

Point

養殖用スサビノリを対象とした生物安全性試験の定量評価方法を紹介します。死細胞染色法(死細胞を特異的に染色する方法)<sup>1)</sup>により効率的に死細胞を検出し、死細胞率を評価指標とすることで、定量性の高い生物安全性試験が実施できるようになりました。

# 死細胞染色法を利用したスサビノリの安全性定量評価

環境創造研究所 生物多様性研究センター 環境生態部 石田 暁之、南城利勝、河村佳正

## はじめに

鉄鋼の製造過程で発生する製鉄副産物は、これまで道路用路盤材や地盤改良材として有効利用されてきました。近年では、この製鉄副産物を、海域の藻場造成、底質改善、生物付着基盤として活用するための製品開発が進められています。

開発された製鉄副産物製品について、全国水産技術者協会(全水技協)が同協会の定める「漁場造成・再生用資器材の技術評価に関する規程」に従って、製品の安全性を認定しています。さらに、本認定を受けた製品を全国漁業協同組合連合会が認証する製品認証システムがあり、鉄鋼メーカーは自社製品の有用性、安全性を確認するため、この認証取得を進めています。

認証を取得するためには、水産生物に対する生物安全性試験を実施し、安全性を確認する必要があります。全水技協が定める規程では、6生物分類群(表1)の海産生物について生物安全性試験を実施することが示され、海藻草類の対象生物としてスサビノリ(*Porphyra yezoensis*)が挙げられています。

表1 認証取得に必要な生物安全性試験の生物分類群

生物分類群	対象種
グループ1 魚類	スズキ、マダイ、ヒラメ等
グループ2 貝類	アサリ、サザエ、アワビ等
グループ3 甲殻類	クルマエビ、フラインシュリンプ、動物プランクトン等
グループ4 海藻草類	スサビノリ、アマモ等
グループ5 植物プランクトン	植物プランクトン等
グループ6 外敵生物	クラゲ、アオサ、赤潮プランクトン等

スサビノリは内湾における海面養殖の代表種であり、私たちの食卓にのぼる「海苔」の原料となるものです。また、ノリ養殖はノリの成長(生産)に伴って海水中から多量の二酸化炭素・窒素・リンを取り込み、酸素を放出するため、沿岸海域の浄化に大いに貢献しています<sup>2)</sup>。

このように水産上重要な種であることから、生物安全性試験の対象生物として適していると考えられます。しかし、これまでスサビノリの品質向上や病害に対する研究は数多く行われているものの、環境省や水産庁が定める生物試験の対象種になっていないため、試験方法に関して公定法が存在していませんでした。

そこで、当社はスサビノリ安全性試験の定量評価方法について検討を行いました。

## スサビノリの生物安全性試験と評価指標

### (1)スサビノリを用いた安全性試験

スサビノリを用いた生物安全性試験では、試験材料として養殖網に付着するノリ芽(ノリの幼体)を用います。試験原液(製鉄副産物2.5Kgを25Lの滅菌濾過海水に浸漬し、200回/分の速度で6時間攪拌して溶出させた水: JIS K 0058-1<sup>3)</sup>に準拠)の濃度を段階的に希釈し、調整した試験区と対照区を設け、冷凍養殖網(写真1)を切断して作製した網糸(試験糸)を試験液に浸漬し、24時間ごとに換水をしながらか96時間ばく露します(図1)。



写真1 冷凍養殖網

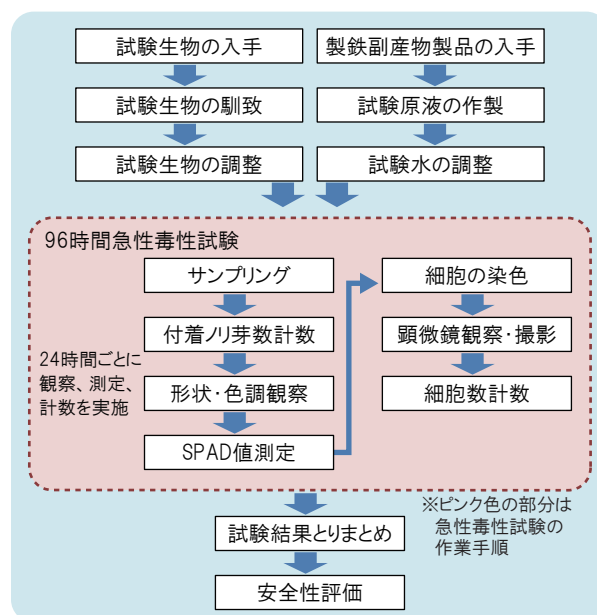


図1 試験生物入手から安全性評価までの流れ

## (2)評価指標の検討

生物安全性試験では、試験液に一定期間ばく露した際の生物に対する影響の有無を判断する必要があります。マダイ、クロアビ等であれば生死による判断、プランクトンであれば生長速度による判断が一般的です。一方、スサビノリは多細胞からなる海藻であるため、藻体単位での生死判別や、短期間での生長速度による判断が困難です。そこで、スサビノリの安全性試験にあたっては、独自の評価指標の設定が必要となりました。

## (3)死細胞染色法を用いた定量評価方法

試験初期では、ばく露後のノリ芽の破損状況を段階毎に区分し、その比率を評価指標として用いることを検討しました。しかし、この方法では、破損状況の判別が観察者により異なる場合があり、定量性に欠ける面がありました。また、ノリ芽の破損状況は、検鏡しながら計数するため、1試験区における観察や計数に要する時間が長く、試験区間における時間差で生じるノリ芽の劣化も危惧されました。

そこで、死細胞を特異的に染色する試薬でノリ芽を染色し(写真2)、全細胞数に対する死細胞の比(死細胞率)で評価するとともに、観察記録のデジタル化により効率化を図る方法について検討しました。

染色及び観察方法は、以下に示すとおりです。

- ① 試験糸に付着するノリ芽から無作為に10枚抽出し、0.1%エリトロシン液で染色する
- ② 物理的要因による裂傷や摩擦といった破損が少ない藻体中央部の細胞について、それぞれ10視野分の生物顕微鏡写真を撮影する
- ③ 撮影した写真データをパソコンに取り込んだ後、カラーで印刷する
- ④ カラー印刷した細胞写真を用いて、生細胞数と死細胞数をそれぞれ計数し、死細胞率(%)を求める
- ⑤ 求めた結果の有意性について統計学的に検定する

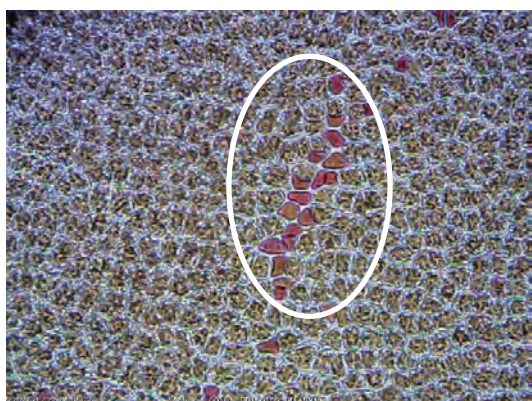


写真2 染色された死細胞(白丸内)

本手法で製鉄副産物製品Aについてノリ芽の生物安全性試験を実施したところ、対照区を含めたいずれの試験区においても、死細胞率は10~15%であり、顕著な差がみられませんでした(図2)。また、統計学的な検定においても有意性はみられませんでした。

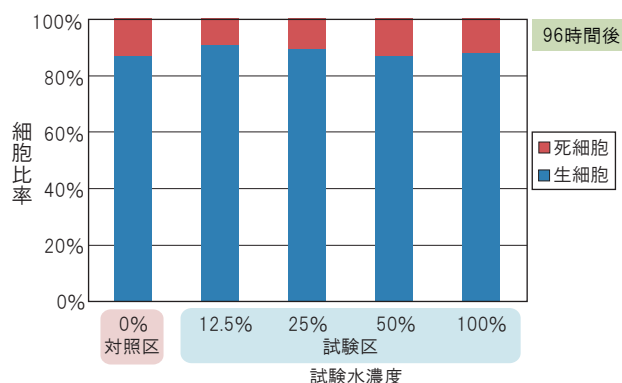


図2 死細胞率(製鉄副産物製品Aの試験結果)

なお、この死細胞率による影響評価の妥当性を確認するため、試験糸に付着するノリ芽数の計数、形状、色調の観察と同時に、SPAD値<sup>4)</sup>の測定を実施しました。その結果、死細胞率による評価と同様に、対照区と各試験区について顕著な差がないことが確認されました。

これらのことより、死細胞率を評価指標とする手法によって、製鉄副産物製品Aがノリ芽に対して影響がないこと、及び本手法による安全性定量評価の妥当性が確認されました。

## おわりに

製品認証システムでは、製品を投入する海域に生息し、水質や底質等の物理環境の影響を受けやすく、かつ水産上重要な種が安全性試験の対象生物として挙げられています。今後、製鉄副産物の種類や製品の多様化、投入エリアの拡大に伴い、対象生物も多様化していくことが予想されます。

当社では、今後もこのような社会的ニーズに対し、いち早く対応できるように確かな情報を収集し、研究開発に取り組んでまいります。

### 【参考文献・HP等】

- 1) 「屋外タンク培養によるのりの人工発病実験-干出と病気の発生との関係について-」(南海海区水産研究所業績44号:吉川浩二・斉藤雄之助)のエリトロシン染色率による障害の判定法を参考に改良した手法
- 2) [http://www.nori.or.jp/essay/essay\\_001-001.html](http://www.nori.or.jp/essay/essay_001-001.html)  
一般財団法人海苔増殖振興会:海苔百景「ノリ養殖は沿岸海域環境を浄化している」を参照
- 3) 日本工業規格で定められる試験方法
- 4) 葉緑素(クロロフィル)濃度に対し、光学濃度差測定方式によって得られる指示値であり、葉緑素濃度との相関がある数値