2: Values are the growth inhibition (%) relative to the control. Inhibitions are calculated from original raw data of μ (0-3d), not from the rounded values (3 significant figures) presented in this table.

SD: Standard deviation

**: Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.

Table 7 EC50 and NOEC

Based on I_μ (0-3d) values (Growth rates)

ErC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (0-72h) (mg/L)
0.00460 *	0.00423 – 0.00500	0.000439

*: Using the data of Conc.4 and Conc.5

The ErC50 value and associated 95% confidence limits were determined by least squares linear regression analysis of the logarithm of test concentration against the growth inhibition (%) relative to the control.

The NOECr value was determined by an analysis of variance (ANOVA), Williams test, subsequent to Bartlett test for homogeneity of variances. Statistical analyses were performed using Yukms Statlight #4 software (Yukms Corp., Tokyo) and the significance level for all tests was set at $\alpha=0.05$, except Bartlett test, which was set at $\alpha=0.01$.

Table 8 Growth Rates of Control

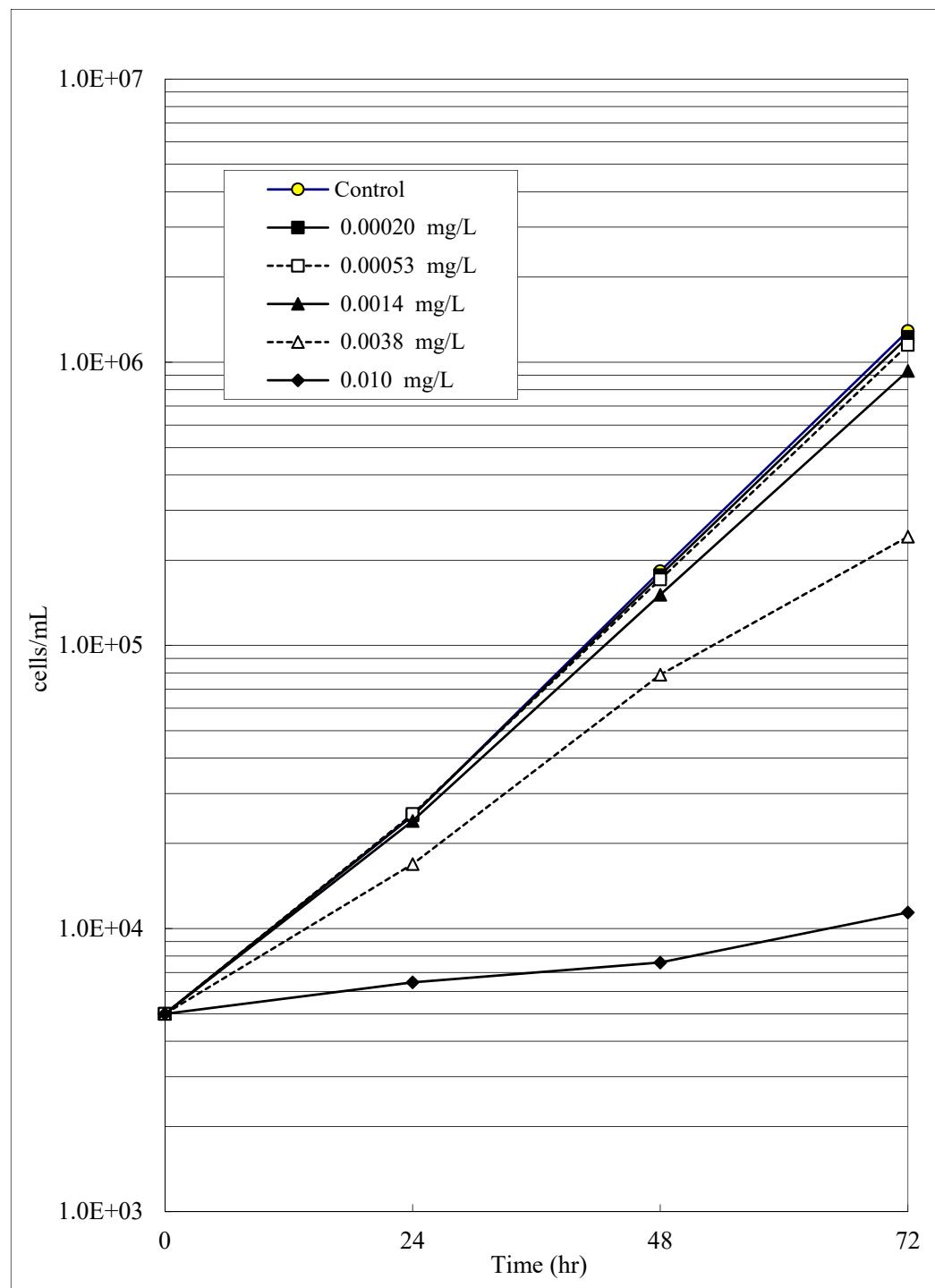
Vessel No.	Growth Rate				Average of μ (0-1d, 1-2d, 2-3d)	SD	CV(%)
	μ (0-3d)	μ (0-1d)	μ (1-2d)	μ (2-3d)			
1	1.89	1.58	2.08	2.02	1.89	0.273	14.4
2	1.88	1.57	2.09	1.99	1.88	0.274	14.6
3	1.83	1.63	1.94	1.93	1.83	0.177	9.7
4	1.85	1.69	1.94	1.93	1.85	0.139	7.5
5	1.80	1.64	1.88	1.88	1.80	0.135	7.5
6	1.85	1.53	2.02	1.98	1.85	0.270	14.6
Average	1.85	1.61	1.99	1.95			11.4
SD	0.033	0.057	0.085	0.051			
CV(%)	1.8	3.5	4.3	2.6			

SD : Standard deviation

CV : Coefficient of variation

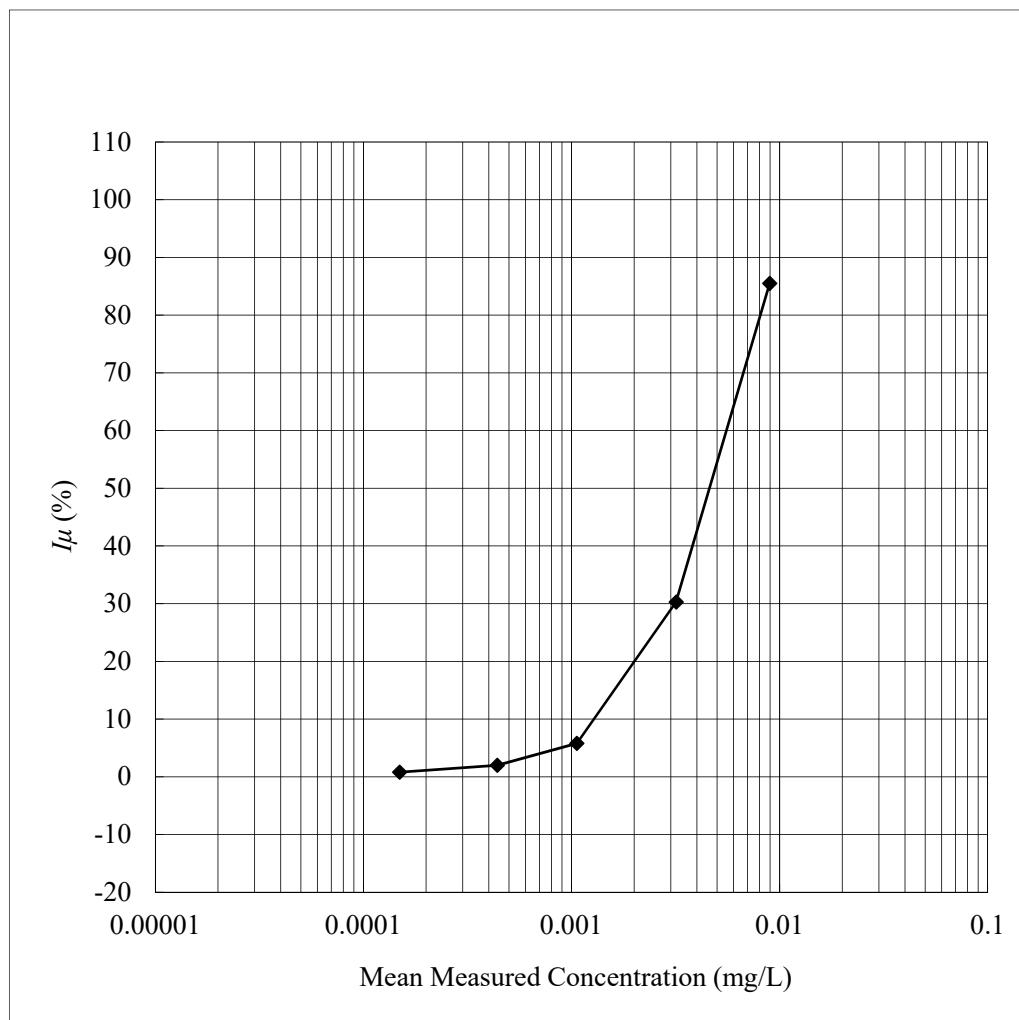
Average and SD are calculated from original raw data, not from the rounded values (3 significant figures) presented in this table.

Figure 1 Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*
(Mean biomass vs time during the 72-hour exposure)



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_{μ} Values Calculated from the Growth Rates



付属資料-1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance before the Study

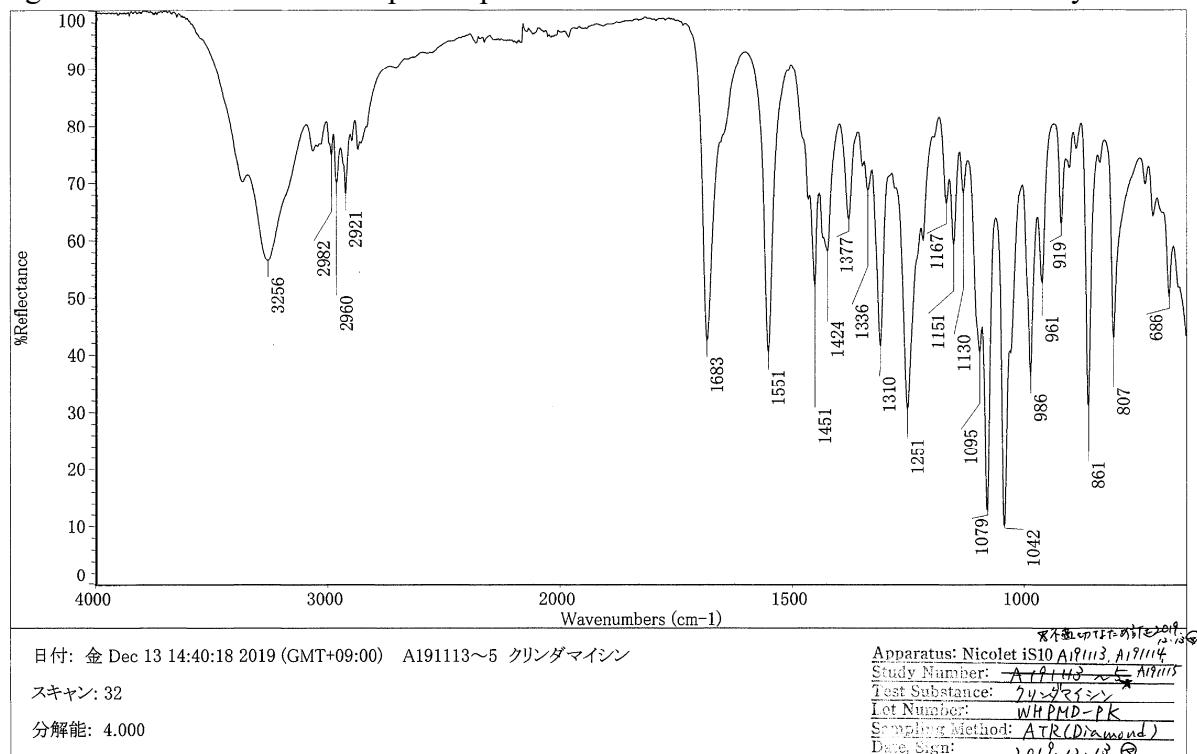
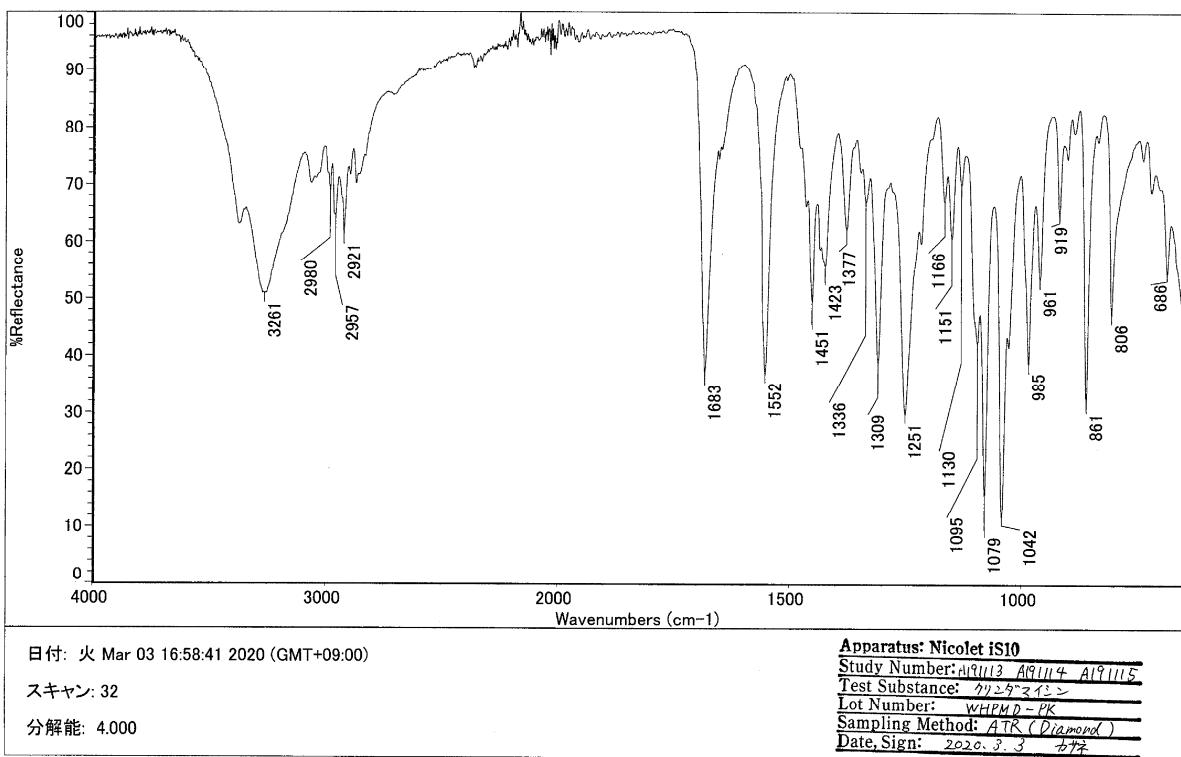


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料-2

培地の組成

Table A-2 OECD Medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>Concentration (mg/L)</u>
NH ₄ Cl	15
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15
KH ₂ PO ₄	1.6
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.064
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1
H ₃ BO ₃	0.185
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415
ZnCl ₂	0.003
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007
NaHCO ₃	50

The test guideline shows that the pH of the medium which is obtained at equilibrium between the carbonate system of the medium and the partial pressure of CO₂ in atmospheric air is 8.1.

付属資料-3

試験用水に対する溶解性

1. 概要

以下に示す試験用水に対する塩酸クリンダマイシン一水和物の溶解性を評価した。

脱塩素水道水（魚類急性毒性試験用）

Elendt M4 medium（ミジンコ急性遊泳阻害試験用）

OECD 培地（藻類生長阻害試験用）

2. 方法

- 1) 塩酸クリンダマイシン一水和物 20 mg を共栓付 200 mL 三角フラスコに採取し、各試験用水を 200 mL 加えた。（仕込み濃度：100 mg/L、連数：3）
- 2) 脱塩素水道水は 24°C、Elendt M4 medium および OECD 培地は 21°C でスターラー^{*1,2}により 24 時間攪拌した。

*1：ヤマト科学製 マグミキサー MG120

*2：ヤマト科学製 マグミキサー MG600

- 3) 攪拌後の試料をフィルター^{*3} でろ過し、得られたろ液の塩酸クリンダマイシン一水和物濃度を高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）計により測定した。

*3：ミリポア製 マイレクス HA 0.45 μm

3. 結果および考察

測定結果

No.	脱塩素水道水		Elendt M4 medium		OECD 培地	
	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)
1	103		99.5		98.5	
2	101	100	110	100	101	100
3	96.1		105		102	

以上の結果から、塩酸クリンダマイシン一水和物の試験用水に対する溶解度は、脱塩素水道水（24°C）、Elendt M4 medium および OECD 培地（21°C）のいずれの試験用水でも 100 mg/L であると判断した。

付属資料-4

試験液の調製

試験液の調製

1. 準 備

被験物質原液 I の調製

採取量	----->	22.6	mg	換算係数 : 0.886
試験用水	----->	OECD培地 (22°C)		
最終容量	----->	1000	mL	
容 器	----->	1 L メジャーム瓶		
濃 度	----->	20	mg/L *	
混合方式	----->	スターラーで攪拌 (30分間), 密栓		

被験物質原液 II の調製

原液 I 採取量	----->	500	μL	
試験用水	----->	OECD培地 (22°C)		
最終容量	----->	1000	mL	
容 器	----->	メスフラスコ		
濃 度	----->	0.0100	mg/L *	
混合方式	----->	スターラーで攪拌 (1分間), 密栓		

2. 試験液の調製

各原液を下記の表の通り採取し, 試験用水で希釈して試験液とする。対照区は試験用水のみとする。

最終容量	----->	100	mL	
容 器	----->	300 mL ガラス製三角フラスコ, アルミ栓		
混合方式	----->	手で振とう攪拌		
連 数	----->	6容器/対照区, 3容器/濃度区, 1予備容器/試験区		

設定試験濃度*	区No. (略称)	原液II	
		mg/L	mL
対照区	Cont.	----->	0
0.00020	Conc.1	----->	2.0
0.00053	Conc.2	----->	5.3
0.0014	Conc.3	----->	14
0.0038	Conc.4	----->	38
0.010	Conc.5	----->	100

* : 塩酸クリンダマイシン一水和物のクリンダマイシン換算値

付属資料-5

試験液および試験培養液の分析

1. 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 計 測定条件

装置

高速液体クロマトグラフ質量分析計 SL-HT システム No.2, Agilent technologies 製
 ワークステーション : ChemStation
 高速液体クロマトグラフ (HPLC) : Agilent 1200 型
 デガッサ : G1379B 型
 送液ポンプ : G1312B 型 (バイナリポンプ)
 オートサンプラー : G1329B 型
 カラムオーブン : G1316B 型
 質量選択検出器 (MSD) : G6140A 型

[HPLC 条件]

カラム : Thermo製 Accucore C18 2.6 μ m 2.1 mm i.d. \times 50 mm
 カラムオーブン : 50°C
 溶離液 : A1液 : 5mM ぎ酸アンモニウム水溶液/ぎ酸=1000/1 (v/v)
 B1液 : HPLC用アセトニトリル
 0.00 min A1 液 90%, B1 液 10%
 3.00 min A1 液 2%, B1 液 98%
 6.50 min A1 液 2%, B1 液 98%
 ストップタイム : 6.50 min
 試料注入量 : 25 μ L
 流速 : 0.400 mL/min

[MSD 条件]

Ionization : API-ES
 Fragmentor : 200 V
 Nebulizer : N₂ (30 psig)
 Drying gas : N₂ (10 L/min, 300°C)
 Mode : Positive
 SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :
 m/z 425.20

2. 検量線の作成と定量下限の決定

1) 標準溶液の調製

被験物質 112.9 mg を秤量し, HPLC 用メタノールで溶解し 100 mL に定容とし, 100 mg/L (クリンダマイシン換算値) の溶液を調製した。この溶液を HPLC 用メタノールで順次希釀し, 0.000100, 0.000200, 0.000500, 0.00100 mg/L の標準溶液を調製した。また, HPLC 用メタノールを 0 mg/L の標準溶液とした。

2) 標準溶液の分析方法

標準溶液を以下のように分析した。

標準溶液 0.75 mL 採取

| ←超純水* 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS測定

* : JIS K0557 A4 グレードの水

3) 検量線の作成

横軸に濃度 (mg/L) を, 縦軸にピーク面積 (count) をとり, 検量線を作成した (Figure A-5-1)。検量線の作成に, 0 mg/L の標準溶液の結果は含めなかった。最小二乗法により直線回帰式 $Y=a+bX$ を求めた。相関係数は 0.998 となり, 直線性の基準 (0.995 以上) を満たした。また, 切片 a の 95%信頼区間が原点を含むことから, 検量線は原点を通過する直線とみなせた。

4) 定量下限

1)で調製した 0.000100 mg/L の標準溶液を 2) に従って $n=3$ で分析した。各測定値から S/N 比 = 10 のシグナルを与える被験物質濃度をそれぞれ算出し, その平均値を暴露期間中の定量下限とした。暴露期間中の定量下限は 0.00009 mg/L であった。

3. 試験液の分析

試験液を以下のように分析した。代表的な測定結果を Figure A-5-2 に示す。

暴露開始時

試験液：各試験区毎に、全ての試験容器の中層より 1.0 mL ずつ採取して混合
|
混合した試験液（超純水で適宜希釈*）を適量採取
| ←HPLC用メタノール0.75 mL 添加
LC/MS 測定

暴露開始後24, 48および72時間

試験液：各試験区毎に、全ての試験容器の中層より 1.0 mL ずつ採取して混合
|
遠心分離（3000 rpm, 10分間, 装置：日立工機製 CR21GII型）
|
上澄み液（超純水で適宜希釈*）を適量採取
| ←HPLC用メタノール0.75 mL 添加
LC/MS 測定

*：検量線範囲を超えると予想されたものについて希釈した。

4. 試験液中の被験物質濃度の定量

試験液中の被験物質濃度の定量は、各分析時に測定する標準溶液のピーク面積との比較で行った。

Figure A-5-1 Calibration curve

No.	Concentration X (mg/L)	Peak Area Y (count)
1	0.000100	4134
2	0.000200	13757
3	0.000500	28569
4	0.00100	61435

$$Y = a + b \times X$$

$$a = -8.818E+02 \quad -8.275E+03 < a < 6.511E+03$$

$$b = 6.190E+07 \quad (95\text{-Percent Confidence Limits})$$

$$r = 0.998$$

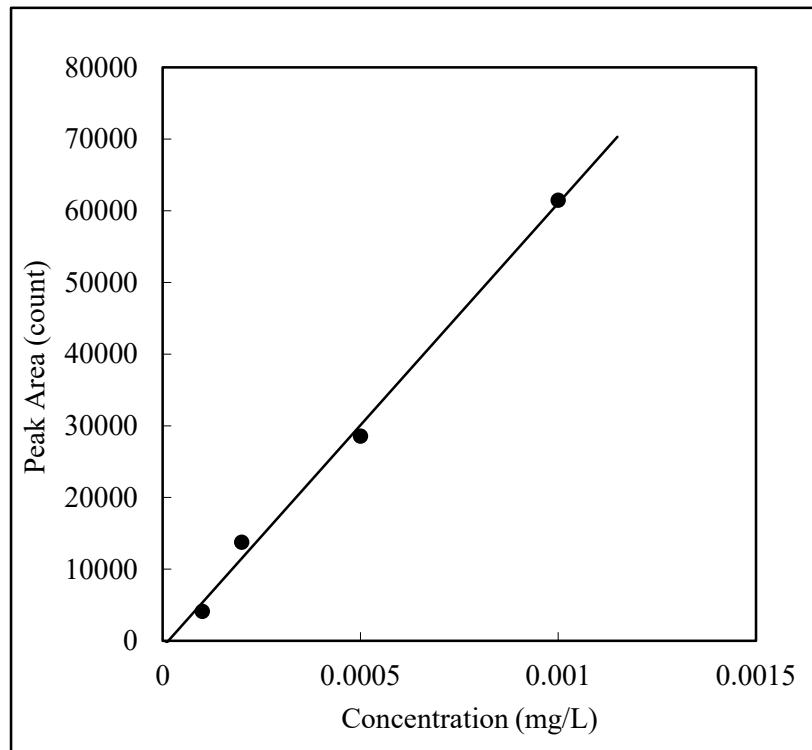
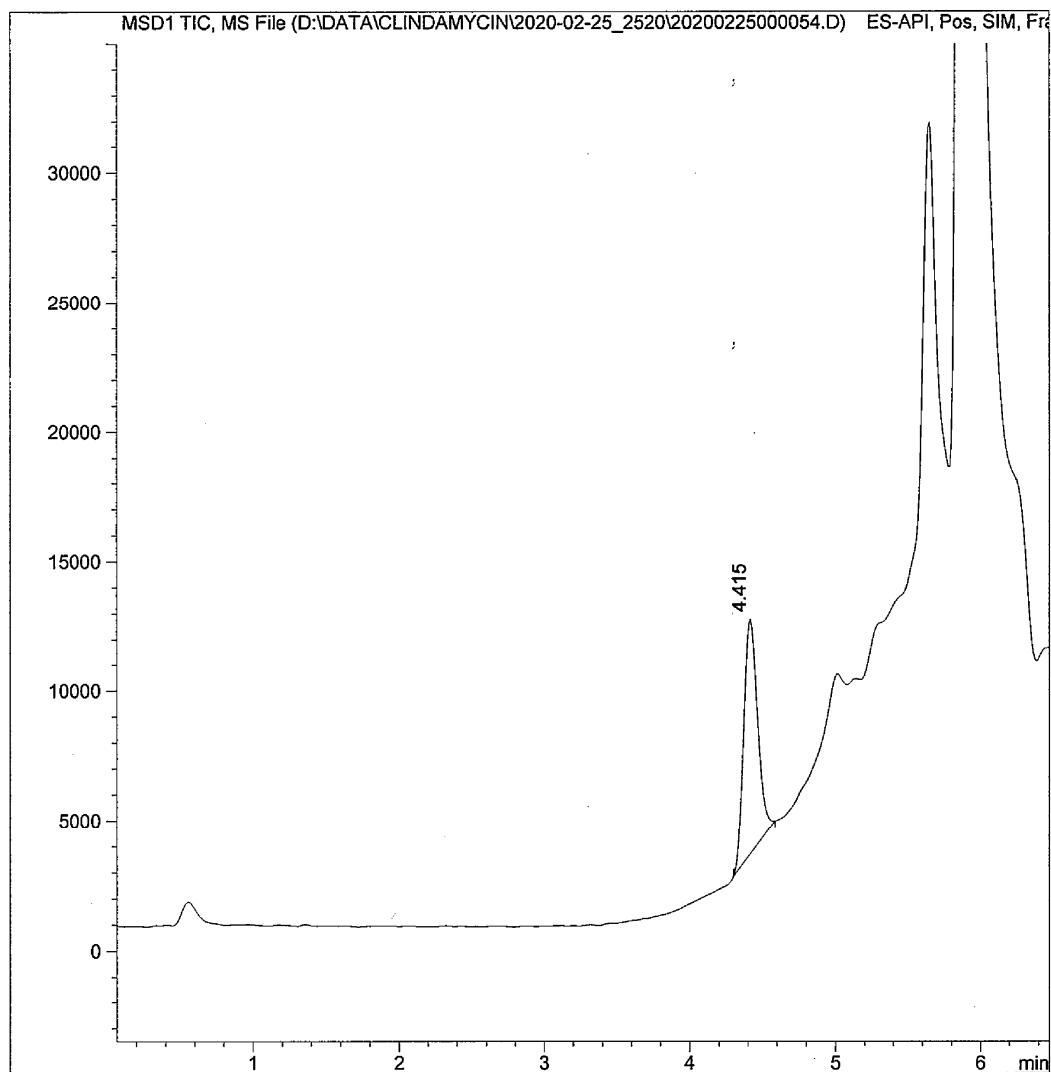


Figure A-5-2 Representative Measurement Results

(1) Standard 0.00100 mg/L ; 0 Hour

```
=====
Injection Date : 02/25/2020           Seq. Line : 24
Study No.      : (V)A191113 ( )A191114 ( )A191115 Clindamycin
Acq. Method    : D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-25_2520\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name     : STD 0.001 mg/L          Location : Vial 2
Acq. Operator   : [REDACTED]           Inj. No  : 1
                                         Inj. Vol. : 25μl
=====
```



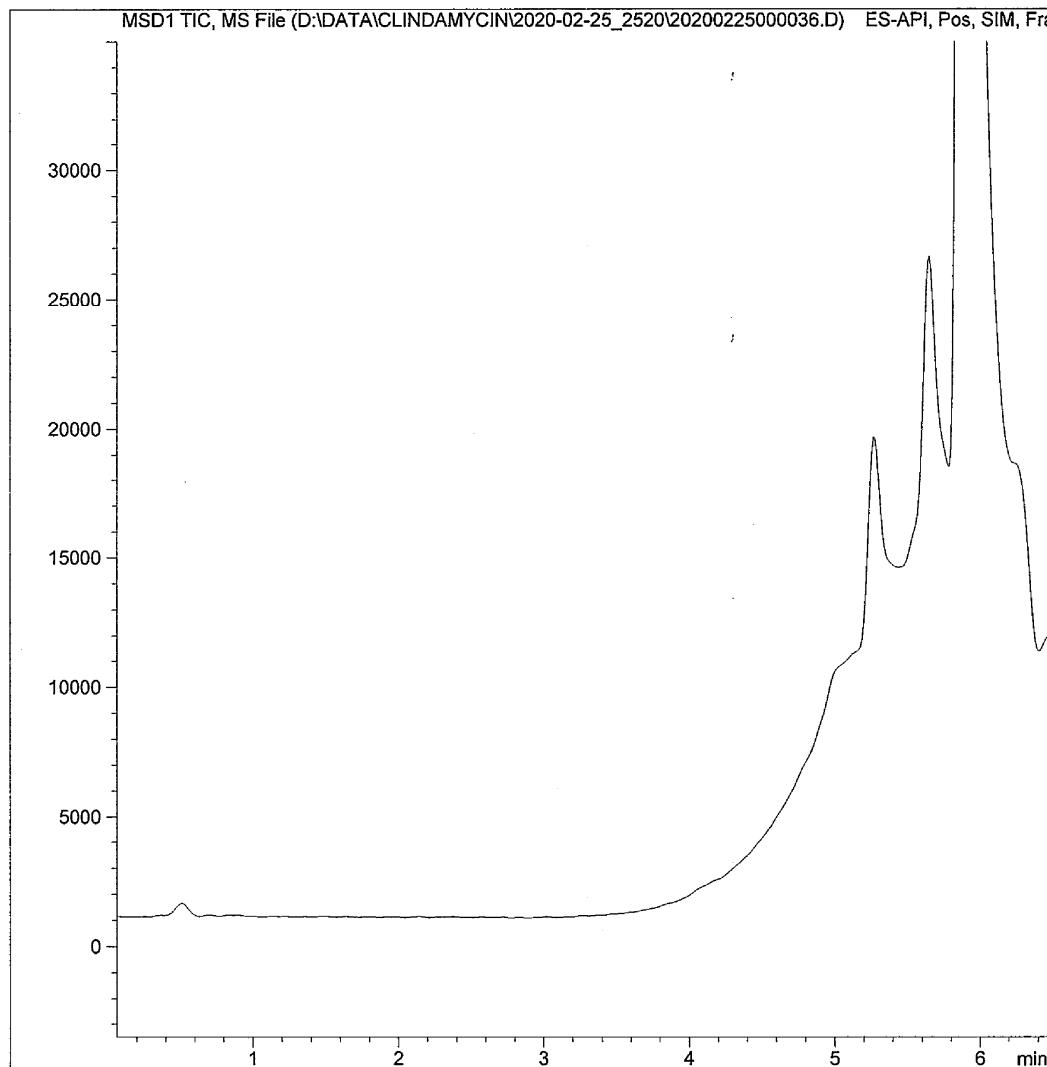
Area Percent Report

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		4.415	MM	0.109	60010	9153	100.0
		Total:			60010	9153	

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(2) Control ; 0 Hour

```
=====
Injection Date :02/25/2020                               Seq. Line :      6
Study No.      :( ✓)A191113 (  )A191114 (  )A191115 Clindamycin
Acq. Method    :D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-25_2520\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name     :A0hC                                     Location :Vial 21
Acq. Operator   :田立晶                                 Inj. No   :      1
                                                               Inj. Vol. : 25µl
```

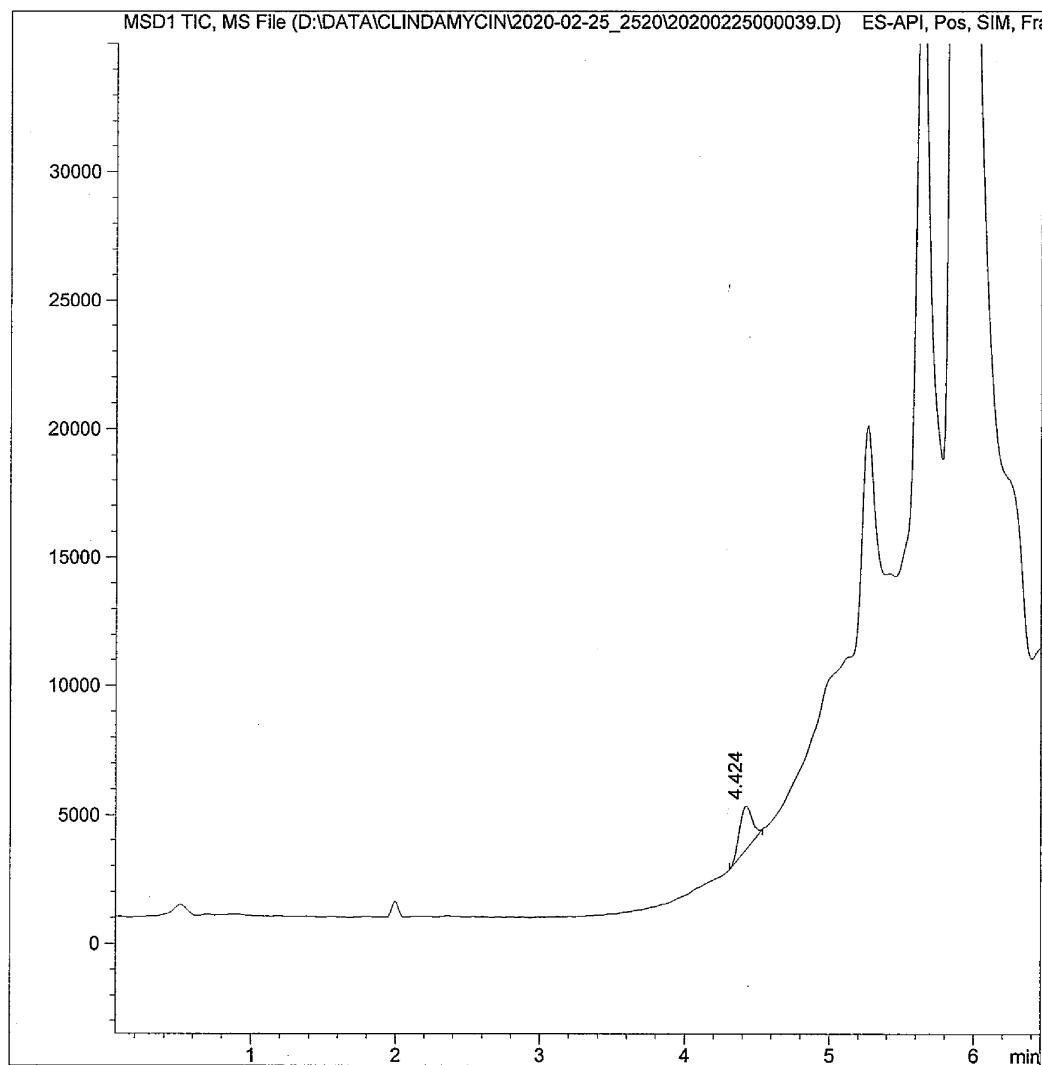


```
=====
Area Percent Report
=====
#  Meas. Ret.  Peak T    Width      Area      Height     Area %
-----  
-----  
Total:
```

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(3) Conc.1 ; 0 Hour

```
=====
Injection Date : 02/25/2020          Seq. Line : 9
Study No.      : ( ✓ ) A191113 ( ) A191114 ( ) A191115 Clindamycin
Acq. Method    : D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-25_2520\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name     : A0hC1           Location : Vial 22
Acq. Operator   : 田立伟          Inj. No  : 1
                                         Inj. Vol. : 25µl
```



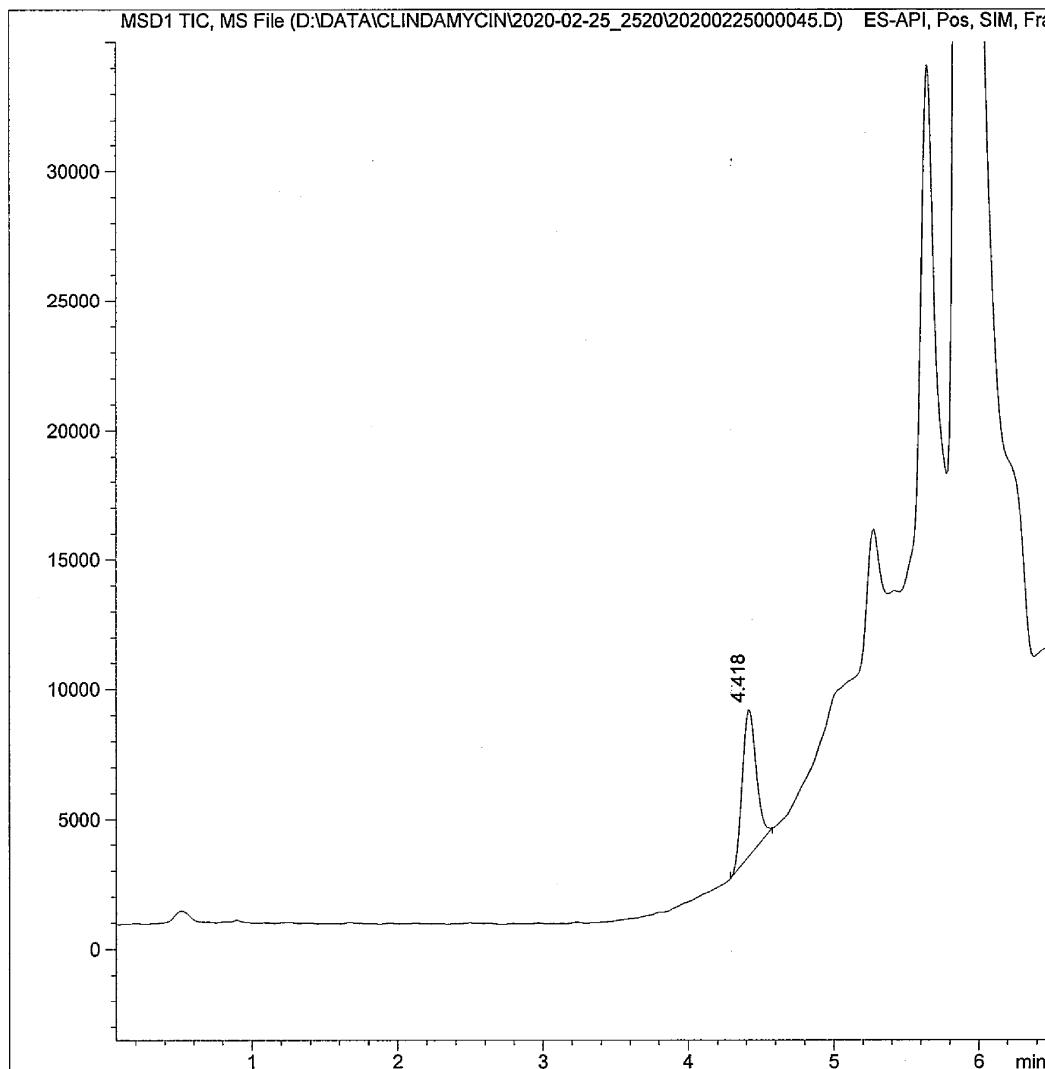
Area Percent Report

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		4.424	MM	0.100	10607	1764	100.0
Total:					10607	1764	

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(4) Conc.3 ; 0 Hour

```
=====
Injection Date :02/25/2020           Seq. Line :      15
Study No.      :( ✓)A191113 ( )A191114 ( )A191115 Clindamycin
Acq. Method    :D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-25_2520\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name     :A0hc3                 Location :Vial 24
Acq. Operator   :PL                Inj. No  :      1
                                         Inj. Vol. : 25µl
```

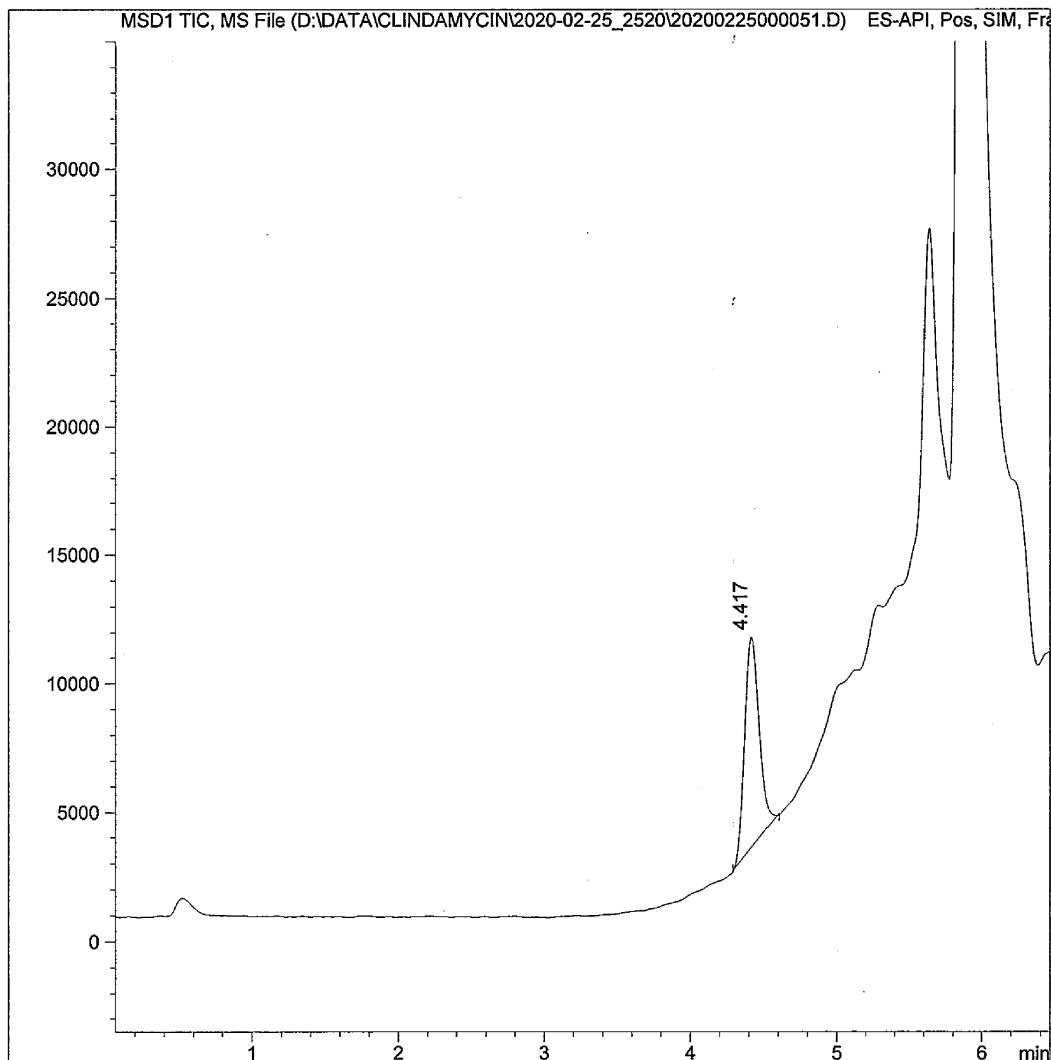


```
=====
Area Percent Report
=====
#   Meas. Ret.  Peak T    Width     Area      Height     Area %
-----+
1     4.418    MM       0.111    38282    5723     100.0
-----+
Total:                               38282    5723
```

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(5) Conc.5 ; 0 Hour

```
=====
Injection Date : 02/25/2020          Seq. Line : 21
Study No.      : (✓)A191113 ( )A191114 ( )A191115 Clindamycin
Acq. Method    : D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-25_2520\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name     : A0hC5          Location : Vial 26
Acq. Operator   : 田中洋          Inj. No  : 1
                           Inj. Vol. : 25µl
```



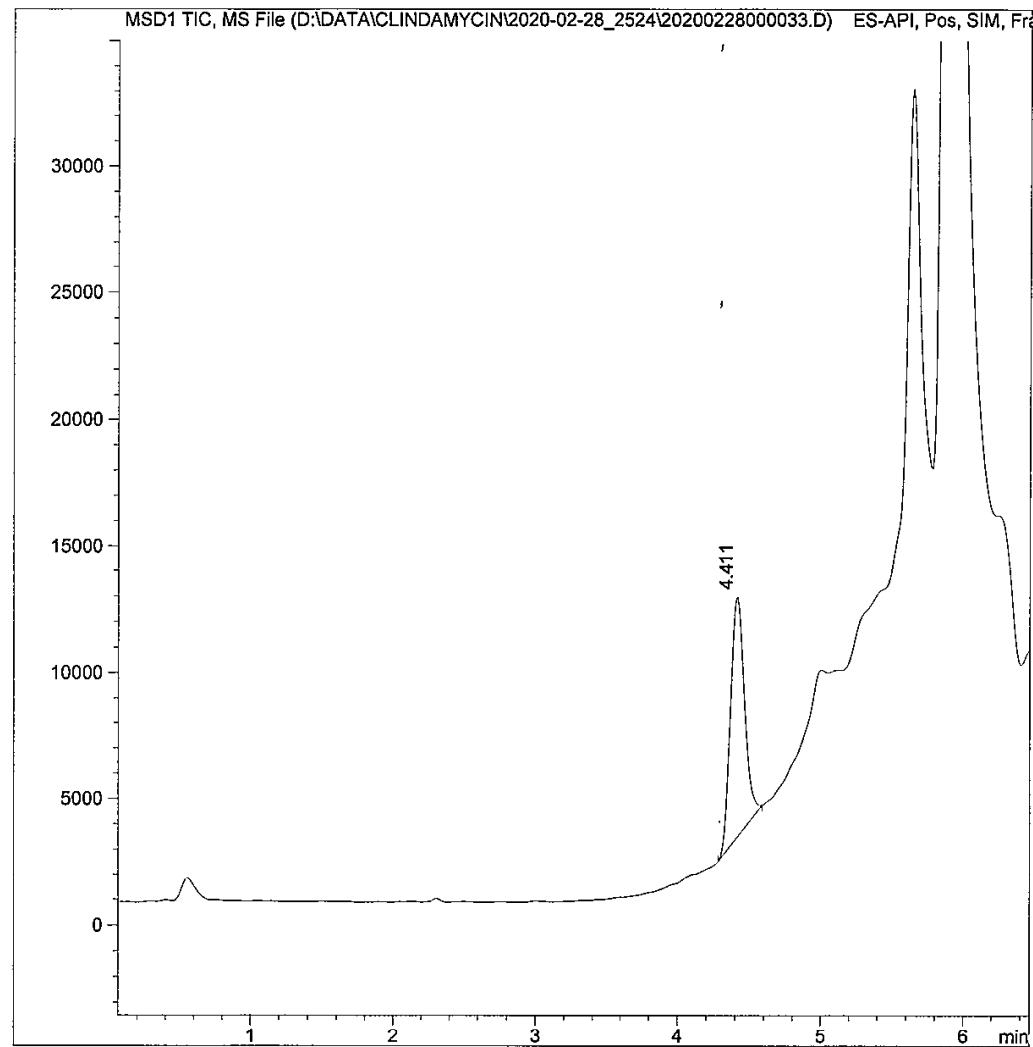
Area Percent Report

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		4.417	MM	0.114	56585	8289	100.0
Total:					56585	8289	

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(6) Standard 0.00100 mg/L ; 72 Hours

```
=====
Injection Date : 02/28/2020          Seq. Line : 33
Study No.      : (V)A191113 ( )A191114 ( )A191115 Clindamycin
Acq. Method    : D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-28_2524\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name    : STD 0.001 mg/L      Location : Vial.2
Acq. Operator   : 田井
```



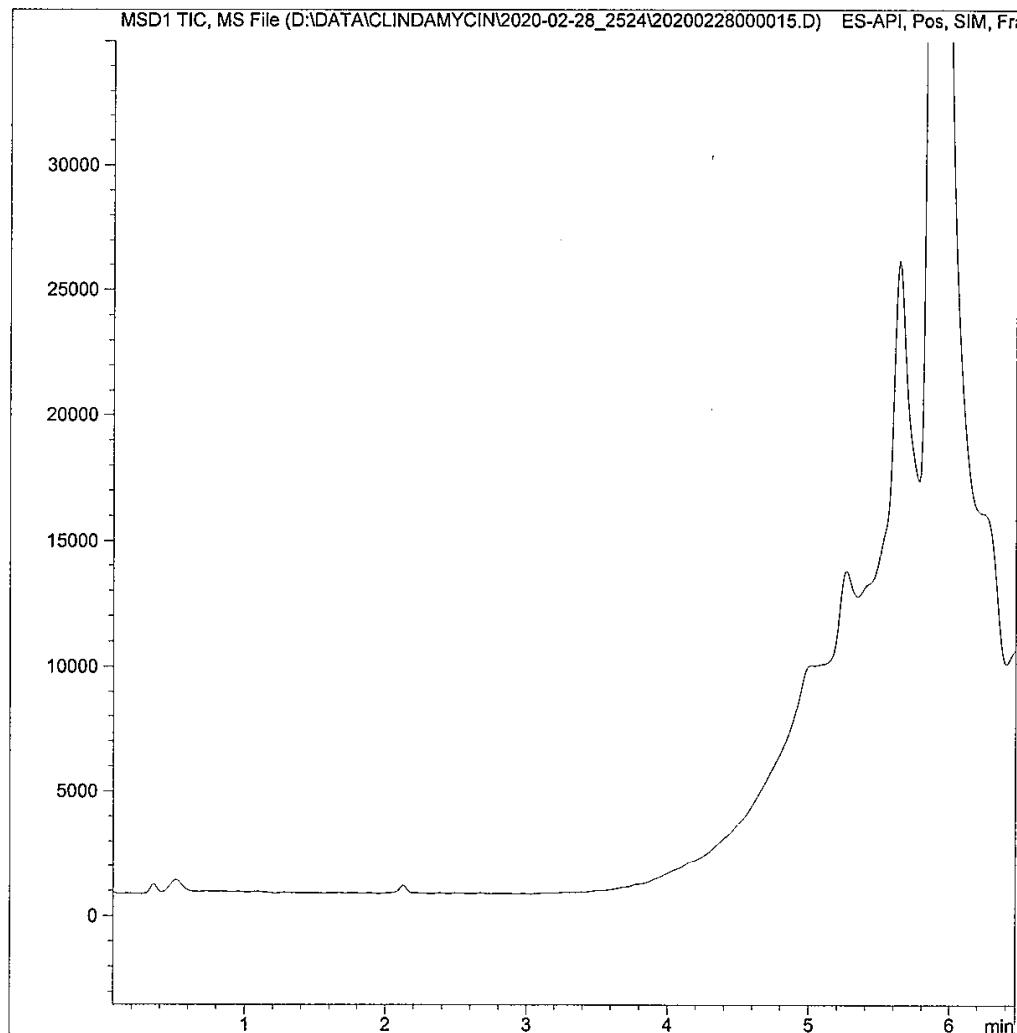
Area Percent Report

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		4.411	MM	0.111	63858	9593	100.0
		Total:			63858	9593	

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(7) Control ; 72 Hours

```
=====
Injection Date :02/28/2020          Seq. Line :      15
Study No.      :(V)A191113 ( )A191114 ( )A191115 Clindamycin
Acq. Method    :D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-28_2524\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name    :A72hC           Location :Vial 11
Acq. Operator   :田井尚        Inj. No  :      1
                                         Inj. Vol. : 25μl
```

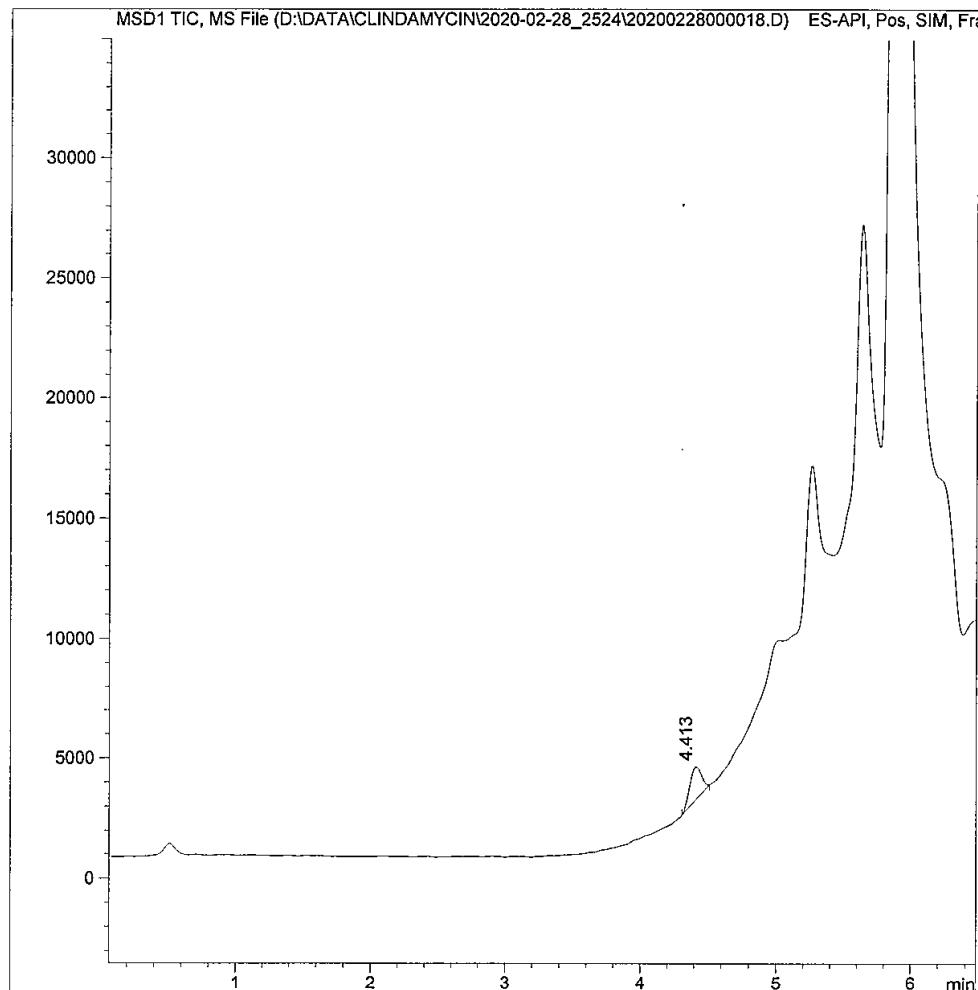


```
=====
Area Percent Report
=====
#  Meas. Ret.  Peak T    Width      Area      Height     Area %
-----  
-----  
Total:
```

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(8) Conc.1 ; 72 Hours

```
=====
Injection Date :02/28/2020          Seq. Line :      18
Study No.      : (✓)A191113 ( )A191114 ( )A191115 Clindamycin
Acq. Method    :D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-28_2524\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name    :A72hC1           Location :Vial 12
Acq. Operator   :田井アリ          Inj. No  :      1
                                         Inj. Vol. : 25 $\mu$ l
=====
```

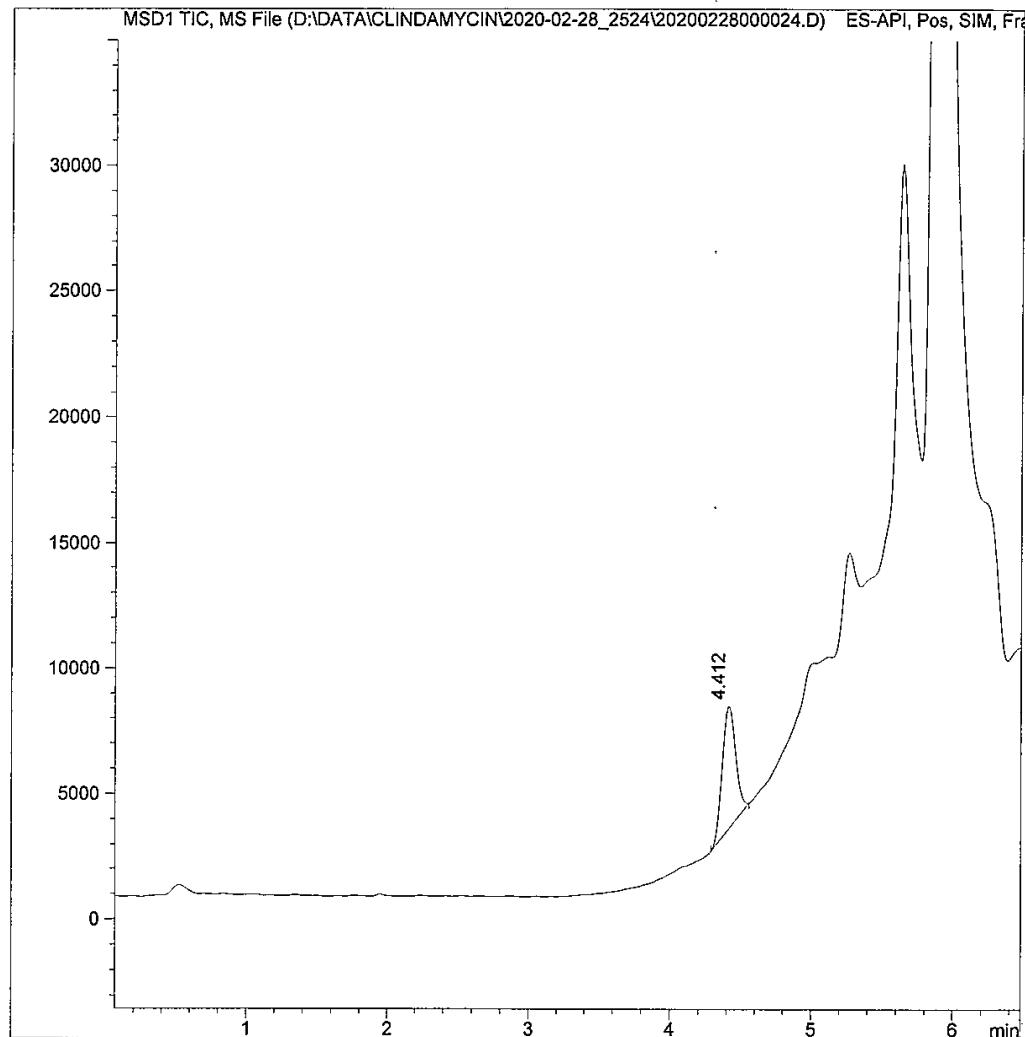


```
=====
Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
=====
1 4.413 MM 0.098 8241 1400 100.0
=====
Total: 8241 1400
=====
```

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(9) Conc.3 ; 72 Hours

```
=====
Injection Date : 02/28/2020          Seq. Line : 24
Study No. : (✓)A191113 ( )A191114 ( )A191115 Clindamycin
Acq. Method : D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-28_2524\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name : A72hC3                Location : Vial 14
Acq. Operator : 田井山             Inj. No : 1
                                         Inj. Vol. : 25µl
```



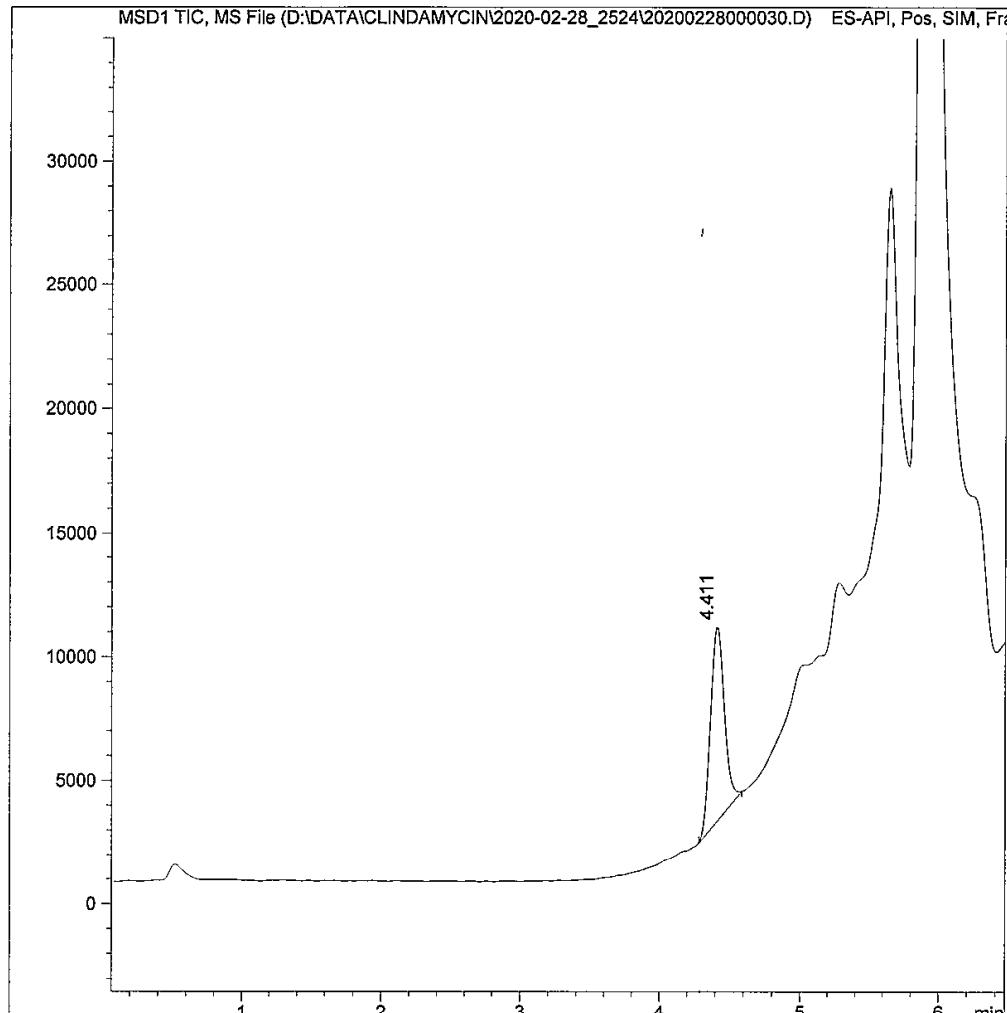
Area Percent Report

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		4.412	MM	0.109	32352	4953	100.0
Total:					32352	4953	

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(10) Conc.5 ; 72 Hours

```
=====
Injection Date : 02/28/2020          Seq. Line :      30
Study No.      : ( ) A191113 ( ) A191114 ( ) A191115      Clindamycin
Acq. Method    : D:\DATA\CLINDAMYCIN\2020-02-28_2524\CLINDAMYCIN_A.M
Sample Name     : A72hC5          Location : Vial 16
Acq. Operator   : 田边山          Inj. No  :      1
                           Inj. Vol. : 25μl
=====
```



Area Percent Report

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		4.411	MM	0.113	53910	7937	100.0
		Total:			53910	7937	

付属資料-6

結果の算出

Table A-5-1 Calculation of the ErC50

直線回帰分析 (EC50値の算出)

濃度 (mg/L)		阻害率 (%)
x	log(x)	y
0.00318	-5.75	27.0
0.00318	-5.75	32.7
0.00318	-5.75	31.2
0.00895	-4.72	88.2
0.00895	-4.72	80.3
0.00895	-4.72	88.0

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
0.00460	0.00423	～	0.00500 (mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05,f1,f2)
Between	4570.56	1	4570.56	314.99	7.71
Within	58.04	4	14.51		
Total	4628.60	5			

Table A-5-2 Calculation of the NOECr

Results of Statistical Multicomparison Test**Growth rates (0-3d)****Input Data Table**

control Group1	Conc.1 Group2	Conc.2 Group3	Conc.3 Group4	Conc.4 Group5	Conc.5 Group6
1.89	1.84	1.82	1.75	1.35	0.217
1.88	1.81	1.82	1.74	1.25	0.364
1.83	1.86	1.80	1.74	1.27	0.222
1.85	*	*	*	*	*
1.80	*	*	*	*	*
1.85	*	*	*	*	*

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance			
1	6	1.8500	0.0136	0.0333	0.0011			
2	3	1.8354	0.0148	0.0257	0.0007			
3	3	1.8126	0.0045	0.0077	0.0001			
4	3	1.7424	0.0055	0.0095	0.0001			
5	3	1.2901	0.0315	0.0546	0.0030			
6	3	0.2678	0.0481	0.0833	0.0069			
Method Bartlett test	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.	
			0	11.5038	11.0705	<15.0863	20.5150	0.0423
Method 1-way ANOVA	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.	
			0	690.8984	>2.9013	4.5556	7.5674	1.3057E-10
Method Dunnett	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.	
Dunnett	1 vs 2		2	0.4896	2.8161	3.6392	999.9900	0.9878
Dunnett	1 vs 3		2	1.2468	2.8161	3.6392	999.9900	0.6606
Dunnett	1 vs 4		2	3.5869	>2.8161	3.6392	999.9900	0.0121 *
Dunnett	1 vs 5		2	18.6613	>2.8161	>3.6392	999.9900	1.3718E-06 **
Dunnett	1 vs 6		2	52.7344	>2.8161	>3.6392	999.9900	1.3717E-06 **
Method Williams(1971,1972,1977)	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.	
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 2		2	0.4896	2.1310	2.9470	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 3		2	1.2468	2.2050	3.0030	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 4		2	3.5869	>2.2290	>3.0190	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 5		2	18.6613	>2.2410	>3.0270	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 6		2	52.7344	>2.2470	>3.0310	999.9900	999.9900 **